



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117247944 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 19

(21) 申请号 202310981391.9

C07K 16/08 (2006.01)

(22) 申请日 2016.05.23

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2015/079534 2015.05.22 CN

(62) 分案原申请数据

201680029377.7 2016.05.23

(71) 申请人 华辉安健(北京)生物科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区生命科学园医  
科路9号院5号楼7-8层

(72) 发明人 隋建华 李丹 李文辉

(74) 专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理  
有限公司 11758

专利代理师 景鹏

(51) Int. Cl.

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书2页 说明书21页

序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

抗前-S1 HBV抗体

(57) 摘要

本发明提供特异性结合至前HBV前-S1结构域配体且抑制HBV或HDV感染的人类抗体、结合至对病毒受体接合至关重要的一组氨基酸残基的抗体和这些抗体用于预防或治疗或诊断HBV或HDV感染的用途。

1. 一种编码抗体或其抗原结合片段的核酸分子,其包含:

1) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2中所示;

2) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:5中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:6中所示;

3) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:9中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:10中所示;

4) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:13中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:14中所示;

5) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:17中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:18中所示;

6) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:21中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

7) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:25中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:26中所示;

8) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:29中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

9) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:31中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

10) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:33中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

11) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:35中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

12) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:37中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

13) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:39中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

14) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:41中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

15) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:43中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

16) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:45中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

17) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:47中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:22中所示;

18) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:37中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:49中所示;

19) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:37中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:51中所示;

20) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:37中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:53中所示;

21) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:37中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:55中所示;

22) 编码重链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:37中所示,和编码轻链可变区的核苷酸序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:57中所示。

2. 根据权利要求1所述的核酸分子,进一步包含编码Fc结构域的核苷酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的核酸分子,其中所述抗体或其抗原结合片段在ADCC测定中表现出抗体依赖性细胞介导的细胞毒性活性。

4. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合乙型肝炎病毒表面抗原的前-S1结构域,其中所述抗体或其抗原结合片段与对应于SEQ ID NO:147的位置30、31和33的肽59C中前S1的氨基酸残基D20、P21和F23结合。

5. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述抗体或其抗原结合片段与对应于SEQ ID NO:147的位置30至37的肽59C中前S1的氨基酸残基20-27特异性结合。

6. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述抗体是单克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述抗体是人单克隆抗体。

8. 包含权利要求1至7所述核酸分子的表达载体。

9. 包含权利要求1至7所述核酸分子或权利要求8所述表达载体的宿主细胞。

10. 权利要求1至7所述核酸分子、权利要求8所述表达载体或权利要求9所述宿主细胞在制备用于治疗HBV或HDV感染的药物中的应用。

## 抗前-S1 HBV抗体

[0001] 本发明是申请日为2016年05月23日、申请号为201680029377.7、发明名称为“抗前-S1 HBV抗体”的分案申请。

## 背景技术

[0002] 三分之一以上的世界人口已感染B型肝炎病毒 (HBV), 且240百万人目前受长期感染。HBV感染和相关疾病导致每年约一百万人死亡。

[0003] HBV的表面抗原由大 (L)、中 (M) 和小 (S) 蛋白构成。与仅具有S结构域的S蛋白相比, L和M蛋白在其N末端具有额外结构域。L含有前-S1, 前-S2和S结构域; M含有前-S2和S结构域; S蛋白仅含S结构域。L蛋白中的前-S1结构域是在人类肝细胞表面上表达的HBV受体的靶分子, 且业内已报道针对HBV的前-S1结构域的抗体, 例如瓦特史 (Watashi) 等人, 国家分子科学杂志 (Int. J. Mol. Sci.) 2014, 15, 2892-2905, 参考文献22-27。相关文献包括W02013159243A1中的HBV受体、US 7115723中的来自小鼠杂交瘤的人类化抗体KR127和US 7892754中的前-S1肽的描述。

## 发明内容

[0004] 本发明提供通过抑制HBV和/或HDV进行免疫活化的方法和组合物。在一个方面中, 本发明提供抗体抗原结合结构域, 其特异性结合HBV前-S1且包含呈选自如下 (a) - (r) 的组合的互补决定区 (CDR) 1、CDR2和CDR3, 其中衍生出CDR组合的抗体 (Ab)、重链 (HC) 或轻链 (LC) 和CDR命名系统 (卡巴 (Kabat)、IMGT或复合系统) 显示于第一列中, 且粗体文字中的残基是卡巴系统, 且加下划线的残基是IMGT系统:

[0005] 独特HBV前-S1特异性抗体的HCDR

| MAbs    | CDR1                       | CDR2                      | CDR3                       |
|---------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| m36 -HC | <u>GFTFDDYAMH</u>          | <u>GISWNSGSI</u> GYADSVKG | AKTSYGGAFDI                |
|         | K: SEQ ID NO:59, res. 6-10 | K: SEQ ID NO:60           | K: SEQ ID NO:61, res. 3-11 |
|         | I: SEQ ID NO:59, res. 1-8  | I: SEQ ID NO:60, res. 2-9 | I: SEQ ID NO:61            |
|         | C: SEQ ID NO:59            | C: SEQ ID NO:60           | C: SEQ ID NO:61            |
| m36 -LC | SGNTSNIGSYAY               | <u>DNNQRPS</u>            | <u>ATWDDSLNGPV</u>         |
|         | K: SEQ ID NO:62            | K: SEQ ID NO:63           | K: SEQ ID NO:64            |
|         | I: SEQ ID NO:62, res. 4-11 | I: SEQ ID NO:63, res. 1-3 | I: SEQ ID NO:64            |
|         | C: SEQ ID NO:62            | C: SEQ ID NO:63           | C: SEQ ID NO:64            |
| 71 -HC  | <u>GYTTGYYIH</u>           | <u>RINPNSGGTN</u>         | <u>AREGRGGMDV</u>          |
|         | K: SEQ ID NO:65, res. 5-9  | K: SEQ ID NO:66           | K: SEQ ID NO:67, res. 3-10 |

[0006]

[0007]

|         |                            |                            |                            |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|         | I: SEQ ID NO:65, res. 1-7  | I: SEQ ID NO:66            | I: SEQ ID NO:67            |
|         | C: SEQ ID NO:65            | C: SEQ ID NO:66            | C: SEQ ID NO:67            |
| 71-LC   | <u>RSSQSLHNSNGYNY</u>      | <u>LGSNRAS</u>             | <u>MOGLQFPIT</u>           |
|         | K: SEQ ID NO:68, res. 1-12 | K: SEQ ID NO:69            | K: SEQ ID NO:70            |
|         | I: SEQ ID NO:68, res. 4-14 | I: SEQ ID NO:69            | I: SEQ ID NO:70            |
|         | C: SEQ ID NO:68            | C: SEQ ID NO:69            | C: SEQ ID NO:70            |
| 76-HC   | <u>GFTFSSYAMH</u>          | <u>VISYDGSNKYYADSVKG</u>   | <u>ASGAFDI</u>             |
|         | K: SEQ ID NO:71, res. 6-10 | K: SEQ ID NO:72            | K: SEQ ID NO:73, res. 3-7  |
|         | I: SEQ ID NO:71, res. 1-8  | I: SEQ ID NO:72, res. 2-9  | I: SEQ ID NO:73            |
|         | C: SEQ ID NO:71            | C: SEQ ID NO:72            | C: SEQ ID NO:73            |
| 76-LC   | <u>RSSHSLVYSDGNTYLS</u>    | <u>KVSNRDF</u>             | <u>MOGTHWPGT</u>           |
|         | K: SEQ ID NO:74            | K: SEQ ID NO:75            | K: SEQ ID NO:76            |
|         | I: SEQ ID NO:74, res. 4-14 | I: SEQ ID NO:75, res. 1-3  | I: SEQ ID NO:76            |
|         | C: SEQ ID NO:74            | C: SEQ ID NO:75            | C: SEQ ID NO:76            |
| T47-HC  | <u>GDSVSSNSVAWN</u>        | <u>RTYRSKWYNDYAVSVKS</u>   | <u>ARADGSRGGGYDO</u>       |
|         | K: SEQ ID NO:77, res. 6-12 | K: SEQ ID NO:78            | K: SEQ ID NO:79, res. 3-13 |
|         | I: SEQ ID NO:77, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:78, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:79            |
|         | C: SEQ ID NO:77            | C: SEQ ID NO:78            | C: SEQ ID NO:79            |
| T47-LC  | <u>KSSQSILYRSNNKNYLA</u>   | <u>WASTRES</u>             | <u>QQYYTTPQT</u>           |
|         | K: SEQ ID NO:80            | K: SEQ ID NO:81            | K: SEQ ID NO:82            |
|         | I: SEQ ID NO:80, res. 4-15 | I: SEQ ID NO:81, res. 1-3  | I: SEQ ID NO:82, res. 1-8  |
|         | C: SEQ ID NO:80            | C: SEQ ID NO:81            | C: SEQ ID NO:82            |
| m1Q-HC  | <u>GFTFSSYAMH</u>          | <u>VISYDGSNKYYVDSVKG</u>   | <u>ARSTYGMDV</u>           |
|         | K: SEQ ID NO:83, res. 6-10 | K: SEQ ID NO:84            | K: SEQ ID NO:85, res. 3-9  |
|         | I: SEQ ID NO:83, res. 1-8  | I: SEQ ID NO:84, res. 2-9  | I: SEQ ID NO:85            |
|         | C: SEQ ID NO:83            | C: SEQ ID NO:84            | C: SEQ ID NO:85            |
| m1Q-LC  | <u>RSSQSLVHSDGNTYLN</u>    | <u>KVSNRDS</u>             | <u>MOGTHWWT</u>            |
|         | K: SEQ ID NO:86            | K: SEQ ID NO:87            | K: SEQ ID NO:88            |
|         | I: SEQ ID NO:86, res. 4-14 | I: SEQ ID NO:87, res. 1-3  | I: SEQ ID NO:88            |
|         | C: SEQ ID NO:86            | C: SEQ ID NO:87            | C: SEQ ID NO:88            |
| 2H5-HC  | <u>GDSVSSKSAAWN</u>        | <u>RTYRSKWHNDYAVS</u>      | <u>ARGQMGALDV</u>          |
|         | K: SEQ ID NO:89, res. 6-12 | K: SEQ ID NO:90            | K: SEQ ID NO:91, res. 3-10 |
|         | I: SEQ ID NO:89, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:90, res. 3-10 | I: SEQ ID NO:91            |
|         | C: SEQ ID NO:89            | C: SEQ ID NO:90            | C: SEQ ID NO:91            |
| 2H5-LC  | <u>SGSSNIGSYVYVY</u>       | <u>GNNQRP</u>              | <u>QSYDSSLSGVI</u>         |
|         | K: SEQ ID NO:92            | K: SEQ ID NO:93            | K: SEQ ID NO:94            |
|         | I: SEQ ID NO:92, res. 4-11 | I: SEQ ID NO:93, res. 1-3  | I: SEQ ID NO:94            |
|         | C: SEQ ID NO:92            | C: SEQ ID NO:93            | C: SEQ ID NO:94            |
| m150-HC | <u>GFTFSSYAMH</u>          | <u>VISYDGSNKYYADSVKG</u>   | <u>ARLVAGRSAFDI</u>        |
|         | K: SEQ ID NO:95, res. 6-10 | K: SEQ ID NO:96            | K: SEQ ID NO:97, res. 3-12 |
|         | I: SEQ ID NO:95, res. 1-8  | I: SEQ ID NO:96, res. 2-9  | I: SEQ ID NO:97            |
|         | C: SEQ ID NO:95            | C: SEQ ID NO:96            | C: SEQ ID NO:97            |
| m150-LC | <u>RASQSVSSNLA</u>         | <u>GASTRAT</u>             | <u>QQYNNWPPIT</u>          |

|  |                           |                           |                  |
|--|---------------------------|---------------------------|------------------|
|  | K: SEQ ID NO:98           | K: SEQ ID NO:99           | K: SEQ ID NO:100 |
|  | I: SEQ ID NO:98, res. 4-9 | I: SEQ ID NO:99, res. 1-3 | I: SEQ ID NO:100 |
|  | C: SEQ ID NO:98           | C: SEQ ID NO:99           | C: SEQ ID NO:100 |

[0008] 衍生自2H5 VH链改组文库的抗体的HCDR

| MAbs     | HCDR1                       | HCDR2                       | HCDR3                      |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 编号 4 VH  | <u>GDSVSSKSVTWN</u>         | <u>RTYYRSKWFNDYAVS</u>      | <u>ARAKMGGM DV</u>         |
|          | K: SEQ ID NO:101, res 6-12  | K: SEQ ID NO:102            | K: SEQ ID NO:103, res 3-10 |
|          | I: SEQ ID NO:101, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:102, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:103           |
|          | C: SEQ ID NO:101            | C: SEQ ID NO:102            | C: SEQ ID NO:103           |
| 编号 31 VH | <u>GDSVSSNSAAWN</u>         | <u>RTYYRSKQWYNDYAVS</u>     | <u>TRQSWHGMEV</u>          |
|          | K: SEQ ID NO:104, res 6-12  | K: SEQ ID NO:105            | K: SEQ ID NO:106, res 3-10 |
|          | I: SEQ ID NO:104, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:105, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:106           |
|          | C: SEQ ID NO:104            | C: SEQ ID NO:105            | C: SEQ ID NO:106           |
| 编号 32 VH | <u>GDSVSSNSAAWN</u>         | <u>RTYYRSKQWYNDYAVS</u>     | <u>ARSIATGTDY</u>          |
|          | K: SEQ ID NO:107, res 6-12  | K: SEQ ID NO:108            | K: SEQ ID NO:109, res 3-10 |
|          | I: SEQ ID NO:107, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:108, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:109           |
|          | C: SEQ ID NO:107            | C: SEQ ID NO:108            | C: SEQ ID NO:109           |
| 编号 69 VH | <u>GDSVSSSRATWN</u>         | <u>RTYYRSKWFNDYAVS</u>      | <u>ARAKMGGM DV</u>         |
|          | K: SEQ ID NO:110, res 6-12  | K: SEQ ID NO:111            | K: SEQ ID NO:112, res 3-10 |
|          | I: SEQ ID NO:110, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:111, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:112           |
|          | C: SEQ ID NO:110            | C: SEQ ID NO:111            | C: SEQ ID NO:112           |
| A14 VH   | <u>GDSVSSNSAAWN</u>         | <u>RTYYRSKQWYNDYAVS</u>     | <u>ARGTRWGMDV</u>          |
|          | K: SEQ ID NO:113, res 6-12  | K: SEQ ID NO:114            | K: SEQ ID NO:115, res 3-10 |
|          | I: SEQ ID NO:113, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:114, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:115           |
|          | C: SEQ ID NO:113            | C: SEQ ID NO:114            | C: SEQ ID NO:115           |
| A21 VH   | <u>GDSVSSNSAAWN</u>         | <u>RTYYRSKQWYNDYAVS</u>     | <u>ARAKVYGV DV</u>         |
|          | K: SEQ ID NO:116, res 6-12  | K: SEQ ID NO:117            | K: SEQ ID NO:118, res 3-10 |
|          | I: SEQ ID NO:116, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:117, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:118           |
|          | C: SEQ ID NO:116            | C: SEQ ID NO:117            | C: SEQ ID NO:118           |
| B103 VH  | <u>GDSVSSKSATWN</u>         | <u>RTYYRSRW FNDYAVS</u>     | <u>ARGNMGAMDV</u>          |
|          | K: SEQ ID NO:119, res 6-12  | K: SEQ ID NO:120            | K: SEQ ID NO:121, res 3-10 |
|          | I: SEQ ID NO:119, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:120, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:121           |
|          | C: SEQ ID NO:119            | C: SEQ ID NO:120            | C: SEQ ID NO:121           |
| B129 VH  | <u>GDRVSSNR AAWN</u>        | <u>RTYYRSQWYNDYAVS</u>      | <u>ARGTAMG-DA</u>          |
|          | K: SEQ ID NO:122, res 6-12  | K: SEQ ID NO:123            | K: SEQ ID NO:124, res 3-9  |
|          | I: SEQ ID NO:122, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:123, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:124           |
|          | C: SEQ ID NO:122            | C: SEQ ID NO:123            | C: SEQ ID NO:124           |
| B139 VH  | <u>GDSVSSNSAAWN</u>         | <u>RTYYRSKQWYNDYAVS</u>     | <u>ARQASNGFDI</u>          |
|          | K: SEQ ID NO:125, res 6-12  | K: SEQ ID NO:126            | K: SEQ ID NO:127, res 3-10 |
|          | I: SEQ ID NO:125, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:126, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:127           |
|          | C: SEQ ID NO:125            | C: SEQ ID NO:126            | C: SEQ ID NO:127           |
| B172 VH  | <u>GDSVSSNSAAWN</u>         | <u>RTYYRSKQWYNDYAVS</u>     | <u>ARQGTGFDY</u>           |

|  |                             |                             |                            |
|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|  | K: SEQ ID NO:128, res 6-12  | K: SEQ ID NO:129            | K: SEQ ID NO:130, res 3-10 |
|  | I: SEQ ID NO:128, res. 1-10 | I: SEQ ID NO:129, res. 2-10 | I: SEQ ID NO:130           |
|  | C: SEQ ID NO:128            | C: SEQ ID NO:129            | C: SEQ ID NO:130           |

[0010] 衍生自A14 VL链改组文库的抗体的HCDR

[0011]

| MAbs  | LCDR1                  | HCDR2          | HCDR3              |
|-------|------------------------|----------------|--------------------|
| 编号8VH | <u>SGSSSNIGNYYVSWY</u> | <u>DNAKRPS</u> | <u>QSYDNSLSGLV</u> |

|            |                          |                         |                 |
|------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|
|            | K:SEQ ID NO:131          | K:SEQ ID NO:132         | K:SEQ ID NO:133 |
|            | I:SEQ ID NO:131,res.4-11 | I:SEQ ID NO:132,res.1-3 | I:SEQ ID NO:133 |
|            | C:SEQ ID NO:131          | C:SEQ ID NO:132         | C:SEQ ID NO:133 |
| 编号20VL     | SGTSSNIGSKYVYWY          | TNDQRPS                 | QSYDSSLRAVV     |
|            | K:SEQ ID NO:134          | K:SEQ ID NO:135         | K:SEQ ID NO:136 |
|            | I:SEQ ID NO:134,res.4-11 | I:SEQ ID NO:135,res.1-3 | I:SEQ ID NO:136 |
|            | C:SEQ ID NO:134          | C:SEQ ID NO:135         | C:SEQ ID NO:136 |
| 编号20-m1 VL | SGTSSNIGSFYVYWY          | TNDQRPS                 | QSYDSSLRAVV     |
|            | K:SEQ ID NO:137          | K:SEQ ID NO:138         | K:SEQ ID NO:139 |
|            | I:SEQ ID NO:137,res.4-11 | I:SEQ ID NO:138,res.1-3 | I:SEQ ID NO:139 |
|            | C:SEQ ID NO:137          | C:SEQ ID NO:138         | C:SEQ ID NO:139 |
| 编号20-m2 VL | SGTSSNIGSFYVYWY          | TNDQRPS                 | QSYDSSLRAVV     |
|            | K:SEQ ID NO:140          | K:SEQ ID NO:141         | K:SEQ ID NO:142 |
|            | I:SEQ ID NO:140,res.4-11 | I:SEQ ID NO:141,res.1-3 | I:SEQ ID No:142 |
|            | C:SEQ ID NO:140          | C:SEQ ID NO:141         | C:SEQ ID NO:142 |
| 编号20-m3 VL | SGTSSNIGSYVYVYWY         | TNDQRPS                 | QSYDSSIRAVV.    |
|            | K:SEQ ID NO:143          | K:SEQ ID NO:144         | K:SEQ ID NO:145 |
|            | I:SEQ ID NO:143,res.4-11 | I:SEQ ID NO:144,res.1-3 | I:SEQ ID NO:145 |
|            | C:SEQ ID NO:143          | C:SEQ ID NO:144         | C:SEQ ID NO:145 |

[0012] 在实施例中,本发明提供抗体抗原结合结构域,其包含包括CDR1、CDR2和CDR3组合的重链可变区(Vh)和包括CDR1、CDR2和CDR3组合的轻链可变区(Vl),或包含选自以下的重链可变区(Vh)和/或轻链可变区(Vl):m36、71、76、T47、m1Q、2H5、m150;和4、31、32、69、A14、A21、B103、B129、B139、B172;和8、20、20-m1、20-m2、20-m3。

[0013] 在实施例中,抗体抗原结合结构域特异性结合前-S1的aa11-28或aa19-25。

[0014] 本发明还提供抗体、具体来说单克隆抗体和包含标的结合结构域的F(ab)或F(ab)<sub>2</sub>。

[0015] 本发明还提供编码标的抗原结合结构域的新颖多核苷酸(例如cDNA和表达载体)和包含所述多核苷酸的细胞以及包含所述细胞的非人类动物。多核苷酸可操作连接至异源转录调控序列用于表达,且可纳入所述载体、细胞等中。

[0016] 本发明提供使用标的结构域治疗HBV或HDV感染、或诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的方法,其包含将结构域给予经测定患有HBV或HDV感染、已暴露于HBV或HDV、具有高HBV或HDV暴露或感染风险、需要前-S1结构域拮抗作用、或其它有需要的个人。本发明进一步提供标的组合物的用途,其用来制造任选地与病毒复制抑制剂结合用于HBV或HDV感染的药剂。

[0017] 本发明包括所列举具体实施例的所有组合。根据下文所给出的详细描述将明了其它实施例和本发明应用的全部范围。然而,应理解,尽管详细描述和特定实例指示本发明的优选实施例,但其仅以说明方式给出,这是因为所属领域技术人员根据此详细描述将明了本发明精神和范围内的各种改变和修改。出于所有目的,本文所引用的所有公开案、专利和专利申请案(包括其中的引用)的全文均以引用方式并入本文中。

## 附图说明

[0018] 图1.来自2H5 VH链改组文库选择的10种抗体对HBV的中和。

## 具体实施方式

[0019] 除非上下文另外指示,否则术语“抗体”是在最广泛意义上使用且明确涵盖抗体(包括全长单克隆抗体)和抗体片段,只要其识别HBV/HDV前-S1或以其它方式抑制HBV/HDV即可。抗体分子通常为单特异性,但也可描述为个体特异性(idiospecific)、异源特异性(heterospecific)或多特异性。抗体分子借助特异性结合位点结合至特异性抗原决定簇或抗原表位。“抗体片段”包含全长抗体的一部分,通常为其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例可包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双价抗体;线性抗体;单链抗体分子;和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0020] 天然和工程改造的抗体结构为业内所熟知,例如斯绰(Strohl)等人,治疗抗体的工程改造:推动医药工业中增长最快的领域的当前和将来进步(Therapeutic antibody engineering:Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry),伍德海德出版社生物学系列(Woodhead Publishing Series in Biomedicine)第11期,2012年10月;霍利格(Holliger)等人,自然生物技术(Nature Biotechnol) 23,1126-1136 (2005);查尔斯(Chames)等人,英国药理学杂志(Br J Pharmacol.) 2009年5月;157(2):220-233。

[0021] 单克隆抗体(mAb)可通过所属领域技术人员已知的方法获得。参见例如科勒(Kohler)等人(1975);US4,376,110;奥苏贝尔(Ausubel)等人(1987-1999);哈洛(Harlow)等人(1988);和考利甘(Colligan)等人(1993)。本发明的mAb可为任一免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgE、IgA和其任一子类。产生mAb的杂交瘤可在试管内或在活体内培养。MAb的高效价可在活体内产生中获得,其中将来自个别杂交瘤的细胞腹膜内注射至小鼠(例如降植烷致敏(pristine-primed)的Balb/c小鼠)中以产生含有高浓度的所需mAb的腹水。可使用所属领域技术人员所熟知的柱色谱方法从所述腹水或从自培养物上清液提纯同种型IgM或IgG的mAb。

[0022] “分离的多核苷酸”是指与在天然状态下侧接其的序列分离的多核苷酸区段或片段,例如从正常情况下与所述片段邻接的序列(例如在其中天然存在所述片段的基因组中与所述片段邻接的序列)脱离的DNA片段。因此,所述术语包括例如重组DNA,其纳入载体中、纳入自主复制质粒或病毒中或纳入原核生物或真核生物的基因组DNA中,或以独立于其它序列的单独分子(例如,以cDNA或通过PCR或限制酶消化产生的基因组或cDNA片段)存在。其还包括作为编码其它多肽序列的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0023] “构筑体”意指衍生自任一来源的能够进行基因组整合或自主复制的任何重组多核苷酸分子,例如质粒、粘粒、病毒、自主复制多核苷酸分子、噬菌体或线性或环状单链或双链DNA或RNA多核苷酸分子,包含其中一或多个多核苷酸分子以功能操作方式连接(即可操作连接)的多核苷酸分子。重组构筑体通常将包含本发明的多核苷酸,其可操作连接至转录起始调控序列,所述转录起始调控序列引导多核苷酸在预期宿主细胞中的转录。可采用异源和非异源(即内源)启动子来引导本发明核酸的表达。

[0024] “载体”是指可用于转化目的、即将异源DNA引入宿主细胞中的任一重组多核苷酸

构筑体。一类载体为“质粒”，其是指其它DNA区段可连接至其中的环状双链DNA环。另一类载体为病毒载体，其中其它DNA区段可连接至病毒基因组中。某些载体能够在已引入其的宿主细胞中进行自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体）。其它载体（例如，非游离型哺乳动物载体）可在引入宿主细胞中时整合至宿主细胞的基因组中，并由此与宿主基因组一同复制。另外，某些载体能够引导与其可操作连接的基因的表达。所述载体在本文中称为“表达载体”。

[0025] 如本文所用“表达载体”是指在转化、转染或转导至宿主细胞中时能够复制和表达所关注基因的核酸分子。表达载体包含一或多种表型可选择标记物和复制起点以确保维持载体且（若需要）提供宿主内的扩增。表达载体进一步包含启动子以驱动细胞内的多肽表达。适宜表达载体可为衍生自例如pBR322或多个市售pUC质粒的质粒。其它表达载体可衍生自噬细菌体、噬菌粒或粘粒表达载体。

[0026] 实例

[0027] 人类单克隆抗体阻断B型和D型肝炎病毒的病毒感染在此处揭示可阻断HDV和HBV病毒感染的人类单克隆抗体。这些抗体是自噬菌体展示抗体文库鉴别而来，所述文库是使用来自93个健康供体的末梢血单核细胞建立。通过使用HBV包膜蛋白的前-S1结构域作为靶来选择和筛选抗体文库，鉴别出具有针对HBV和HDV感染的中和活性的人类单克隆抗体组。其中，2H5显示针对HBV和HDV感染的最好的中和活性。2H5与其靶（前-S1结构域的8个氨基酸）的复合物的共晶体结构已解出。通过链改组方法最佳化2H5，研发出甚至更强效的中和抗体。这些抗体识别与2H5相似的表位且所述表位在HBV的不同基因型中高度保守。在带有人类化NTCP的小鼠中测试实例性抗体A14并为小鼠提供全面保护免于HDV感染，且动物研究确认针对HBV感染的保护。

[0028] 抗原靶：前-S1肽。使用衍生自HBV的前-S1结构域的两个肽作为抗原用于选择。其是通过中科亚光(Scilight-peptide)（中国北京）以大于95%的纯度合成。NC36b：在其C末端具有生物素修饰的包含HBV L蛋白的前-S1结构域的残基4-38的肽。m47b：具有C末端生物素修饰和N末端肉豆蔻酰化修饰的包含前-S1结构域的氨基酸2-48的肉豆蔻酰化脂肽。

|        |            |                                                                  |
|--------|------------|------------------------------------------------------------------|
| [0029] | 前-S1(2-48) | GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPKNKDHWPEANQVG (SEQ ID NO:146) |
|        | m47b       | Myr-G.....K-生物素                                                  |
|        | NC36b      | N.....K-生物素                                                      |

[0030] 基于修改的噬菌体展示抗体技术[1、2]产生针对前-S1肽的人类单克隆抗体。

[0031] 噬菌体展示抗体文库。自93个健康供体的末梢血单核细胞(PBMC)构筑人类非免疫scFv(单链可变片段)抗体文库。所述文库具有总共 $1.1 \times 10^{10}$ 个成员的大小。

[0032] 选择和筛选噬菌体抗体文库。自文库制备在其表面上表达scFv的噬菌体粒子(噬菌体-scFv)且将其用于选择针对合成NC36b和m47b的scFv。在抗生蛋白链菌素偶联的磁M-280 Dynabeads® (生命技术(Life Technologies))上捕获各肽，且然后分别与 $5 \times 10^{12}$ 个自文库制备的噬菌体粒子一起培育。对于每一肽，进行两轮选择。对于每轮选择，为获得高亲和力和抗体，使捕获至磁珠上的肽量最佳化且施加大量洗涤步骤。另外，为自磁珠回收高亲和

力结合物且增加所回收噬菌体-scFv的多样性,使用两种洗脱方法,包括肽竞争洗脱和常规碱性三乙醇胺溶液。随后,挑选且拯救总共约2000个单克隆以在细菌培养物上清液中产生噬菌体-scFv,并通过酶联免疫吸附分析(ELISA)筛选与m47b和/或NC36b的特异性结合。在450nm下以 $>1.0$ 的光密度值结合至m47b和/或NC36b的克隆评分为阳性,而阴性克隆给出 $<0.1$ 的值。对于m47b和/或NC36b特异性结合克隆,对重链(VH)和轻链(VL)可变区的基因进行测序且比对其相应氨基酸序列以消除重复克隆并鉴别出具有不同序列的抗体以供进一步表征。鉴别出总共109个具有独特序列的克隆。

[0033] 进一步表征具有独特抗体序列的抗体以鉴别出最好的候选抗体.以经提纯噬菌体-scFv粒子原样产生具有独特序列的抗体克隆或将其转化成scFv-Fc微小抗体或全长人类IgG1,且然后通过ELISA测试其结合活性以及细胞培养物中的HBV和HDV中和活性。通过这些分析,基于抗体的结合活性和中和活性对其分级。选择具有最高中和活性的顶级抗体来进一步研发。

[0034] 制备经提纯噬菌体-scFv用于ELISA或中和分析.通过PEG/NaCl使10-30mL细菌培养物的上清液中的噬菌体-scFv沉淀且然后通过光谱仪量化。基于正规化至相同浓度的经连续稀释的噬菌体-Ab的剂量-反应评估不同噬菌体-scFv对抗原结合或中和病毒感染的活性。

[0035] 制备scFv-Fc微小抗体.将来自噬菌体-scFv表达载体的scFv编码基因亚克隆至在scFv的C末端含有人类IgG1 Fc片段的表达载体中。为产生scFv-Fc,用scFv-Fc表达质粒瞬时转染293F(生命技术)或293T细胞(ATCC),在转染后72小时,收获细胞培养物上清液且通过蛋白A亲和色谱(蛋白A Sepharose CL-4B,GE医疗(GE Healthcare))提纯scFv-Fc。

[0036] 制备全长IgG1抗体.将scFv的VH和VL编码序列单独亚克隆至抗体重链(HC)表达载体和轻链(LC)表达载体中。为制备IgG1抗体,用1:1比率的两种表达质粒(HC+LC质粒)瞬时共转染293F或293T细胞。在转染后72小时,收获细胞培养物上清液以通过蛋白A亲和色谱提纯IgG1。

[0037] ELISA分析.将磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的 $5\mu\text{g/mL}$ 抗生蛋白链菌素(西格玛(Sigma))以 $100\mu\text{L/孔}$ 涂布于U形底96孔板(Nunc, MaxiSorp™)中,在 $4^{\circ}\text{C}$ 下过夜或在 $37^{\circ}\text{C}$ 下保持1小时。然后通过 $30^{\circ}\text{C}$ 下培育0.5-1小时将 $2\mu\text{g/mL}$  (370nM)的m47b或NC36b肽以 $100\mu\text{L/孔}$ 捕获至板上。对于基于噬菌体-scFv的ELISA,将含有2%脱脂奶粉的PBS中的经连续稀释的非噬菌体-scFv以 $100\mu\text{L/孔}$ 添加至每孔中。通过添加HRP偶联的小鼠抗M13抗体(GE医疗)检测特异性结合的噬菌体-scFv且在 $30^{\circ}\text{C}$ 下培育30min。在每一培育步骤之间,用PBST溶液(含有0.05% Tween20的PBS)以 $200\mu\text{L/孔}$ 将ELISA板洗涤6次。在HRP偶联的抗体培育后,通过在 $30^{\circ}\text{C}$ 下与TMB底物(西格玛)一起培育5-10min使ELISA信号显影且然后用 $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ 以 $25\mu\text{L/孔}$ 终止反应。通过微量板读数器(伯乐(Bio-Rad))读取450nm下的吸光度。对于基于scFv-Fc或IgG1的ELISA,所述方法与上文针对噬菌体-scFv所描述基本上相同,只是结合抗体是通过HRP偶联的小鼠抗人类IgG Fc抗体(西格玛)来检测。

[0038] 制备HBV和HDV病毒.HBV和HDV是如先前所描述产生[3]。HDV.简单来说,在CMV启动子控制下用从头合成的HDV cDNA构筑含有基因型I病毒(基因库登录号:AF425644.1)的 $1.0\times\text{HDV cDNA}$ 的头至尾三聚体的质粒以产生HDV RNP。使用含有HBV(基因型D,基因库登录号:U95551.1)的核苷酸2431~1990的pUC18质粒在内源HBV启动子控制下表达HBV包膜蛋白。如

苏瑞 (Sureau) 等人先前所描述 [4] 通过转染 Huh-7 中的质粒产生 HDV 病毒体。收获经转染的细胞培养物上清液且直接用于 HDV 中和分析。HBV 通过在 CMV 启动子控制下用含有 1.05 个拷贝的 HBV 基因组的质粒转染 Huh-7 细胞产生 HBV 基因型 B、C 和 D 病毒。基因型 B 或 C HBV 病毒还来自 HBV 患者的血浆。

[0039] HBV 和 HDV 中和分析。中和分析是如先前所描述 [3、5] 并在少量修改后进行。将 HepG2-hNTCP 细胞 (稳定表达 HBV 和 HDV 受体 hNTCP (人类牛磺胆酸钠共转运多肽) 的 HepG2 细胞系) 用于这些分析中。在 48 孔板中将 HepG2-hNTCP 细胞于 PMM 培养基 [3] 中培养 12-24 小时, 然后进行病毒感染。在 5% PEG8000 存在下用 HepG2-hNTCP 细胞接种混有不同形式的抗体: 噬菌体-scFv、scFv-Fc 或 IgG1 的约 500 基因组当量倍数 (multiplicities of genome equivalents, mge) 的 HDV 或 200 mge 的 HBV 且培育 16 小时。然后用培养基将细胞洗涤三次且维持于 PMM 中。每 2-3 天将细胞培养基更换为新鲜 PMM 培养基。对于 HDV 感染, 在感染后 (dpi) 7 天, 在室温下用 100% 甲醇将 HDV 感染的细胞固定 10 min, 用 5  $\mu$ g/mL 的 FITC 偶联的 4G5 (小鼠抗 HDV  $\delta$  抗原单克隆抗体) 对细胞内  $\delta$  抗原染色且用 DAPI 对核染色。通过荧光显微镜 (尼康 (Nikon)) 收集影像。基于染色的  $\delta$  抗原量和强度确定针对 HDV 的中和活性。对于 HBV 感染, 在 dpi 3、5 和 7, 收集培养物上清液且用商业 ELISA 试剂盒 (万泰 (Wantai), 中国北京) 测试 HBV 分泌性病毒抗原 HBsAg 和/或 HBeAg。使用 HBeAg 和/或 HBsAg 的含量来评估抗体的 HBV 中和活性。

[0040] 通过上述 ELISA 和 HBV 中和分析, 鉴别出一些顶级抗体, 其显示与 NC36b 以及 m47b 和 47b (所述肽与 m47b 类似但未肉豆蔻酰化且显示 HBV 中和活性) 的特异性结合。

[0041] 在这些顶级抗体中, m36、2H5 和 m1Q 是显示最好 HBV (基因型 D) 中和活性的前三种抗体。m36 自进一步测试排除, 此乃因其在转化成全长 IgG1 时显示减少的表达。进一步比较 2H5 和 m1Q 的 HDV 中和活性, 2H5 显示较好的中和 HDV 感染的活性。基于与肽的高结合活性和针对 HBV 和 HDV 的强效中和活性, 选择 2H5 来进一步研发。另外, 2H5 显示大于先前公开的前-S1 肽抗体 KR127 [6-8] 的 HBV 和 HDV 中和活性。在 HBV 感染分析中, 2H5-IgG1 比 KR127 强效 11 倍, 如通过  $IC_{50}$  (引起 50% HBV 感染抑制的抗体浓度) 所指示; 2H5 还显示对 HDV 感染分析的较大抑制作用。

[0042] 映射 2H5 抗体的结合表位。为映射 2H5 的前-S1 区域上的表位, 合成涵盖前-S1 结构域的不同区域的短肽且通过竞争 ELISA 分析测试其竞争 2H5 与 m47b 结合的能力。可竞争结合的最短肽是 LN16 肽 (对应于 HBV L 蛋白 (基因型 D) 的前-S1 结构域的 NT 氨基酸 (aa) 11-28), 此指示 2H5 的结合表位位于此区域内。LD15 和 LA15 肽还显示一定程度的竞争活性, 但水平低于 LN16。由三种肽 LN16、LD15 和 LA15 共享的共用氨基酸是前-S1 的 aa19-25。因此测试各自在 19 位、20 位、22 位和 23 位携带单丙氨酸突变的 LN16 肽 LN16-L19A、LN16-D20A、LN16-P21A、LN16-F23A 的竞争活性, 结果显示其均具有降低的竞争活性 (LN16-L19A) 或完全丢失此活性 (LN16-D20A、LN16-P21A、LN16-F23A), 此指示这些氨基酸对前-S1 与 2H5 结合至关重要。

[0043] 2H5 表位在大多数 HBV 基因型中高度保守。8 个 HBV 基因型的前-S1 肽的序列比对显示, 表位在其中高度保守。主要可变氨基酸处于 24 位: 基因型 A 和 C 中的甘氨酸、基因型 D 和其它基因型中的赖氨酸或精氨酸。为测试此氨基酸变化是否会影响 2H5 与前-S1 肽的结合, 合成含有 24 位精氨酸的 NC36b 肽且通过 ELISA 测试与 2H5 的结合。结果显示, 此氨基酸变化对结合仅具有最小作用。此与 2H5 中和基因型 D 的 HBV 和携带 HBV 基因型 D 包膜的 HDV 的 HBV 和 HDV 病

毒中和结果一致。

[0044] 2H5 scFv和前-S1肽复合物的结构表征.还测定与前-S1肽59C复合的2H5(呈scFv片段形式,所述片段在其N末端与His<sub>6</sub>标签融合)的晶体结构。59C的氨基酸序列对应于基因型C的前-S1的aa-10~48:

[0045] GGWSSKPRQGSGTNSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP ANQV (SEQ ID NO: 147)。使2H5-scFv和59C在大肠杆菌(E.coli)中共表达。通过使用Ni-NTA琼脂糖珠粒(凯杰(QIAGEN))的固定化金属离子亲和色谱(IMAC)、然后通过使用Superdex S200 10/300柱(GE 医疗)的粒径排阻色谱-HPLC (SEC-HPLC) 将所述复合物提纯为复合物。然后将1μL蛋白质(29mg/mL于10mM Tris-HCl (pH 8.0) 和100mM NaCl中)和1μL含有2.8M乙酸钠的储藏溶液(pH 7.0)混合,使用悬滴蒸汽扩散方法使经提纯的2H5-scFv/59C复合物在20℃下浓缩且结晶。在10天后出现针状晶体。在上海光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility)束线BL17U收集X射线衍射数据且通过HKL2000处理[9]。在2.7 Å分辨率下通过分子置换在相位器[10、11]中使用衍生自贺癌平(Herceptin)-Fab复合物的结构(PDB 3H0T)[12]的VH和VL作为起始模型来确定结构。在Phenix中进一步优化得自分子置换的初始模型[13]且用Coot人工重建[14]。最终模型包括2H5 scFv的220个残基、59C肽的残基20-27。RAMPAGE分析显示,96.71%的残基处于有利区域中且3.29%的残基处于容许区域中[15]。结构揭露2H5 scFv的VH和VL均参与与肽的相互作用。结构中所包括的肽的八个氨基酸是D<sub>20</sub>P<sub>21</sub>A<sub>22</sub>F<sub>23</sub>G<sub>24</sub>N<sub>25</sub>A<sub>26</sub>S<sub>27</sub>。其中,D<sub>20</sub>、P<sub>21</sub>、A<sub>22</sub>、F<sub>23</sub>、A<sub>26</sub>和S<sub>27</sub>引起与2H5的相互作用。三个氨基酸D<sub>20</sub>、P<sub>21</sub>和F<sub>23</sub>对2H5结合引起至关重要的相互作用。

[0046] 通过VH链改组提高2H5亲和力和中和活性。

[0047] 从2H5的VH链改组文库鉴别出前四种抗体。接下来使用链改组来提高2H5的结合亲和力和中和活性,其中固定两个链(VH和VL)中的一个且与另一链谱系组合以产生可针对优异活性进行选择的二级文库。首先,进行VH链改组,其中固定2H5的VL且与VH链的文库配对。构筑两个VH-Lib/2H5VL噬菌体呈现文库。一个文库大小为约 $2 \times 10^8$ ,另一个为约 $9 \times 10^8$ 。通过使用捕获于抗生蛋白链菌素偶联的磁性M-280 Dynabeads® (生命技术)上的肽作为靶,分开选择两个VH-Lib/2H5VL文库,各自一轮。在两个文库的一轮选择结束时,随机挑选总共576个个别克隆且通过ELISA针对与m47b的结合进行筛选。选择ELISA中的阳性克隆且测序。鉴别出10个具有独特VH序列的克隆(表1)且显示等于或强于2H5的与呈噬菌体抗体形式的m47<sub>b</sub>的结合活性。然后将这10个克隆转化成长人类IgG1且通过ELISA验证与m47b的结合,通过试管内中和分析中和HBV(基因型D)(图1)和HDV。基于与m47b结合、中和HBV和HDV的总体活性来选择前四种抗体编号31、编号32、A14和A21。

[0048] 表1. 2H5 VH链改组文库选出的10种抗体的VH序列比对。

[0049]

|         |                                                                                  |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------|
|         | QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY                      |
| 编号 4 VH | .....G.....K.VT.....E..TG.....F                                                  |
| 编号31 VH | .....                                                                            |
| 编号32 VH | .....                                                                            |
| 编号69 VH | .....M.....SR.T.....E..TG.....F                                                  |
| 2H5 VH  | .....G.....K.....H                                                               |
| A14 VH  | .....                                                                            |
| A21 VH  | .....                                                                            |
| B103 VH | .....G.....K..T...V...A.....R.F                                                  |
| B129 VH | .....L.....R...R....V.....Q..                                                    |
| B172 VH | .....                                                                            |
| B139 VH | .....T...V.....                                                                  |
|         |                                                                                  |
|         | NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGKMGGMDVWGQGTITVTVSS<br>(SEQ ID NO:148) |
| 编号 4 VH | .....V.....RG.....A.....                                                         |
| 编号31 VH | .....T.QSWH..E.....                                                              |
| 编号32 VH | .....S.....K.....SIAT.T.Y....L.....                                              |
| 编号69 VH | .....V.....RG.....A.....                                                         |
| 2H5 VH  | .....Q..AL.....                                                                  |
| A14 VH  | .....TRW.....L.....                                                              |
| A21 VH  | .....A.VY.V.....                                                                 |
| B103 VH | .....VK.....S.....I.....N..A.....                                                |
| B129 VH | .....V..S..A...V.....TAM.-.A....L.....                                           |
| B172 VH | .....QGTT.F.Y.....                                                               |
| B139 VH | .....L.....QASN.F.I....M.....                                                    |

[0050] 图1.显示来自2H5 VH链改组文库选择的10种抗体对HBV的中和。通过在不同浓度的抗体存在下与HBV(基因型D)一起培育16小时来感染HepG2-hNTCP细胞。随后洗掉抗体和病毒且继续培养7天,每2天更换细胞培养基。在感染后7天通过ELISA检测分泌性HBeAg。基于HBeAg含量的减少,计算HBV中和活性且表示为受感染细胞在抗体存在下相对于对照(在对照抗体存在下感染的细胞)的变化%。

[0051] 来自2H5 VH链改组文库的4种顶级抗体的表位映射.如上文所描述,使用肽竞争ELISA方法来映射自2H5 VH链改组文库鉴别出的4种顶级抗体的结合表位。使用LN16肽(对应于前-S1结构域的NT氨基酸(aa) 11-28)和LN16肽突变体LN16-L19A、LN16-D20A、LN16-P21A、LN16-F23A来竞争这些抗体与m47b肽的结合。数据揭露,其均具有与2H5相似的肽竞争模式,氨基酸L19、D20、P21和F23对这些抗体结合至关重要。D20和F23对所有抗体最重要,而L19和P21对于不同抗体所起作用稍有不同。

[0052] 进一步表征来自2H5 VH链改组文库的4种顶级抗体.与亲代2H5抗体相比,这些抗

体具有15-20倍以上的HBV(基因型D)中和活性改良。这些抗体的IC<sub>50</sub>为约10-40pM。进一步比较这4种抗体中的代表性抗体A14与B型肝炎免疫球蛋白的中和HBV(基因型D)感染。自具有B型肝炎表面抗原(HBsAg)的高抗体水平的供体的血浆制备HBIG且用作诊所中具有罹患B型肝炎高风险人的暴露后预防。A14显示比HBIG大1000倍以上的中和活性。另外,A14显示针对其它两种HBV基因型B和C的广泛中和活性。基因型B、C和D的IC<sub>50</sub>分别为80pM、30pM和10pM。还检查A14的中和来自HBV感染患者的血浆的6种HBV基因型C病毒。另外,在中和这些病毒方面,A14比HBIG强效至少几百至1000倍。

[0053] A14具有80.2℃的最高Fab熔融温度(T<sub>m</sub>),此反映其可变结构域的最好热稳定性。A14与原始2H5相比稳定约2℃,而其它三种nAb均具有稍低的热稳定性。热稳定性是使用差示扫描量热(DSC)来测量。

[0054] 使用原代人类肝细胞(PHH),还展示A14针对来自HBV患者血浆样品的两个HBV临床株的强效中和活性。一种病毒是基因型B病毒,另一种病毒是基因型C病毒。在整个感染进程中使用商业试剂盒(自动生物诊断有限公司(Autobio Diagnostics Co.,Ltd.))每2天检查分泌至细胞培养物上清液的HBsAg或HBeAg。

[0055] A14与前-S1竞争结合至在细胞上表达的NTCP。A14以剂量依赖性方式有效地与前-S1(FITC标记的前-S1肽:m59)竞争结合至在HepG2细胞上表达的NTCP。

[0056] A14与代表6种不同组织的12个不同细胞系不具交叉反应性。此通过西方墨点(Western blotting)和免疫染色分析来分析。

[0057] A14具有针对在细胞表面上携载其表位的细胞和HBV产生细胞以及受感染细胞的抗体介导的细胞毒性(ADCC)活性。在ADCC分析中,A14的表位在CHO细胞表面上稳定表达,使用HBV产生DE19细胞和受感染的HepG2-hNTCP细胞作为靶细胞。使用人类NK细胞系(表达CD16(V158等位基因)和FcR $\gamma$ 链的NK92-MI)作为效应细胞。在A14或其Fc突变体存在下将效应细胞和靶细胞(E/T)以6:1的比率共培养6小时。通过使用来自普洛麦格(Promega)的LDH释放分析试剂盒测定细胞杀死。ADCC分析显示,A14展现表达表位的CHO细胞、HBV产生细胞和HBV感染的HepG2-hNTCP细胞、而非缺少表位表达的对照细胞、非HBV产生细胞和非HBV感染细胞的强特异性杀死。同时,缺少ADCC活性、但保留相同结合活性的A14 Fc突变体(D265A/N297A)不具ADCC活性。

[0058] ADCC活性为与A14具有相同或相似表位的抗体所共有,所述抗体包括2H5和其VH链改组衍生者:4、31、32、69、A14、A21、B103、B129、B139、B172,和VL链改组克隆编号8、20、20-m1、20-m2、20-m3,且具有不同表位的抗体(例如m36、71、76、T47、m150、m1Q)也可呈现ADCC活性;例如,m1Q也显示ADCC活性,其表位接近前S1上的A14表位的C末端。

[0059] A14保护小鼠免于HDV感染。先前揭露,支持HBV和HDV的病毒进入的限制小鼠NTCP(mNTCP)的分子决定簇位于mNTCP的残基84-87内。当残基84-87被人类NTCP对应物替代时,其可有效地支持细胞培养物中的病毒感染[16]。基于此,已建立可通过使用基因组编辑方法TALEN用hNTCP的相应残基替代mNTCP的残基84-87[17、18]支持HDV感染的小鼠模型(在FVB株背景下)。使用此小鼠模型,测试A14是否可保护小鼠免于HDV感染。以10mg/kg体重向具有mNTCP修饰纯合子的aa84-87的FVB小鼠(出生后9天龄)给予A14 mAb。在mAb给予后1小时,用HDV病毒激发小鼠。在HDV激发后第6天,杀死小鼠且在收集后立即将肝组织收获于液氮中。然后将小鼠肝样品均质化且通过 Trizol®试剂溶解以提取总RNA。用Prime Script

RT-PCR试剂盒(塔克拉(Takara))将RNA样品反转录成cDNA。为量化HDV总RNA(基因组当量)和编辑的NTCP RNA拷贝,使用自20ng RNA获得的cDNA作为模板进行实时PCR分析。在ABI快速7500实时系统仪器(应用生物系统(Applied Biosystems),美国)上进行实时PCR。利用标准曲线计算编辑的NTCP和HDV病毒基因组当量拷贝且使用细胞GAPDH RNA作为内部对照。A14 mAb完全阻断HDV感染,而在对照组中HDV感染达到 $1-10 \times 10^6$ 个拷贝/20ng肝RNA。两组中的小鼠在肝组织中具有相当的NTCP mRNA拷贝。

[0060] A14在预防小鼠模型中保护小鼠免于HBV感染且在治疗小鼠模型中抑制HBV感染。使用移植有人类肝细胞的FRG (Fah-/-Rag2-/-/IL2rg-/-) 三敲除小鼠建立小鼠HBV感染模型[19、20]。FRG小鼠容许移植的人类肝细胞在小鼠肝中复制以形成具有高达98%人类肝细胞的嵌合肝,这是因为所述肝人类化FRG小鼠(FRGC)对HBV感染高度敏感。为测试A14的预防作用,将10只FRGC小鼠分成两组,每组5只小鼠。在HBV病毒激发之前通过每天单次IP给予向A14预防组小鼠注射15mg/kg剂量的A14,同时向对照组中的小鼠注射相同体积的PBS。在第0天时,通过尾静脉向所有小鼠各自注射 $10e9$  GE(基因组当量)HBV。为测试A14的治疗作用,在第0天时通过尾静脉用 $10e9$  GE/小鼠的HBV激发FRGC小鼠,在感染后第5天时,用恩替卡韦(entecavir, ETV)对照或A14或HBIG治疗小鼠。ETV是以0.1mg/kg每天经口给予;A14或HBIG分别是以20mg/kg和72mg/kg (40IU/kg) 每3天通过I.P.注射给予。对于预防和治疗模型二者,每3天自所有小鼠收集血液样品用于测量血清中的HBsAg和HBV DNA效价。在实验结束时杀死小鼠,保存dpi35和肝组织用于HBsAg和HBcAg的免疫组织化学染色(IHC)。A14显示在预防模型中100%保护FRGC小鼠免于HBV感染;其还显示在治疗模型中显著抑制HBV感染。

[0061] 总之,结果明确展示A14 mAb是动物模型中强效的HDV和HBV进入抑制剂。A14mAb可用于替代HBIG来预防HDV和HBV感染。另一方面,小鼠中已建立HBV感染的A14治疗显著抑制HBV感染,另外A14显示针对HBV感染的细胞、而非非HBV感染细胞的特异性ADCC活性。这些结果指示,A14 mAb可与ETV组合治疗长期感染HBV的患者。由于A14阻断新病毒进入宿主细胞中且具有针对受感染细胞的ADCC活性,而ETV抑制病毒复制,所以A14与病毒复制抑制剂(例如ETV、拉米夫定(lamivudine)、阿德福韦(adeфовir)、阿德福韦(tenofovир)、替比夫定(telbivudine)或其它核苷酸和核苷酸类似物(NUC))的组合为患者提供新的治疗和预防选择且可实现较好的病毒血症控制和HBsAg减少。

[0062] 通过VL链改组改良A14亲和力和中和活性。为进一步改良A14活性,制备A14-VL链改组噬菌体展示文库,其中固定A14的VH且与VL链的文库配对。构筑的最终文库(A14VH/VL1ib)具有约 $3 \times 10^8$ 的大小。通过使用捕获于抗生蛋白链菌素偶联的磁M-280Dynabeads®(生命技术)上的m47b肽作为靶,对A14VH/VL1ib文库进行两轮选择。通过ELISA针对与m47b的结合筛选196个克隆。所有克隆均呈阳性,但挑选24个具有最高OD450读数的克隆进行测序。鉴别出2个克隆编号8和编号20,其具有不同于A14的VL的VL链序列。将这两种抗体转化成长人类IgG1且通过ELISA测试与m47b的结合。其均显示强于A14的与m47b的结合活性。在HBV(基因型D)的HBV中和分析中,编号8显示中和HBV感染的5倍改良,而编号20显示与A14相似的活性。编号20的VL(编号20-m1、20-m2、20-m3)的进一步诱变使其中和活性与A14相比改良约3-5倍,达到与编号8相似的水平。展示与A14相比,这些编号20突变体的HDV中和活性升高。因此,这些具有进一步改良活性的A14衍生的抗体可如上文所描述以与A14相似的方式单独或与病毒复制抑制剂组合使用。

## [0063] 参考文献

- [0064] 1. 哈尔森(Harrison), J.L. 等人, 噬菌体抗体文库的筛选(Screening of phage antibody libraries). 酶学方法(Methods Enzymol), 1996.267:第83-109页。
- [0065] 2. 麦卡弗蒂(McCafferty), J. 等人, 噬菌体抗体:展示抗体可变结构域的丝状噬菌体(Phage antibodies:filamentous phage displaying antibody variable domains). 自然(Nature), 1990.348(6301):第552-4页。
- [0066] 3. 颜(Yan), H. 等人, 牛磺胆酸钠共转运多肽是人类B型和D型肝炎病毒的无功能受体(Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus). E生命(Elife), 2012.1:第e00049页。
- [0067] 4. 苏瑞,C等人, 试管内传染性δ型肝炎病毒的产生和用针对B型肝炎病毒前-S抗原的抗体中和(Production of infectious hepatitis delta virus in vitro and neutralization with antibodies directed against hepatitis B virus pre-S antigens). 病毒学杂志(J Virol), 1992.66(2):第1241-5页。
- [0068] 5. 颜,H. 等人, B型和D型肝炎病毒的病毒进入和胆汁盐转运共享牛磺胆酸钠共转运多肽上的共有分子决定簇(Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide). 病毒学杂志, 2014.88(6):第3273-84页。
- [0069] 6. 洪(Hong), H.J. 等人, 黑猩猩中抗前S1人类化抗体对B型肝炎病毒感染的体内中和(In vivo neutralization of hepatitis B virus infection by an anti-preS1 humanized antibody in chimpanzees). 病毒学(Virology), 2004.318(1):第134-41页。
- [0070] 7. 如(Ryu), C.J. 等人, 在用重组前S1肽免疫后产生的针对B型肝炎病毒前S1的小鼠单克隆抗体(Mouse monoclonal antibodies to hepatitis B virus preS1 produced after immunization with recombinant preS1 peptide). 杂交瘤(Hybridoma), 2000.19(2):第185-9页。
- [0071] 8. 奇(Chi), S.W. 等人, 广泛中和抗B型肝炎病毒抗体揭露互补决定区H3开盖机制(Broadly neutralizing anti-hepatitis B virus antibody reveals a complementarity determining region H3 lid-opening mechanism). 美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA), 2007.104(22):第9230-5页。
- [0072] 9. 奥特威诺斯基(Otwinowski), Z. 和W. 米诺(Minor), 以振动模式收集的X射线衍射数据的处理(Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode). 酶学方法, 1997.276:第307-326页。
- [0073] 10. 麦考(McCoy), A.J. 等人, 相位器结晶软件(Phaser crystallographic software). 结晶学应用杂志(J Appl Crystallogr), 2007.40(Pt 4):第658-674页。
- [0074] 11. 麦考, A.J., 通过分子置换与相位器解出蛋白复合物的结构(Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser). 晶体学报D生物晶体学(Acta Crystallogr D Biol Crystallogr), 2007.63(Pt 1):第32-41页。
- [0075] 12. 乔丹(Jordan), J.B. 等人, 海帕西啉重新审视、二硫桥连接性、动力学和结构(Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure). 生物化学杂志(J Biol Chem), 2009.284(36):第24155-67页。

- [0076] 13.阿达穆(Adams),P.D.等人,PHENIX:全面的基于Python的大分子结构解出系统(PHENIX:a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution).晶体学报D生物晶体学,2010.66(Pt 2):第213-21页。
- [0077] 14.埃姆斯(Emsley),P.和K.卡坦(Cowtan),Coot:分子图形学的模型构建工具(Coot:model-building tools for molecular graphics).晶体学报D生物晶体学,2004.60(Pt 12Pt 1):第2126-32页。
- [0078] 15.拉维(Lovell),S.C.等人,通过Calpha几何学: $\phi$ 、 $\psi$ 和C $\beta$ 偏差的结构验证(Structure validation by Calpha geometry:phi,psi and Cbeta deviation).蛋白质(Proteins),2003.50(3):第437-50页。
- [0079] 16.颜,H.等人,小鼠牛磺胆酸钠共转运多肽中的B型和D型肝炎病毒进入限制的分子决定簇(Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide).病毒学杂志,2013.87(14):第7977-91页。
- [0080] 17.莫斯科(Moscou),M.J.和A.J.波诺维(Bogdanove),简单密码管控TAL效应物对DNA的识别(A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors).科学(Science),2009.326(5959):第1501页。
- [0081] 18.波池(Boch),J.等人,破坏TAL型III效应物的DNA结合特异性的代码(Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors).科学,2009.326(5959):第1509-12页。
- [0082] 19.斯特伦(Strom),S.C.、J.戴维拉(Davila)和M.格瑞皮(Grompe),具有人类化肝的嵌合小鼠:研究药物代谢、分泌和毒性的工具(Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism,excretion,and toxicity).分子生物学方法(Methods Mol Biol),2010.640:第491-509页。
- [0083] 20.比斯格(Bissig),K.D.等人,人类肝嵌合小鼠提供B型和C型肝炎病毒感染和治疗的模型(Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment).临床研究杂志(J Clin Invest),2010.120(3):第924-30页。
- [0084] 衍生自幼稚文库的7种抗体的抗体序列
- [0085] m36
- [0086] m36 VH DNA:
- [0087] CAAGTTCCTTTATGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAGAATTCGCCACCATGAAACATCTGTGGT  
TCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGG  
GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT  
GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTA  
TTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG  
AGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTG  
TATTACTGTGCAAAAACGTCCTACGGGGGGGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCA  
CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:01)
- [0088] m36 VL DNA:

- [0089] CAGCCTGTGCTGACTCAATCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTT  
GTTCTGGAAACACTTCCAACATCGGAAGTTATTATGCATACTGGTATCAGCAACTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATGATAATAATCAGCGGCCCTCGGGGATCCCTGCCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCAG  
ATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCTGAATGGTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGGT  
CACCGTCCTA (SEQ ID NO:02)
- [0090] m36 VH氨基酸:
- [0091] QMQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSV  
KGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKTSYGGAFDIWGQGMVTVSS (SEQ ID  
NO:03)
- [0092] m36 VL氨基酸:
- [0093] QPVLTSQSPSASGTPGQRVTISCSGNTSNIGSYAYWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSGIPARFS  
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNPGVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:04)
- [0094] 71:
- [0095] 71 VH DNA:
- [0096] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT  
GCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCGGCTACTATATACATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA  
AGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTT  
CAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGGACGGCCTACATGGAAGTGTGACAC  
TGACATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGAAGGAAGGGGCGGCATGGACGTCTG  
GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:05)
- [0097] 71 VL DNA:
- [0098] GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCT  
CCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAATATTTGGATTGGTACCTGCA  
GAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCT  
GACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTG  
AGGATGTTGGGATTATTACTGCATGCAAGGTCTACAACCTCCCATCACCTTCGGCCAGGGGAC  
ACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO:06)
- [0099] 71 VH氨基酸:
- [0100] QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYIHWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKF  
QGRVTMTRDTSIRTA YME LSTLTSDDTAVYYCAREGRGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID  
NO:07)
- [0101] 71 VL氨基酸:
- [0102] DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP  
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGLQPPITFGQGRLEIK (SEQ ID NO:08)
- [0103] 76:
- [0104] 76 VH DNA:
- [0105] GAGGTGCAGCTGTTGGAGACCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT  
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA  
GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTG  
AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC  
TGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGG  
GACAATGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:09)
- [0106] 76 VL DNA:

- GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCT  
CCTGCAGGTCTAGTCACAGCCTCGTATACAGTGATGGAAACACCTACTTGAGTTGGTTTCACCA  
GAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAATCGGGACTTTGGGGTCCCA  
GACAGATTGAGCGGCAGTGGGTGAGGCACTGACTTCACACTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCTG  
AGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCCTGGGACGTTTCGGCCAGGGGAC  
CAAAGTGGATATCAAA (SEQ ID NO:10)
- [0107] 76 VH氨基酸:  
EVQLLETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSV  
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGAFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID  
NO:11)
- [0108] 76VL氨基酸:  
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSSHSLVYSDGNTYLSWFHQRPQGSPRRLIYKVSNRDFGVP  
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPGTFGQGTKLDIK (SEQ ID NO:12)
- [0109] T47:
- [0110] T47 VH DNA:  
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCTCCT  
GTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCCAGCAACAGTGTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCA  
GTCTCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGC  
TGAGCTCTGTGACTCCCAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCAAGAGCCGATGGTTTCGCGAGG  
GGGAGGGTATGACCAGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:13)
- [0111] T47 VL DNA:  
GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCA  
AATGCAAGTCCAGTCAGTCTATTTTATACAGGTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCA  
ACACAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTCTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTC  
CCTGACCGATTAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGG  
CTGAAGATGTGGCGGTTTATTACTGTCAGCAATATTATACTACTCCTCAGACTTTTGGCCAGGG  
GACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:14)
- [0112] T47 VH氨基酸:  
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSSLCAISGDSVSSNSVAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKQWYNDYA  
VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARADGSRGGGYDQWGQGTLVTVSS (SEQ  
ID NO:15)
- [0113] T47 VL氨基酸:  
DIVMTQSPDSLAVSLGERATIKCKSSQSILYRSNNKNYLAWYQHKPGQPPKLLISWASTRESGV  
PDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYYCQYYTTPQTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:16)
- [0114] m1Q
- [0115] m1Q VH DNA  
CAGGTCCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT  
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA  
GGGGCTGGAGCAGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGTAGACTCCGTG  
AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC  
TGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATCTACATACGGTATGGACGTCTGGGG  
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:17)
- [0116]
- [0117] m1Q-VL DNA

- [0118] GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGTCGGCCTCCATCT  
CCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAACACCTACTTGAATTGGTTTCAGCA  
GAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAATCGGGACTCCGGGGTCCCA  
GACAGATTGAGCGGCAGTGGGTGAGACACTGATTTACACTGGAAATCAGCAGGGTGGAGGCCG  
AGGATGTTGGGATTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAA  
GCTGGATATCAAA (SEQ ID NO:18)
- [0119] m1Q VH氨基酸:  
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEQVAVISYDGSNKYYVDSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYGM DVWGQGTITVTVSS (SEQ ID  
NO:19)
- [0120] m1Q Vk氨基酸:
- [0121] DVVMTQSPLSLPVTLGQSASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVP  
DRFSGSGSDTDFTLEISRVEAEDVGIYYCMQGTHTWTFGQGTKLDIK (SEQ ID NO:20)
- [0122] 2H5:
- [0123] 2H5 VH DNA:  
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGGCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAAGAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCC  
TTCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGCATAATGATTATGCA  
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTTTCCCTGCAGC  
TGAACCTCTGTGACCCCCGAAGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGCGCGGCCAGATGGGAGCTTT  
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:21)
- [0124] 2H5 VL DNA:  
CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTT  
GTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTTATTATGTATACTGGTACCAGCAATTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGTGAGTCCTATGACAGCAGCCTGAGTGGTGTGATATTTCGGCGGAGGGACCAAGCT  
GACCGTCCTA (SEQ ID NO:22)
- [0125] 2H5 VH氨基酸:  
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCGISGDSVSSKSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWHNDYA  
VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGQM GALDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID  
NO:23)
- [0126] 2H5 VL氨基酸:  
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSYVYVYQQFPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFS  
GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGVIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:24)
- [0127] m150
- [0128] m150 VH DNA:  
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT  
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA  
GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG  
AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC  
TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTTGGTGGCTGGTTCGAAGTGCTTTTGA  
TATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:25)
- [0129] m150 VK DNA:
- [0130] GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT  
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGC  
TCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGC

- [0131] AGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTT  
ATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGAT  
TAAA (SEQ ID NO:26)
- [0132] m150 VH氨基酸:
- [0133] EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLVAGRSAFDIWGQGTTTVTVSS (SEQ ID  
NO:27)
- [0134] m150 VK氨基酸:
- [0135] EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGA STRATGIPARFSG  
SGSGTEFTLTITSSSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPITFGQGTRLEIK (SEQ ID NO:28)
- [0136] 衍生自2H5 VH链改组文库选择的10个抗体的抗体序列。应注意,这些抗体具有与  
2H5相同的VL序列,因此下文仅列示这些抗体的VH序列。
- [0137] 编号4
- [0138] 编号4 VH DNA:
- [0139] CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGGCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAAGAGTGTTACTTGGAAGTGGATCAGGGAGTCTCC  
AACGGGAGGCCTTGAGTGGCTGGGCAGGACATACTATAGGTCCAAGTGGTTTAATGATTATGCA  
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACTGTCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTTTCCCTGCAGC  
TAAACTCTGTGACTCCCGAGGACAGGGGTGTCTATTACTGCGCACGCGCCAAGATGGGAGGTAT  
GGACGTCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:29)
- [0140] 编号4 VH氨基酸:
- [0141] QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCGISGDSVSSSKSVTWNWIRESP TGGLEWLGRITYYRSKW FNDYA  
VSVKSRITVNPDT SKNQFSLQLNSVTPEDRGVYYCARAKMGGMDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID  
NO:30)
- [0142] 编号31 VH DNA:
- [0143] CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCA  
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGC  
TGAAGTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTACAAGACAGAGTTGGCACGGTAT  
GGAAGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:31)
- [0144] 编号31 VH氨基酸:
- [0145] QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSAAWN WIRQSPSRGLEWLGRITYYRSK WYNDYA  
VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCTRQSWHGMEVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID  
NO:32)
- [0146] 编号32 VH DNA:
- [0147] CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCA  
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACTCAGACACATCGAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGC  
TGAAGTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGGAGTATAGCAACAGGTAC  
TGAAGTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:33)
- [0148] 编号32 VH氨基酸:
- [0149] QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSAAWN WIRQSPSRGLEWLGRITYYRSK WYNDYA  
VSVKSRITINSDTSKNQFSLQLKSVTPEDTAVYYCARS IATGTDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID  
NO:34)

[0150] 编号32 VH DNA:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGATGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGTAGCCGTGCTACTTGGAAGTGGATCAGGGAGTCTCC  
AACGGGAGGCCTTGAGTGGCTGGGCAGGACATACTATAGGTCCAAGTGGTTTAATGATTATGCA  
[0151] GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACTGTCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTTTCCCTGCAGC  
TAAACTCTGTGACTCCCGAGGACAGGGGTGTCTATTACTGCGCACGCGCCAAGATGGGAGGTAT  
GGACGTCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:35)

[0152] 编号69 VH氨基酸:

QVQLQQSGPGLMKPSQTLSTLCAISGDSVSSSRATWNWIRESPTGGLEWLGRITYYRSKWFNDYA  
VSVKSRITVNPDTSKNQFSLQLNSVTPEDRGVYYCARAKMGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID  
NO:36)

[0153] A14 VH DNA:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCA  
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGC  
TGAACCTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGAACACGTTGGGGTAT  
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:37)

[0154] A14 VH氨基酸:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIQSPSRGLEWLGRITYYRSKQWYNDYA  
VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGTRWGMMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID  
NO:38)

[0155] A21 VH DNA:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCA  
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGC  
TGAACCTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGCGAAAGTGTACGGTGT  
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:39)

[0156] A21 VH氨基酸:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIQSPSRGLEWLGRITYYRSKQWYNDYA  
VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARAKVYGVVDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID  
NO:40)

[0157] B103 VH DNA:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGGCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAAGAGTGCCACTTGGAAGTGGGTCAGGCAGTCCGC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAGGTGGTTTAATGATTATGCA  
[0158] GTGTCTGTGAAAAGTCGAATAACCGTCAAGCCAGACACATCCAAGAACCAGTTTTCCCTGCAAT  
TAAATTCTGTGAGTCCCGAGGACACGGCTATCTATTACTGTGCACGCGGCAACATGGGAGCTAT  
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:41)

[0159] B103 VH氨基酸:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCGISGDSVSSKSATWNWVRQSASRGLEWLGRITYYRSRWFNDYA  
VSVKSRITVKPDTSKNQFSLQLNSVSPEDTAIYYCARGNMGAMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID  
NO:42)

[0160] B129 VH DNA:

- [0161] CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGCTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGCCATCTCCGGGGACAGGGTCTCTAGCAATAGAGCTGCTTGGAAGTGGGTGAGGCAGTCCCC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAGTGGTATAATGATTATGCA  
GTCTCTGTAAAAAGTCGAGTGACCATCAGCCCAGACGCATCCAAGAACCAAGTCTCCCTGCAGC  
TGAAGTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGTACAGCTATGGGTGA  
CGCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:43)
- [0162] B129 VH氨基酸:
- [0163] QVQLQQSGPGLLKPSQTLSTLCAISGDRVSSNRAAWNVRQSPSRGLEWLGRITYRSQWYNDYA  
VSVKSRVTISPDASKNQVSLQLNSVTPEDTAVYYCARGTAMGDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID  
NO:44)
- [0164] B139 VH DNA:
- [0165] CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCACACTCACCT  
GTGTCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCA  
GTTTCTCTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGC  
TGAAGTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGACAAGCCTCCAACGGTTT  
TGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:45)
- [0166] B139 VH氨基酸:
- [0167] QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCVISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYRSKWYNDYA  
VSLKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQASNGFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID  
NO:46)
- [0168] B172 VH DNA:
- [0169] CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT  
GTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCC  
ATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCA  
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGC  
TGAAGTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGACAGGGGACGACAGGCTT  
TGACTACTGGGGCCAGGGAACCACGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO:47)
- [0170] B172 VH氨基酸:
- [0171] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYRSKWYNDYA  
VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQGTTFDYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID  
NO:48)
- [0172] 衍生自A14 VL链改组文库选择的两个抗体的抗体序列。应注意,这些抗体具有与  
A14相同的VH序列,因此下文仅列示这两个抗体的VL序列。
- [0173] 编号8VLDNA:
- [0174] CAGTCTGTCGTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCT  
GCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATTATTATGTGTCCTGGTACCAGCACCTCCCAGGAAC  
AGCCCCAAACTCCTCATTTATGACAATGCTAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACGTGAGCCACCCTGGGCATCACTGGGCTCCGGGCTGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGCCAGTCCTATGACAATAGCCTTAGTGGTTTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCT  
GACCGTCCTA (SEQ ID NO:49)
- [0175] 编号8 VL氨基酸:
- [0176] QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNYYVSWYQHLPGTAPKLLIYDNAKRPSGIPDRFS  
GSKSGTSATLGITGLRAEDEADYYCQSYDNSLSGLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:50)
- [0177] 编号20 VL DNA:

- [0178] CAGTCTGTGTTGACGCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTT  
GTTCTGGAACCAGCTCCAACATCGGAAGTAAGTATGTATACTGGTACCAGCGGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATACTAATGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGCCCCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGCTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCT  
GACCGTCCTA (SEQ ID NO:51)
- [0179] 编号20 VL氨基酸:  
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGTSSNIGSKYVYWYQRLPGTAPKLLIYTNDQRPSGVPARFS  
GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:52)
- [0180] 编号20-m1 VL DNA:  
CAGTCTGTGTTGACGCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTT  
GTTCTGGAACCAGCTCCAACATCGGAAGTTTCTATGTATACTGGTACCAGCGGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATACTAATGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGCCCCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGCTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCT  
GACCGTCCTA (SEQ ID NO:53)
- [0181] 编号20-m1 VL氨基酸:  
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGTSSNIGSFYVYWYQRLPGTAPKLLIYTNDQRPSGVPARFS  
GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:54)
- [0182] 编号20-m2 VL DNA:  
CAGTCTGTGTTGACGCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTT  
GTTCTGGAACCAGCTCCAACATCGGAAGTTTCTATGTATACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATACTAATGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGCCCCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGCTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCT  
GACCGTCCTA (SEQ ID NO:55)
- [0183] 编号20-m2 VL氨基酸:  
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGTSSNIGSFYVYWYQQLPGTAPKLLIYTNDQRPSGVPARFS  
GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:56)
- [0184] 编号20-m3 VL DNA:  
CAGTCTGTGTTGACGCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTT  
GTTCTGGAACCAGCTCCAACATCGGAAGTTACTATGTATACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATACTAATGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGCCCCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGCTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCT  
GACCGTCCTA (SEQ ID NO:57)
- [0185] 编号20-m3 VL氨基酸:  
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGTSSNIGSYVYWYQQLPGTAPKLLIYTNDQRPSGVPARFS  
GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:58)
- [0186] 编号20-m3 VL氨基酸:  
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGTSSNIGSYVYWYQQLPGTAPKLLIYTNDQRPSGVPARFS  
GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:58)
- [0187] 编号20-m3 VL氨基酸:  
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGTSSNIGSYVYWYQQLPGTAPKLLIYTNDQRPSGVPARFS  
GSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:58)

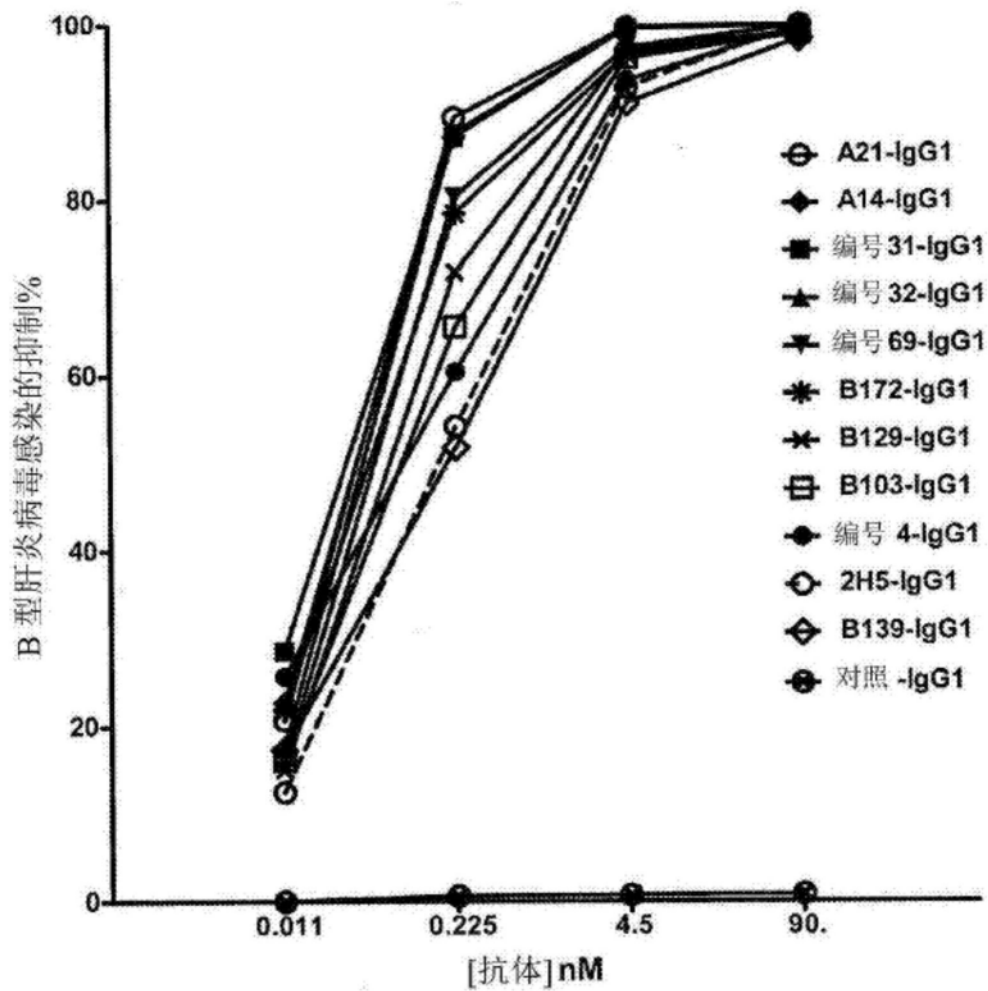


图1