

1. 特异性结合乙肝病毒表面抗原S的人源化重链突变体，其中人源
5 重链HCDRs中的所有或部分氨基酸残基取代了选自鼠源重链HCDR1，
HCDR2和HCDR3的所有或部分氨基酸残基。

2. 按照权利要求1的人源化重链突变体，其中缬氨酸取代了
HCDR1第34位氨基酸残基上的异亮氨酸。

10

3. 按照权利要求1的人源化重链突变体，其中丝氨酸取代了
HCDR2第54位氨基酸上的苏氨酸。

4. 按照权利要求1的人源化重链突变体，其中甘氨酸取代了
15 HCDR2第65位氨基酸上的丝氨酸。

5. 按照权利要求1的人源化重链突变体，其中丝氨酸取代了
HCDR3第100位氨基酸上的谷氨酸。

20 6. 按照权利要求1的人源化重链突变体，其中它含有权利要求2到5
的所有突变。

7. 包含权利要求6的人源化重链突变体的表达载体pcDdA-HzSIIIh
(保藏号：KCTC 10083BP)。

25

8. 特异性结合乙肝病毒表面抗原S的人源化重链突变体，其中人源
重链HCDRs中的所有或部分氨基酸残基取代了选自鼠源重链HCDR1，
HCDR2和HCDR3的所有或部分氨基酸残基，并且去除了结合MHC II类
分子的肽序列。

30



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01802990.6

[43] 公开日 2003 年 2 月 5 日

[11] 公开号 CN 1395617A

[22] 申请日 2001.10.4 [21] 申请号 01802990.6

[30] 优先权

[32] 2000.10.2 [33] KR [31] 2000/57891

[32] 2001.9.29 [33] KR [31] 2001/60966

[86] 国际申请 PCT/KR01/01657 2001.10.4

[87] 国际公布 WO02/059318 英 2002.8.1

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.31

[71] 申请人 韩国生命工学研究院

地址 韩国大田市

[72] 发明人 洪孝贞 金根洙

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 李悦

权利要求书 3 页 说明书 30 页 序列表 14 页
附图 14 页

[54] 发明名称 抗乙肝病毒表面抗原 S 的人源化抗体及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及抗乙肝病毒表面抗原 S 的人源化抗体及其制备方法。具体地说，它涉及这样的人源化抗体，即包含在它们可变区的 HCDR1，HCDR2，HCDR3 和 LCDR1，LCDR2，LCDR3 上具有来源于人抗体的氨基酸序列的重链和轻链，还涉及含有上述人源化抗体的各重链和轻链基因的表达载体，以及通过用重链和轻链表达载体转染的能够生产人源化抗体的转化体，及其制备方法。本发明的一种人源化抗体比现有技术的人源化抗体更加人源化。因此，它最小化了在人体中的免疫应答可能性并且具有良好的抗原结合能力，使它成为预防和治疗乙肝病毒感染的优秀候选物。

摘要 (续) 本发明涉及抗乙肝病毒表面抗原 S 的人源化抗体及其制备方法。具体地说，它涉及这样的人源化抗体，即包含在它们可变区的 HCDR1，HCDR2，HCDR3 和 LCDR1，LCDR2，LCDR3 上具有来源于人抗体的氨基酸序列的重链和轻链，还涉及含有上述人源化抗体的各重链和轻链基因的表达载体，以及通过用重链和轻链表达载体转染的能够生产人源化抗体的转化体，及其制备方法。本发明的一种人源化抗体比现有技术的人源化抗体更加人源化。因此，它最小化了在人体中的免疫应答可能性并且具有良好的抗原结合能力，使它成为预防和治疗乙肝病毒感染的优秀候选物。

9. 按照权利要求8的人源化重链突变体，其中结合MHC II类分子的肽序列由SEQ. ID. No: 44或SEQ. ID. No: 45代表。

5 10. 按照权利要求8的人源化重链突变体，其中苏氨酸取代了SEQ. ID. No: 44代表的序列P9位上的丝氨酸。

11. 按照权利要求8的人源化重链突变体，其中天冬氨酸取代了SEQ. ID. No: 45代表的序列P6位上的苏氨酸。

10 12. 按照权利要求8的人源化重链突变体，其中它含有权利要求10到11的所有突变。

13. 含有权利要求12的人源化重链突变体的表达载体pcDdA-HzSIVh (保藏号: KCTC 10080BP)。

15

14. 特异性结合乙肝病毒表面抗原S的人源化轻链突变体，其中人源轻链LCDRs中的全部或部分氨基酸残基取代了选自鼠源轻链LCDR1, LCDR2和LCDR3的全部或部分氨基酸残基。

20 15. 按照权利要求14的人源化轻链突变体，其中丝氨酸取代了LCDR1的第27位氨基酸上的天冬氨酸。

16. 按照权利要求14的人源化轻链突变体，其中精氨酸取代了LCDR1的第31位氨基酸上的丝氨酸。

25

17. 按照权利要求14的人源化轻链突变体，其中异亮氨酸取代了LCDR1的第33位氨基酸上的蛋氨酸。

30 18. 按照权利要求14的人源化轻链突变体，其中赖氨酸取代了LCDR2的第54位氨基酸上的谷氨酰胺。

19. 按照权利要求14的人源化轻链突变体，其中苏氨酸取代了LCDR2的第56位氨基酸上的丝氨酸。

5 20. 按照权利要求14的人源化轻链突变体，其中丝氨酸取代了LCDR3的第91位氨基酸上的苏氨酸。

21. 按照权利要求14的人源化轻链突变体，其中它含有权利要求15到20的所有突变。

10

22. 含有权利要求21的人源化轻链突变体的表达载体pCMV-dhfr-HzSIIIk (保藏号: KCTC 10084BP)。

23. 同时用权利要求7或权利要求13的人源化重链表达载体和权利要求22的人源化轻链表达载体转染的转化体。

15

24. 从权利要求23的转化体表达得到的抗乙肝病毒表面抗原S的人源化抗体。

20 25. 制备人源化抗体的方法，它是比较小鼠和人抗体之间的CDR序列，选择同源性最高的人CDR序列，和用人抗体CDR中的氨基酸残基取代小鼠抗体CDR中的氨基酸残基，其中小鼠CDR中的氨基酸残基不影响抗原结合。

25

抗乙肝病毒表面抗原S的人源化抗体及其制备方法

5

发明领域

本发明涉及抗乙肝病毒表面抗原S的人源化抗体及其制备方法。具体地说，它涉及这样一种人源化抗体，它包括在其可变区的HCDR1，
10 HCDR2, HCDR3和LCDR1, LCDR2, LCDR3上具有来源于人抗体的氨基酸序列的重链和轻链，通过从上述人源化抗体的重链删除结合MHC II类分子的肽序列而使人抗-小鼠抗体（HAMA）的应答最小化，它还涉及含有上述人源化抗体的各个重链和轻链基因的表达载体，通过用重链和轻链表达载体转染的能够产生人源化抗体的转化体，以及通过培养上述转化
15 体大规模生产人源化抗体的方法。

发明背景

乙肝病毒 (HBV)侵入人体，导致慢性和急性肝炎。如果情况更糟的话，它可能是一种导致肝硬化和肝癌的病原。据估计全世界高达三亿患者
20 感染HBV (Tiollais和Buendia, *Sci. Am.*, 264, 48, 1991)。HBV的包膜由三种蛋白质组成。具体地说，它由包括S抗原的主要蛋白质、包括S抗原和前S2抗原的中间蛋白质、以及包括S抗原、前S2抗原和前S1抗原的大蛋白质组成(Neurath, A. R.和Kent, S. B. H., *Adv. Vir. Res.*, 34: 65-142, 1988)。
25 上述所有的HBV表面抗原蛋白质均能够诱导中和HBV的抗体。其中，S抗原占总包膜蛋白的约80%，并且具有通常在所有HBV亚型中都存在的称之为“共有a”的中和表位。

当HBV感染时，例如，HBV阳性母亲生产的新生儿或接触HBV的医学研究所的职员或接受HBV相关肝病患者的肝移植的接受者情况下，已用
30 HB免疫球蛋白（HBIG）预防HBV感染(Beasley等, *Lancet*, 2, 1099, 1983;

Todo等, *Hepatology*, 13, 619, 1991)。然而, 目前使用的HBIG由人血浆制备, 因此存在抗抗原的特异性低和污染的可能性相对较高的缺点。而且, 必须连续提供人血。

5 为了克服这些缺点, 已经研制出应用抗HBV表面抗原的小鼠单克隆抗体的方法。通常, 小鼠单克隆抗体具有对抗原高度亲和和能够大规模生产的优点, 但是, 它也具有这样的缺点, 即当施用到人体中时会在人体中产生人抗小鼠抗体的应答 (在下文中, 称之为“HAMA应答”) (Shawler等, *J. Immunol.*, 135, 1530, 1985)。

10 为了克服这些缺点, 已经研制出人源化抗体, 其中小鼠单克隆抗体的高亲和性和特异性被维持, 而HAMA应答被降至最低。通过基因工程方法将小鼠单克隆抗体的互补决定簇 (下文称之为“CDRs”) 移植到人抗体的构架区构建人源化抗体。已经报道这种人源化抗体在人体中表现小得多的免疫原性 (Riechmann等, *Nature*, 332, 323, 1988; Nakatani等, *Protein Engineering*, 7, 435, 1994)。然而, 据报道, 这种方法产生的人源化抗体也有
15 缺点, 即当反复给人体施用, 则抗体中来源于小鼠的CDRs能够引起免疫应答 (Stephens等, *Immunology*, 85, 668-674, 1995; Sharkey等, *Cancer Research*, 55, 5935s-5945s, 1995)。因此, 期望当人源化抗体中来源于小鼠抗体的CDRs的氨基酸残基被取代为人抗体的残基时, HAMA应答将被降低。

20 在抗体分子的可变区中有3个重链CDR环- HCDR1, HCDR2和HCDR3 -和3个轻链CDR环 - LCDR1, LCDR2和LCDR3 。为了用本领域上述方法生产人源化抗体, 移植了全部6个CDR环。然而, 因为CDR中并不是所有残基都直接结合抗原 (Padlan等, *FASEB J.*, 9, 133, 1995), 所以通过将直接涉及抗原结合的小鼠单克隆抗体的特异性决定残基 (下文称之为“S
25 DRs”) 移植到人抗体的构架区而构建的人源化抗体将产生比已知的人源化抗体更低的HAMA应答。

另一方面, 辅助T细胞在免疫应答中的早期的活化过程中是必需的, MHC (主要组织相容性复合物) II类分子在选择和活化T细胞中发挥必要的作用。MHC II类蛋白结合从蛋白质抗原消化得到的具有9个氨基酸
30 残基的肽, 它在抗原呈递细胞的表面表达。当通过与识别上述MHC II类

分子的T细胞受体（TCR）的复合物形成激活T细胞时，则免疫应答起始(G ermain, R. N. *Cell* 76, 287-299, 1994)。因此，没有可能结合MHC分子的肽序列的人源化抗体将不在人体中诱导免疫应答。

5 以前，本发明人提供了一种通过应用抗HBV表面抗原的小鼠单克隆抗体H67的基因的CDR—移植法构建的人源化抗体，韩国专利申请号163163（1998年9月3日），并且在这个抗体基础上，研究出了与上述人源化抗体相比具有的免疫原性降低的人源化抗体HZII-H67，且也申请韩国专利，申请号为98-32644。

10 因此，为了通过对上述人源化抗体HZII-H67的进一步人源化来使HAMA应答最小化，本发明人研究出这样的人源化抗体，它们包括在其可变区的HCDR1, HCDR2, HCDR3和LCDR1, LCDR2, LCDR3上具有来自人抗体的氨基酸序列的重链和轻链，通过从上述人源化抗体的重链删除了结合MHC II类分子的肽序列，而使人抗-小鼠抗体（HAMA）应答最小化，并且通过证明它在人体中的最小化了免疫应答的可能性并具有良好的抗原结合能力，使它成为预防和治疗乙肝病毒感染的优秀候选物，从而完成本
15 发明。

20 发明概述

本发明的目的在于提供抗HBV表面抗原S的人源化抗体，其使人体中的免疫原性降至最低，而同时具有优秀的抗原结合能力，本发明还提供了其制备方法，以便有效预防和治疗乙肝病毒感染。

25 附图简述

图1 显示人源化抗体HZII-H67的重链可变区和本发明的抗HBV表面抗原S的人源化重链可变区突变体之间的核苷酸和氨基酸序列的比较结果。

30 图2 提供示意图说明人源化重链突变体I34V（其中缬氨酸取代小鼠

HCDR1的第34位的异亮氨酸)的制备方法。

图3 显示包括由图2的方法制备的I34V突变体的表达载体pcDdA-HzSIIIh-I34V的限制性酶切图谱。

图4 显示说明抗表面抗原S的具有本发明的人源化重链突变体的人源化抗体的抗原结合能力的ELISA结果,

A; HCDR1 突变体, B; HCDR2突变体,

C; HCDR3 突变体,

H/K; 由HZII-H67的重链和轻链组成的人源化抗体HZII-H67。

图5显示说明包括本发明的两种以上人源化重链突变的人源化抗体的抗表面抗原S的抗原结合能力的ELISA结果。

图6显示人源化抗体HZII-H67的轻链可变区和本发明的抗HBV表面抗原S的人源化轻链可变区突变体之间的核苷酸和氨基酸序列的比较结果。

图7 显示示意图, 说明人源化重链突变体Q89L (其中亮氨酸取代小鼠LCDR1的第89位谷氨酰胺) 的制备方法。

图8 显示包括由图7的方法制备的Q89L突变体的表达载体pcDdA-HzSIIIh-Q89L的限制性酶切图谱。

图9显示ELISA结果, 说明具有本发明的人源化轻链突变体的抗表面抗原S的人源化抗体的抗原结合能力。

H/K; 由HZII-H67的重链和轻链组成的人源化抗体HZII-H67

图10显示Western印迹分析结果, 说明具有本发明的人源化重组重链突变体和轻链突变体的人源化抗体HzS-III的存在。

A; HzS-III, B; HZII-H67

图11显示ELISA结果, 说明具有本发明的人源化重组重链突变体和轻链突变体的抗HBV表面抗原S的人源化抗体HzS-III的抗原结合能力。

图12显示竞争性ELISA的结果, 说明具有本发明的人源化重组重链突变体和轻链突变体的抗HBV表面抗原S的人源化抗体HzS-III和HzS-IV的抗原结合亲和性。

图13显示本发明的人源化抗体HzS-III和HzS-IV的重链可变区和野生型小鼠单克隆抗体H67和人源化抗体HZII-H67的重链可变区之间的氨基酸

序列比较结果。

图14显示本发明的人源化抗体HzS-III和野生型小鼠单克隆抗体H67和人源化抗体HZII-H67的轻链可变区之间的氨基酸序列比较结果。

5

发明详述

本发明提供抗HBV表面抗原S的人源化抗体，它包括用人源氨基酸残基取代鼠源的重链和轻链可变区上CDRs的氨基酸残基的重链和轻链；包括各个人源化抗体的重链和轻链基因的表达载体；以及用上述表达载体
10 转染的转化体。

下面，将更详细地描述本发明。

本发明提供了人源化重链突变体，其中用人源重链抗体上的氨基酸残基取代抗HBV表面抗原S的人源化抗体的相应重链可变区的HCDR1, HCD
15 R2, HCDR3区上的鼠源氨基酸残基，以及包括上述人源化重链突变体的表达载体。

比较鼠源人源化抗体HZII-H67抗体的重链可变区中HCDR1, HCDR2和HCDR3与人源抗体的相应HCDR1, HCDR2和HCDR3区上的氨基酸序列，筛选最相似的CDR序列。然后，用人抗体源的氨基酸残基取代不影响
20 抗原结合活性的鼠源氨基酸残基，而构建本发明的人源化抗体。

为了用人源氨基酸取代人源化抗体HZII-H67中HCDR1区的鼠源氨基酸残基，SEQ. ID. NO: 1代表的Asp-Tyr-Asn-Ile-Gln，本发明人将小鼠HCDR1区的氨基酸序列与人抗体的相比较。结果发现小鼠HCDR1与来自Kab
at 数据库ID号35920的SEQ. ID. NO: 2表示的人HCDR1抗体序列的HCDR
25 1的氨基酸残基Asp-Tyr-Asn-Val-Asn高度同源。因此，本发明构建了HCDR1突变体，其中显示不同的第4和第5位氨基酸残基被取代。

为了这么做，构建了突变体I34V或Q35N，其中缬氨酸或天冬酰胺取代第34或第35位氨基酸残基的异亮氨酸或谷氨酰胺，这两位氨基酸残基在小鼠和人抗体HCDR1区之间是不同的。

30 通过PCR和重组PCR，应用人源化抗体的重链表达载体pRc/CMV-

加人源化，并因此期望不影响抗原结合亲和力。具体地说，在本发明中使用SDR一移植法，以使人源化抗体具有较少的HAMA应答，并改善治疗作用，其中直接涉及结合HBV表面抗原S的SDR区被取代为人抗体。这与小鼠抗体的CDR区中表现同源性的所有氨基酸均被取代为人抗体的现有技术的方法不同。

为了证明本发明的人源化抗体的重链上存在突变的人源化抗体可表达，本发明人用包含重链上各种突变基因的每种重组表达载体转染动物细胞。通过夹层ELISA测定从上述转染体表达的抗体浓度后，再用间接ELISA测定包括抗表面抗原S的人源化重链突变体的人源化抗体的抗原结合能力。结果发现，在所有HCDR1突变体中，抗HBV表面抗原S的I34V的结合能力几乎与野生型人源化抗体HZS-H67的重链的结合能力相同。对于HCDR2突变体，T54S和S65G表现几乎与野生型抗体相同的抗原结合能力（参见图4）。对于HCDR3突变体，E100A表现比野生型抗体略微较低的抗原结合能力，说明HCDR3突变体的谷氨酸残基（E100）在与HBV表面抗原S结合中不重要。

因此，将数据库中的人抗体HCDR3的氨基酸序列与人源化抗体HZII-H67中的鼠HCDR3的氨基酸序列相比较，以便将鼠HCDR3的氨基酸序列中的谷氨酸残基取代为人抗体的氨基酸残基。结果发现，在与鼠HCDR3序列表现高度同源性的人抗体序列中(Kabat数据库ID No 24562, 39669, 44760)，HCDR3的第100和101位氨基酸残基上的丝氨酸和甘氨酸是共有氨基酸残基。因此，本发明人构建了这样的突变体，其中分别用丝氨酸或甘氨酸取代第100和101氨基酸位置上的谷氨酸或丙氨酸，然后测定它们的抗原结合能力。

用上述同样方法，构建了E100S突变体，其中丝氨酸取代了第100位氨基酸残基上的谷氨酸（应用SEQ. ID. No: 29和SEQ. ID. No: 30代表的引物对）和包括上述突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIh-E100S，A101G突变体，其中甘氨酸取代了第101位氨基酸残基上的丙氨酸（应用SEQ. ID. No: 31和SEQ. ID. No: 32代表的引物对）和包括上述突变体的重

HC-HZIIS (KCTC 0489BP)作为模板构建所述突变体(参见 图1和图2)。

结果, 分别应用从SEQ. ID. No: 3和SEQ. ID. No: 4代表的HL和P1引物对以及SEQ. ID. No: 5和SEQ. ID. No: 6代表的P2和HC引物对得到的DNA片段作为模板, 应用HL和HC作为引物对, 用重组PCR反应构建了人源化抗体的重链可变区突变体I34V。之后, 将上述I34V突变体克隆到已经克隆了人源化重链抗体的cDNA的表达载体中, 而构建重组表达载体, 它被命名为pcDdA-HzSIIIh-I34V (参见图3)。当进行了人源化抗体的重链可变区I34V突变体的核苷酸序列分析后, 本发明人发现人源化抗体的重链可变区I34V突变体已经正确插入上述重组表达载体。

应用SEQ. ID. No: 3, SEQ. ID. No: 7, SEQ. ID. No: 8和SEQ. ID. No. 6代表的引物对, 通过同样方法用PCR和重组PCR构建了Q35N突变体, 其中在鼠和人抗体的HCDR1序列上显示不同的氨基酸残基中, 用来自人重链的天冬酰胺取代第5位氨基酸残基上的谷氨酰胺。之后, 将Q35N克隆到表达载体中产生重组表达载体pcDdA-HzSIIIh-Q35N。

另外, 在本发明的人源化抗体中, 其中来自人抗体的氨基酸残基取代人源化抗体HZII-H67的鼠HCDR2区上的氨基酸残基, 优选人源HCDR2氨基酸序列取代所有鼠源HCDR2氨基酸序列, 除了直接涉及抗原结合的氨基酸残基。为了将人源化抗体HZII-H67中的来源于小鼠HCDR2的氨基酸残基改变为人源氨基酸残基, 将小鼠和人源HCDR2区上的氨基酸序列作比较。找到小鼠HCDR2和人抗体DP-15重链上的HCDR2区之间的同源性后, 用上述相同方法, 通过取代不直接涉及与抗原结合的氨基酸残基, 而构建HCDR2突变体。

结果, 构建了在HCDR2的第51位氨基酸残基上用甲硫氨酸取代异亮氨酸的I51M突变体(应用SEQ. ID. No: 9和SEQ. ID. No: 10代表的引物对)和包括上述突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIh-I51M, 以及在第54位氨基酸残基上用丝氨酸取代苏氨酸的T54S突变体(应用SEQ. ID. No: 11和SEQ. ID. No: 12代表的引物对)和包括该突变体重组表达载体pcDdA-HzSIIIh-T54S, 以及在第65位氨基酸残基上用甘氨酸取代丝氨酸

的S65G突变体（应用SEQ. ID. No: 13和SEQ. ID. No: 14代表的引物对）和包括该突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIh-S65G。

另外，在本发明的人源化抗体中，其中来自人抗体的氨基酸残基取代了人源化抗体HZII-H67的鼠HCDR3区上的氨基酸残基，优选人源HCDR3氨基酸序列取代所有鼠源HCDR3氨基酸序列，除非氨基酸残基直接涉及抗原结合。为了将人源化抗体HZII-H67中的来源于小鼠HCDR3的氨基酸残基改变为人源氨基酸残基，首先进行小鼠HCDR3的丙氨酸扫描诱变，以便验证那些氨基酸残基直接涉及抗原结合。

结果，构建了在HCDR3的第95位氨基酸残基上用丙氨酸取代天冬氨酸的N95A突变体（应用SEQ. ID. No: 15和SEQ. ID. No: 16代表的引物对）和包括上述突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIh-N95A，在第96位氨基酸残基上用丙氨酸取代酪氨酸的Y96A突变体（应用SEQ. ID. No: 17和SEQ. ID. No: 18代表的引物对）和包括该突变体重组表达载体pcDdA-HzSIIIh-Y96A，在第97位氨基酸残基上用丙氨酸取代甘氨酸的G97A突变体（应用SEQ. ID. No: 19和SEQ. ID. No: 20代表的引物对）和包括该突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIh- G97A，在第98位氨基酸残基上用丙氨酸取代酪氨酸的Y98A突变体（应用SEQ. ID. No: 21和SEQ. ID. No: 22代表的引物对）和包括上述突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIh-Y98A，在第99位氨基酸残基上用丙氨酸取代天冬酰胺的D99A突变体（应用SEQ. ID. No: 23和SEQ. ID. No: 24代表的引物对）和包括该突变体重组表达载体pcDdA-HzSIIIh- D99A，在第100位氨基酸残基上用丙氨酸取代谷氨酸的E100A突变体（应用SEQ. ID. No: 25和SEQ. ID. No: 26代表的引物对）和包括该突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIh- E100A，以及在第100位氨基酸残基上用丙氨酸取代丝氨酸的S100aA突变体（应用SEQ. ID. No: 27和SEQ. ID. No: 28代表的引物对）和包括该突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIh- S100aA。

如上所述，通过用人源化抗体CDR区上的人源氨基酸取代不直接涉及抗原结合的鼠源氨基酸，而使本发明的人源化抗体比现有技术的更

H_zSIIIh表达出的人源化抗体H_zS-III的氨基酸序列后，本发明人发现它由包括SEQ. ID. No: 43代表的可变区氨基酸序列的人源化重链H_zS-III-VH组成。

5 进一步，本发明提供了通过SDR—移植法生产的人源化轻链突变体，其中用来自人的轻链抗体上的氨基酸残基取代抗HBV表面抗原S的人源化抗体的相应轻链可变区的LCDR1, LCDR2, LCDR3区上的氨基酸残基，以及包括突变体的表达载体。

本发明的人源化抗体是这样构建的，即用人源轻链氨基酸残基取代
10 人源化抗体HZII-H67的轻链可变区的LCDR1, LCDR2和LCDR3上的氨基酸残基。对于人源化轻链，人源化抗体HZII-H67的LCDR1和LCDR2已经具有来自人抗体的氨基酸残基（对于LCDR1是D27cS, S31N, M33I; 对于LCDR2是Q54K, S56T）。因此，本发明人试图改变LCDR3上的氨基酸残基。具体地说，为了将人源化抗体HZII-H67的LCDR3区上的鼠源氨基酸残基改
15 变为人抗体的氨基酸残基，本发明人比较了人源化轻链的氨基酸序列和与它表现高度同源性的人源化B1抗体轻链的LCDR3氨基酸序列（参见图6）。从这本发明人推测鼠源LCDR3的第89和91位氨基酸残基上的谷氨酰胺和苏氨酸不直接涉及抗原结合。因此，我们将它们取代为人抗体中的氨基酸残基亮氨酸和丝氨酸。

20 结果构建了Q89L突变体，其中亮氨酸取代了第89位氨基酸残基上的谷氨酰胺（应用SEQ. ID. No: 33到SEQ. ID. No: 36代表的引物对）和包括上述突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIk-Q89L(参见图7和图8)，以及T91S突变体，其中丝氨酸取代了第91位氨基酸残基上的苏氨酸（应用SEQ. ID. No: 33, SEQ. ID. No: 36, SEQ. ID. No: 37和SEQ. ID. No: 38代表的
25 引物对）和包括上述突变体的重组表达载体pcDdA-HzSIIIk-T91S。

为了考察本发明的人源化抗体轻链上具有突变的抗HBV表面抗原S的人源化抗体的抗原结合能力，本发明人用包括各突变体的重组表达载体转染动物细胞，用间接ELISA测定人源化抗体的抗原结合能力。

30 结果，含有T91S突变体（其中丝氨酸取代了第91位氨基酸残基上

组表达载体pcDdA-HzSIIIh-A101G。测定了抗表面抗原S的具有人源化重链突变体的人源化抗体的抗原结合能力后，发现E100S的抗原结合能力类似于野生型的抗原结合能力，而A101G表现略微较低的抗原结合能力。

从上述结果，本发明人确定在所有人源化重链突变体中，I34V，
5 T54S，S65G和E100S 的抗原结合能力类似于野生型的抗原结合能力。因此，我们同时构建了包括上述全部4种突变的重组突变体。

首先，为了构件包括T54S和I34V突变的重组突变体，用pcDdA-HzSIIIh-T54S作为模板通过前面描述的同样方法，进行PCR和亚克隆，这样构建的表达载体被命名为pcDdA-HzSIIIh-T54S+I34V。
10

同时，为了构建包括T54S，I34V和E100S 突变的重组突变体，用pcDdA-HzSIIIh-I34V作为模板，通过前面描述的同样方法，进行PCR和亚克隆，这样构建的表达载体被命名为pcDdA-HzSIIIh-T54S+I34V+E100S。
15

另外，为了构建包括T54S，I34V，E100S和S65G突变的重组突变体，用pcDdA-HzSIIIh-E100s作为模板，通过前面描述的同样方法，进行PCR和亚克隆。从中构建了包括T54S，I34V，E100S和S65G所有突变的重组表达载体 pcDdA-HzSIIIh-T54S+I34V+E100S+S65G，它被命名为
20 pcDdA-HzSIIIh。

为了考察本发明的在人源化抗体的重链上具有突变的人源化抗体的抗原结合能力，本发明人用包括上述突变的重组表达载体转染动物细胞，并用间接ELISA测定抗表面抗原S的人源化抗体的抗原结合能力。

25 结果，分别含有I34V+T54S，I34V+T54S+E100S和I34V+T54S+E100S+S65G突变的每种人源化重链与野生型人源化抗体HZS-H67几乎表现相同的抗表面抗原S的结合能力(参见图5)。表达显示抗HBV表面抗原S的抗原结合能力的重链重组突变体的表达载体pcDdA-HzSIIIh已经于2000年9月22日保藏于韩国生命科学和生物技术研究所以(KRIBB)的韩国典型培养物收藏中心，保藏号为KCTC 10083BP。分析了从表达载体pcDdA-
30

的苏氨酸)的人源化轻链表现与野生型人源化抗体HZS-H67的重链相同程度的抗表面抗原S的结合能力,本发明的表达T91S突变体的表达载体pCMV-dhfr-HzSIIIk-T91S被命名为pCMV-dhfr-HzSIIIk。表达具有抗HBV表面抗原S的抗原结合能力的突变体T91S的表达载体pcDdA-HzSIIIk已经于2000年9月22日保藏于韩国生命科学和生物技术研究(KRIBB)的韩国典型培养物收藏中心,保藏号为KCTC 10084BP。分析了从表达载体pcDdA-HzSIIIk表达出的人源化抗体HzS-III的氨基酸序列后,本发明人发现它由包括SEQ. ID. No: 42代表的可变区氨基酸序列的人源化重链HzS-III-VL组成。

10

本发明还提供了这样的人源化抗体,它包括用来自人的氨基酸残基取代抗HBV表面抗原S的小鼠单克隆抗体H67的重链和轻链可变区上的鼠源氨基酸残基的重链和轻链。

15

为了构建包括重组重链和轻链突变体的人源化抗体,本发明人用人源化重链表达载体pcDdA-HzSIIIh和人源化轻链表达载体pCMV-dhfr-HzSIIIk转染动物细胞。之后,温育选择出来的转化体48小时,来表达同时具有人源化重链和轻链重组突变的人源化抗体HzS-III。通过夹层ELISA法测定培养基上清液中存在的人源化抗体HzS-III的浓度后,在应用间接ELISA测定抗原结合能力。

20

结果发现,人源化抗体HzS-III表现与野生型人源化抗体HZS-H67(H/K)几乎相同程度的抗表面抗原S的结合能力(参见图11)。

25

另外,本发明人用竞争性ELISA(竞争性ELISA, Ryu等, *J. Med. Virol.*, 52, 226, 1997)测定了人源化抗体HzS-III的抗原结合亲和性。结果发现,尽管用人源氨基酸残基取代了鼠源氨基酸残基,但本发明的人源化抗体HzS-III的抗原结合亲和性与野生型人源化抗体HZII-H67的几乎相同(参见图12)。

30

筛选了人源化抗体HzS-III重链中结合MHC II类分子的肽序列后,

本发明人构建了不期望结合MHC II类分子的有氨基酸残基取代的人源化重链，并测定了它们的抗原结合能力。为了生产所述人源化重链，构建了用苏氨酸取代第44位上的丝氨酸的S44T突变体（应用SEQ. ID. No: 46和47代表的引物对）和用天冬氨酸取代第68位上的苏氨酸的T68D突变体（应用SEQ. ID. No: 48和49代表的引物对）以及包括它们的重组表达载体。该表达载体已经于2001年9月26日保藏于韩国生命科学和生物技术研究所以（KRIBB）的韩国典型培养物收藏中心，保藏号为KCTC 10080BP。将人源化重链表达载体pcDdA-HzSIVh和人源化轻链表达载体pCMV-dhfr-HzSIIfk转染到动物细胞系中后，将上述转化体保温48小时，使它表达人源化抗体HzS-IV。测定得到的上清液中存在的人源化抗体HzS-IV的抗原结合亲和性，发现本发明的人源化抗体HzS-IV表现与人源化抗体HzS-III几乎相同的亲和性（参见图12）。

将表现优秀的针对HBV表面抗原S的结合能力和抗原结合亲和性的人源化抗体HzS-III和HzS-IV的重链和轻链可变区的氨基酸序列与野生型小鼠单克隆抗体H67和人源化抗体HZII-H67的氨基酸序列相比较。结果发现，本发明的人源化抗体HzS-III和HzS-IV比小鼠单克隆抗体H67和人源化抗体HZII-H67含有较少的鼠源氨基酸，因为重链HCDR1, HCDR2, HCDR3或轻链LCDR1, LCDR2, LCDR3上的某些鼠源氨基酸残基已经改变为人源氨基酸残基。而且，在本发明的人源化抗体HzS-IV重链可变区上的氨基酸序列中，在构架区有两个可能通过结合人MHC II类分子而诱导免疫应答的氨基酸残基被改变，从而使免疫应答最小化（参见图13和图14）。

因此，本发明的人源化抗体HzS-III和HzS-IV能够成为预防乙肝病毒感染的优秀候选，因为它们表现比现有技术的人源化抗体更优秀的HBV结合活性和诱导更低的HAMA应答。

下面，我们将通过实施例更详细描述本发明。

然而，下面的实施例目的在于说明本发明，而不是为了限制本发明。

实施例

实施例1: 编码人源化重链抗体的基因的突变

5 1-1: HCDR1突变体的构建

为了用人源氨基酸取代人源化抗体HZII-H67的HCDR1区的鼠源氨基酸残基, SEQ. ID. NO: 1代表的Asp-Tyr-Asn-Ile-Gln (Korea韩国专利申请号98-32644), 本发明人比较了鼠HCDR1区与人抗体HCDR1区的氨基酸序列。结果发现, 鼠CDR1与来自Kabat数据库ID编号为35920的SEQ. ID. NO: 2代表的人HCDR1抗体序列的HCDR1氨基酸残基Asp-Tyr-Asn-Val-Asn高度同源。因此, 本发明人构建了显示不同的第4和5位氨基酸残基被取代的HCDR1突变体。

15 1-1-1: 在第34位氨基酸残基上缬氨酸取代异亮氨酸的突变体的构建

为了构建第34位氨基酸残基上缬氨酸取代异亮氨酸的突变体, 在该位置上小鼠和人抗体的HCDR1区显示不同而且该位置认为不是抗原的直接结合表位, 用SEQ. ID. No: 3到SEQ. ID. No: 6代表的序列作为引物、人源化抗体HZII-H67 pRc/CMV-HC-HZIIS (KCTC 0489BP)的重链表达载体作为模板进行PCR和重组PCR (图1和图2)。具体地说, 用Taq DNA聚合酶(Takara Co.)进行30次PCR循环反应, 94°C 30秒, 55°C 30秒和72°C 1分钟。

结果发现, 用SEQ. ID. No: 3和SEQ. ID. No: 4代表的HL和P1引物从PCR反应扩增得到长度为181 bp的DNA片段, 用SEQ. ID. No: 5和SEQ. ID. No: 6代表的P2和HC引物从PCR反应扩增得到长度为284 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板和HL及HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应后, 得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体I34V。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化I34V突变体可变区的两个末端后, 本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体(它是将抗HBV前S1抗原的人源化抗体(Korea韩国专利申请号1998-49663)的重链基因克隆到

Invitrogen公司的pcDNA2的*EcoRI*-*NotI*位点上而得到的表达载体)的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体, 并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-I34V (图3)。对人源化抗体的重链可变区I34V突变体的核苷酸序列进行分析后, 本发明人发现人源化抗体的重链可变区I34V突变体正确
5 插入上述重组表达载体。

1-1-2: 天冬酰胺取代第35位氨基酸残基上的谷氨酰胺的突变体的构建

为了构建天冬酰胺取代第35位氨基酸残基上的谷氨酰胺的突变体Q35N, 在该位置上小鼠和人HCDR1抗体之间的氨基酸残基不同并且该
10 位置不认为是抗原的直接结合表位, 在如实施例<1-1-1>的相同条件下进行PCR。

具体地说, 用SEQ. ID. No: 3和SEQ. ID. No: 7代表的HL和P3引物扩增得到大小为187 bp的DNA片段, 用SEQ. ID. No: 6和SEQ. ID. No: 8代表的HC和P4引物扩增得到大小为278 bp的DNA片段。通过将这两个片段连
15 接起来而得到大小为448 bp的人源化抗体重链可变区突变体Q35N。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化Q35N突变体可变区的两个末端后, 本发明通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体, 并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-Q35N。对人源化抗体重链可变区Q35N突变体的核苷酸序列进行分析后, 本发明人发现人源化
20 抗体重链可变区Q35N突变体正确插入上述重组表达载体。

1-2: HCDR2突变体的构建

为了将SEQ. ID. NO: 39代表的人源化抗体HZII-H67的HCDR2区上的鼠源氨基酸残基取代为人源化氨基酸, 本发明人将小鼠HCDR1抗体的
25 氨基酸序列与人抗体HCDR1区的氨基酸序列进行了比较。结果发现, 鼠CDR2与SEQ. ID. NO: 40代表的种系人抗体的重链DP-15片段上的HCDR2区的氨基酸序列高度同源。因此, 本发明人通过取代看起来不直接涉及抗原结合的氨基酸残基而构建了HCDR2突变体。

1-2-1: 蛋氨酸取代第51位氨基酸残基上的异亮氨酸的突变体的构建

30

为了构建HCDR2突变体,用SEQ. ID. No: 9和SEQ. ID. No: 10代表的P5和P6引物而不是实施例<1-1-1>相同方法中的P1和P2引物进行PCR。用HL和P5引物扩增得到大小为236 bp的DNA片段,用HC和P4引物得到大小为230 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应,得到大小为448 bp的人源化抗体重链可变区突变体I51M。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体I51M可变区的两个末端后,本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体,并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-I51M。对人源化抗体的重链可变区的I51M突变体的核苷酸序列进行分析后,本发明人发现人源化抗体的重链可变区I51M突变体正确插入上述重组表达载体。

1-2-2: 丝氨酸取代第54位氨基酸残基上的苏氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 11和SEQ. ID. No: 12代表的P7和P8引物而不是实施例<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P7引物扩增得到大小为249 bp的DNA片段,用HC和P8引物扩增得到大小为218 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应,得到大小为448 bp的人源化抗体重链可变区突变体T54S。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体T54S可变区的两个末端后,本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体,并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-T54S。对人源化抗体的重链可变区的突变体T54S的核苷酸序列进行分析后,本发明人发现人源化抗体的重链可变区T54S突变体正确插入上述重组表达载体。

25

1-2-3: 丝氨酸取代第65位氨基酸残基上的甘氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 13和SEQ. ID. No: 14代表的P9和P10引物而不是实施例<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P9引物扩增得到大小为278 bp的DNA片段,用HC和P10引物扩增得到大小为185 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这

30

两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体S65G。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体S65G可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-S65G。对人源化抗体的重链可变区的突变体S65G的核苷酸序列进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区S65G突变体正确插入上述重组表达载体。

1-3: HCDR3突变体的构建

10 为了将SEQ. ID. NO: 41代表的人源化抗体HZII-H67的HCDR3上的鼠源氨基酸残基取代为人源化氨基酸，本发明人将小鼠HCDR3抗体的氨基酸序列与人抗体HCDR3区的氨基酸序列进行了比较。之后，本发明人通过取代小鼠HCDR3序列中看起来不直接涉及抗原结合的氨基酸残基而构建了HCDR3突变体。

15

1-3-1: 丙氨酸取代第95位氨基酸残基上的天冬酰胺的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 15和SEQ. ID. No: 16代表的P11和P12引物而不是实施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P11引物扩增得到大小为381 bp的DNA片段，用HC和P12引物扩增得到大小为88 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体N95A。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体N95A可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-N95A。对人源化抗体的重链可变区的突变体N95A的核苷酸序列进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区N95A突变体正确插入上述重组表达载体。

1-3-2: 丙氨酸取代第96位氨基酸残基上的酪氨酸的突变体的构建

30 用SEQ. ID. No: 17和SEQ. ID. No: 18代表的P13和P14引物而不是实

施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P13引物扩增得到大小为380 bp的DNA片段，用HC和P14引物扩增得到大小为85 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体Y96A。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体Y96A可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-Y96A。对人源化抗体的重链可变区的突变体Y96A的核苷酸序列进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区Y96A突变体正确插入上述重组表达载体。

1-3-3: 丙氨酸取代第97位氨基酸残基上的甘氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 19和SEQ. ID. No: 20代表的P15和P16引物而不是实施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P15引物扩增得到大小为383 bp的DNA片段，用HC和P14引物扩增得到大小为82 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体G97A。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体G97A可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-G97A。对人源化抗体的重链可变区的突变体G97A的核苷酸序列进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区G97A突变体正确插入上述重组表达载体。

1-3-4: 丙氨酸取代第98位氨基酸残基上的酪氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 21和SEQ. ID. No: 22代表的P17和P18引物而不是实施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P17引物扩增得到大小为386 bp的DNA片段，用HC和P18引物扩增得到大小为78 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区

昔酸序列进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区E100A突变体正确插入上述重组表达载体。

1-3-7: 丙氨酸取代第100a位氨基酸残基上的丝氨酸的突变体的构建

5 用SEQ. ID. No: 27和SEQ. ID. No: 28代表的P23和P24引物而不是实施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P23引物扩增得到大小为395 bp的DNA片段，用HC和P24引物扩增得到大小为67 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区
10 突变体S100aA。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体S100aA可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI-ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-S100aA。对人源化抗体的重链可变区的突变体S100aA的核苷酸序列进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区S100aA
15 突变体正确插入上述重组表达载体。

实施例2: 具有人源化重链突变体的人源化抗体的表达

为了在细胞中直接表达具有人源化重链突变体的人源化抗体，将本发明的表达载体转染到动物细胞系中。

20 具体地说，将COS7细胞在附加10%胎牛血清的DMEM培养基(GIBCO)中在37°C, 5% CO₂的培养箱中传代培养。将细胞以1 x 10⁶个细胞/m的浓度接种到100 mm培养皿中，37°C培养过夜。之后，用OPTI-MEM I (GIBCO)清洗3次。同时，将实施例1构建的包括人源化重链突变体I34V, Q35N, I51M, T54S, S65G, N95A, Y96A, G97A, Y98A, D99A, E100A或
25 S100aA的重组表达载体和人源化抗体HZII的轻链表达载体pKC-dhfr-HZIIS (KCTC 0490BP)各5 μg用800 μl OPTI-MEM I稀释，将50 μl Lipofectamine (GIBCO)也用800 μl OPTI-MEM I稀释。将上述稀释液在15 ml试管中混合得到DNA-lipofectamine复合物，然后在室温下保温至少15分钟。将6.4 ml OPTI-MEM I加入各DNA-Lipofectamine复合物，然后将它们
30 与清洗后的COS7细胞均匀混合而转染COS7细胞。在37°C, 5% CO₂培养

突变体Y98A。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体Y98A可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-Y98A。对人源化抗体的重链可变区的突变体Y98A的核苷酸序列
5 进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区Y98A突变体正确插入上述重组表达载体。

1-3-5: 丙氨酸取代第99位氨基酸残基上的天冬氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 23和SEQ. ID. No: 24代表的P19和P20引物而不是实施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P19引物扩增
10 得到大小为390 bp的DNA片段，用HC和P20引物扩增得到大小为73 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体D99A。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体D99A可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-D99A。对人源化抗体的重链可变区的突变体D99A的核苷酸序列
15 进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区D99A突变体正确插入上述重组表达载体。

20

1-3-6: 丙氨酸取代第100位氨基酸残基上的谷氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 25和SEQ. ID. No: 26代表的P21和P22引物而不是实施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P21引物扩增
25 得到大小为390 bp的DNA片段，用HC和P22引物扩增得到大小为73 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体E100A。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体E100A可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-E100A。对人源化抗体的重链可变区的突变体E100A的核
30

箱中温育DNA-Lipofectamine复合物处理的细胞48小时而进行转染。然后，收集上清液，用夹层ELISA法测定抗体浓度。为了进行夹层ELISA，用抗-人IgG (Sigma Co.)作为捕获抗体，用与辣根过氧化物酶(Sigma Co.)混合的抗-人抗体(Fc特异性)作为第二抗体。

5

实施例3: 具有人源化重链突变体的人源化抗体的抗表面抗原S的抗原结合能力的测定

将250 ng HBV的表面抗原S (Greencross Co.)加到微平板的各个孔中，涂覆孔。将用上述实施例2得到的DNA-lipofectamine复合物转染的各培养基加入平板，使基于实施例2测定的抗体浓度的各抗体浓度为分别为
10 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.8, 3.5和7 ng。通过向上述平板的孔中加入与辣根过氧化物酶组合的抗-人抗体作为第二抗体进行间接ELISA之后，在492 nm测定光密度。作为对照，用HZII-H67 pRc/CMV-HC-HZIIS (KCTC 0489BP)和pKC-dhfr-HZIIS分别作为重链和轻链表达载体进行同样试验。结果在图4
15 中显示。

如图4所示，在HCDR1突变体中，I34V的抗HBV表面抗原S的结合能力几乎与野生型人源化抗体HZS-H67的重链的相同。对于HCDR2突变体，T54S和S65G表现几乎与野生型抗体相同程度的抗原结合能力。另一方面，对于HCDR3突变体，E100A表现比野生型抗体略微较低的抗原结合能力，说明HCDR3突变体的谷氨酸残基(E100)在与HBV表面抗原S结合中不重要。
20

实施例4: HCDR2突变体的构建

25 本发明人在上述实施例3中证实小鼠HCDR3序列的第100位氨基酸谷氨酸在与HBV表面抗原S结合中不重要。因此，我们将它与数据库中的人抗体CDR3的氨基酸序列相比较，以便取代将上述氨基酸残基取代为人抗体的氨基酸残基。

30 结果发现，在与小鼠HCDR3序列显示高度同源性的人抗体序列

中，HCDR3的第100和101位氨基酸残基上的丝氨酸和甘氨酸是共有氨基酸残基。因此本发明人构建了分别用丝氨酸或甘氨酸取代第100和101位氨基酸残基上的谷氨酸或丙氨酸的突变体，并测定了它们的抗原结合能力。

5

4-1: 丝氨酸取代第100位氨基酸残基上的谷氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 29和SEQ. ID. No: 30代表的P25和P26引物而不是实施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P25引物扩增得到大小为390 bp的DNA片段，用HC和P26引物扩增得到大小为73 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体E100A。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体E100A可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI-ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-E100A。对人源化抗体的重链可变区的突变体E100A的核苷酸序列进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区E100A突变体正确插入上述重组表达载体。

10

15

20

4-2: 甘氨酸取代第101位氨基酸残基上的丙氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 31和SEQ. ID. No: 32代表的P27和P28引物而不是实施<1-1-1>相同方法中使用的P1和P2引物进行PCR。用HL和P27引物扩增得到大小为396 bp的DNA片段，用HC和P28引物扩增得到大小为68 bp的DNA片段。用上述两种DNA片段作为模板及HL和HC引物对进行连接这两个片段的重组PCR反应，得到大小为448 bp的人源化抗体的重链可变区突变体A101G S100aA。用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体A101G可变区的两个末端后，本发明人通过将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI-ApaI*限制性酶切位点而构建了重组表达载体，并将它命名为pcDdA-HzSIIIh-A101G。对人源化抗体的重链可变区的突变体A101G的核苷酸序列进行分析后，本发明人发现人源化抗体的重链可变区A101G突变体正确插入上述重组表达载体。

25

30

4-3: 抗表面抗原S的抗原结合能力的测定

将上述实施例<4-1>和<4-2>构建的2个重组表达载体用实施例2和3的相同方法转染到COS细胞中后, 本发明人用间接ELISA法测定了选择转化体的抗原结合能力。结果, E100S的抗原结合能力类似于野生型的抗原结合能力, 而A101G表现略微降低的抗原结合能力。

从实施例3和<4-3>的结果, 本明确信在人源化重链突变体中, I34V, T54S, S65G和E100S 的抗原结合能力类似于野生型的。因此, 我们构建了同时含有所有这四种突变的重组突变体。

实施例5: 人源化重链基因的重组突变体

5-1: 重组突变体T54S+I34V的构建

为了构建含有T54S和I34V 突变的重组突变体, 用前面实施例<1-2-1>的重链基因表达载体pcDdA-HzSIIIh-T54S作为模板, 用实施例<1-1-1>的相同方法进行PCR和亚克隆。从中构建的表达载体被命名为pcDdA-HzSIIIh-T54S+I34V。

5-2: 重组突变体T54S+I34V+E100S的构建

为了构建含有T54S, I34V和E100S突变的重组突变体, 用前面实施例<5-1>的重链基因表达载体p pcDdA-HzSIIIh-I34V作为模板, 用实施例<1-1-1>的相同方法进行PCR和亚克隆。从中构建的表达载体被命名为pcDdA-HzSIIIh-T54S+I34V+E100S。

5-3: 重组突变体T54S+I34V+E100S+S65G的构建

为了构建含有T54S, I34V, E100S和S65G突变的重组突变体, 用前面实施例<5-2>的重链基因表达载体pcDdA-HzSIIIh-E100s作为模板, 用实施例<1-1-1>的相同方法进行PCR和亚克隆。结果构建了包含T54S, I34V, E100S 和 S65G 所有突变的重组表达载体 pcDdA-HzSIIIh-T54S+I34V+E100S+S65G, 将它命名为pcDdA-HzSIIIh。

在用限制性酶*Hind*III和*Apa*I消化上述pBlue-HzSIIIk-T89S DNA后得到人源化轻链突变体片段，本发明人通过将上述片段重新克隆到pCMV-dhfr表达载体的*Hind*III-*Apa*I位点，而构建了重组表达载体pCMV-dhfr-HzSIIIk-T91S，并将它命名为pCMV-dhfr-HzSIIIk-T91S。

5

实施例8: 具有人源化轻链突变体的人源化抗体的抗HBV表面抗原S的结合能力的测定

用实施例<7-1>和<7-2>得到的表达载体pCMV-dhfr-HzSIIIk-Q89L或pCMV-dhfr-HzSIIIk-T91S，和pRc/CMV-HC-HZIIS载体作为人源化抗体HZII-H67的重链表达载体，按照实施例2的相同方法转染COS7细胞后，对选择的转化体温育48小时。然后，通过夹层ELISA法测定上清液中的抗体浓度。按照实施例3的相同方法将抗体加到平板中，使各抗体的浓度分别为0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.8, 3.5和7 ng。作为对照，用pRc/CMV-HC-HZIIS和pKC-dhfr-HZIIS分别作为HZII-H67的重链和轻链表达载体，进行相同试验。结果如图9所示。

10
15

如图9所示，含有丝氨酸取代第91位氨基酸残基上的苏氨酸的T91S突变体的人源化轻链表现与野生型人源化抗体H2S-H67的重链相同程度的抗表面抗原S的结合能力。表达表现抗HBV表面抗原S的抗原结合能力的突变体T91S的表达载体pcDdA-HzSIIIk已于2000年9月22日保藏于韩国生命科学和生物技术研究所以(KRIBB)的韩国典型培养物收藏中心，保藏号为：KCTC 10084BP。对从表达载体pcDdA-HzSIIIk表达出来的人源化抗体HzS-IIIc的氨基酸序列分析后，本发明人发现它由包括SEQ. ID. No: 42代表的可变区氨基酸序列的人源化重链HzS-III-VL组成。

20
25

实施例9: 具有人源化重链和轻链重组突变体的人源化抗体(HzS-III) 的抗原结合能力的测定

用实施例<5-2>得到的人源化重链表达载体pCDdA-HzSIIIh和实施例<7-2>得到的人源化轻链表达载体pCMV-dhfr-HzSIIIk，按照实施例2的同样方法转染COS7细胞后，通过保温选择得到的转化体48小时而表达出

30

7-1: 亮氨酸取代第89位氨基酸残基上的谷氨酰胺的突变体的构建

为了构建人抗体的亮氨酸残基取代鼠源LCDR3的第89位氨基酸残基上的谷氨酰胺的突变体，用SEQ. ID. No: 33和SEQ. ID. No: 36代表的引物、用人源化抗体HZII-H67的轻链表达载体pKC-dhkr-HzIIS作为模板进行PCR和重组PCR(图6和图7)。

具体地说，用Taq DNA 聚合酶进行25次PCR循环，94℃ 30秒，55℃ 30秒和72℃ 1分钟。用SEQ. ID. No: 33和SEQ. ID. No: 36代表的LL和P29引物通过PCR扩增大小为336 bp的DNA片段，用SEQ. ID. No: 35和SEQ. ID. No: 36代表的P30和LC引物通过PCR扩增大小为273 bp的DNA片段。用上述两个DNA片段作为模板、LL和P29作为引物对，连接这两个片段而进行重组PCR反应，得到大小为743 bp的人源化抗体的轻链可变区突变体Q89L。用限制性酶*Hind*III和*Sa*I消化上述突变体Q89L可变区的两个末端后，本发明人通过将它们克隆到pBluescript KS+ (StrataGen)而构建了重组质粒pBlue-HzSIIIk-Q89L。对人源化抗体轻链可变区G89L突变体的核苷酸序列分析后，本发明人发现Q89L正确插入上述表达载体。在用限制性酶*Hind*III和*Apa*I消化上述pBlue-HzSIIIk-Q89L DNA后得到人源化轻链突变体片段，本发明人通过将上述片段重新克隆到pCMV-dhfr表达载体的*Hind*III-*Apa*I位点，而构建了重组表达载体(图7)，并将它命名为pCMV-dhfr-HzSIIIk-Q89L(图8)。

20

7-2: 丝氨酸取代第91位氨基酸残基上的苏氨酸的突变体的构建

用SEQ. ID. No: 33, SEQ. ID. No: 36, SEQ. ID. No: 37和SEQ. ID. No: 38代表的引物，在实施例<7-1>相同的反应条件下进行PCR。用LL和P31引物通过PCR扩增大小为369 bp的DNA片段，用P32和LC引物通过PCR扩增大小为391 bp的DNA片段。用上述两个DNA片段作为模板、LL和LC作为引物对，连接这两个片段而进行重组PCR反应，得到大小为743 bp的人源化抗体的轻链可变区突变体T91S。用限制性酶*Hind*III和*Sa*I消化上述突变体T91S可变区的两个末端后，本发明人通过将它们克隆到pBluescript KS+而构建了重组质粒。对人源化抗体轻链可变区T91S突变体的核苷酸序列分析后，本发明人发现T91S正确插入上述重组表达载体。

30

实施例6: 具有人源化重链重组突变体的人源化抗体的抗原结合能力的测定

将250 ng HBV的表面抗原S(Greencross Co.)加入到微平板的各孔中, 进行涂覆后, 用各重组表达载体或上述实施例<4-1>到<4-3>构建的
5 pKC-dhfr-HZIIS载体用实施例2中的相同方法转染COS7细胞。将含有上述转染细胞的各培养基加入平板, 使各抗体的浓度分别为0.625, 1.25, 2.5, 5, 10和20 ng。然后, 用实施例2的相同方法测定光密度。作为对照, 用pRc/CMV-HC-HZIIS和pKC-dhfr-HZIIS分别作为HZII-H67的重链和轻链表达载体进行同样的试验。结果如图5所示。

10

如图5所示, 分别含有 I34V+T54S, I34V+T54S+E100S 和 I34V+T54S+E100S+S65G的重组突变体的各人源化重链, 其中同时存在几种突变, 显示与野生型人源化抗体HZS-H67的重链几乎相同的针对表面抗原S的结合能力。针对HBV表面抗原S表现抗原结合能力的表达重链
15 重组突变体的表达载体pcDdA-HzSIIIh已于2000年9月22日保藏于韩国生命科学和生物技术研究(KRIBB)的韩国典型培养物收藏中心, 保藏号为: KCTC 10083BP。对从表达载体pcDdA-HzSIIIh表达出的人源化抗体HzS-III的氨基酸进行分析后, 本发明人发现它由包括SEQ. ID. No: 43代表的可变区氨基酸序列的人源化重链HzS-III-VH组成。

20

实施例7: 人源化轻链基因的突变

对于人源化轻链, 人源化抗体HZII-H67的LCDR1和LCDR2已经具有来自人抗体的氨基酸残基。因此, 本发明人试图改变LCDR3中的氨基酸残基。具体地说, 为了将人源化抗体HZII-H67的LCDR3区中的鼠源氨基酸残基改变为人抗体的氨基酸残基, 本发明人将人源化轻链的氨基酸
25 序列和与其具有高度同源性的人源化B1抗体的轻链的LCDR3氨基酸序列进行比较。从中, 本发明人推测鼠源LCDR3的第89和91位氨基酸残基上的谷氨酰胺和苏氨酸不直接涉及抗原结合。因此, 我们用人B1抗体上的相应轻链残基的亮氨酸和丝氨酸取代它们。

30

同时具有人源化重链和轻链重组突变的人源化抗体HzS-III。为了确定从培养基得到的上清液中存在人源化抗体HzS-III，用辣根过氧化物酶(Sigma Co.)与抗一人抗体(Fc特异性)结合而得到的第二抗体进行Western印迹分析。结果如图10所示，检测到大小约55 kDa的人源化重链和大小约27 kDa的人源化氢链。因此，本发明人发现本发明的人源化抗体被正确表达并从转化体中分泌出来。

通过夹层ELISA法测定了上清液中的分泌抗体的浓度后，用实施例3的同样方法将抗体加入涂覆有HBV表面抗原S的平板中，使各抗体的浓度分别为0.625, 1.25, 2.5, 5, 10和20 ng。作为对照，分别用pRc/CMV-HC-HZIIS和pKC-dhfr-HZIIS作为HZII-H67的重链和轻链表达载体进行相同试验。结果如图11所示。

如图11所示，同时具有人源化重链和轻链重组突变的人源化抗体HzS-III表现几乎与野生型人源化抗体 HZS-H67(H/K)相同程度的抗表面抗原S的结合能力。

实施例10: 人源化抗体HzS-III的抗原结合亲和性的测定

用比较ELISA法测定人源化抗体HzS-III的抗原结合亲和性 (竞争性ELISA, Ryu等, *J. Med. Virol.*, 52, 226, 1997)。将5 ng从实施例8的COS7细胞产生的人源化抗体HzS-III和表面抗原S (from 1×10^{-7} M到 1×10^{-12} M)在37°C预先保温3小时后，将混合物加入预先涂覆有表面抗原S的96孔平板中。使孔平板在37°C反应3小时后，用实施例3的相同方法通过ELISA测定光密度(图12)。作为的对照，使用人源化抗体HZII-H67。

结果发现本发明的人源化抗体HzS-III的抗原结合亲和性约为 4×10^9 M⁻¹，它与对照HZII-H67 (3.2×10^9 M⁻¹)并没有很大差异。

实施例11: 结合MHC II类分子的肽序列从人源化抗体HzS-III中去除的人源化抗体HzS-IV的构建

本发明人用 Sturniolo's 法 (TEPITOPE) (Sturniolo 等, *Nature*

Biotechnology, 17, 555-561, 1999)考察上述人源化抗体HzS-III中是否存在结合MHC II类分子的肽序列。另外，本发明人从与上述人源化抗体表现高度同源性的人种系DP-25蛋白中检索序列，然后将它排除考虑。

5 结果发现人源化重链上有2段肽序列结合MHC II类分子。第一段肽具有SEQ. ID. No: 44代表的氨基酸序列，发现它结合51个MHC II类分子中的22个。第二个肽具有SEQ. ID. No: 45代表的氨基酸序列，并发现它结合14个MHC II类分子(表1)。

<表1> 人源化重链H2SIIIh的TEPITOPE分析结果

肽	取代前	取代后	取代前	取代后
	WVRQAPGK S (SEQ.ID.No.4 4)	WVKQAPGKT (SEQ.ID.N o.46)	FQGRVTLTV (SEQ.ID.No.4 5)	FQGRVDLTV (SEQ.ID.N o.47)
结合肽的 MHC II类 分子	DRB1_0101	DRB1_0101	DRB1_0402	DRB1*1502
	DRB1_0301	DRB1_0305	DRB1_0421	
	DRB1_0305	DRB1_0309	DRB1_0701	
	DRB1_0309	DRB1_1101	DRB1_0703	
	DRB1_0401	DRB1_1307	DRB1_0801	
	DRB1_0405	DRB1_1321	DRB1_0802	
	DRB1_0408	DRB5_0101	DRB1_0804	
	DRB1_0421	DRB1_0105	DRB1_0806	
	DRB1_0426		DRB1_0813	
	DRB1_0801		DRB1_0817	
	DRB1_0802		DRB1_1101	
	DRB1_1101		DRB1_1114	
	DRB1_1102		DRB1_1120	
	DRB1_1104		DRB1_1128	
	DRB1_1106		DRB1_1302	
	DRB1_1107		DRB1_1305	
	DRB1_1114		DRB1_1323	
	DRB1_1120		DRB1_1502	
	DRB1_1121			
	DRB1_1128			
	DRB1_1302			
	DRB1_1305			
	DRB1_1307			
	DRB1_1311			
	DRB1_1321			
	DRB1_1322			
	DRB1_1323			
	DRB5_0101			
	DRB5_0105			
总数	29	8	18	1

LCDR1, LCDR2, LCDR3上比小鼠单克隆抗体H67和人源化抗体HZII-H67的相应部位含有较少的鼠源氨基酸残基, 并且HzS-IV比HzS-III含有较少的能够结合MHC II类分子的氨基酸序列。因此, 本发明的人源化抗体HzS-III和HzS-IV能够成为预防乙肝病毒的优秀候选, 因为它们比现有技术的人源化抗体诱导较低的HAMA应答。

工业实用性

如上所述, 通过用重链HCDR1, HCDR2, HCDR3和轻链LCDR1, LCDR2, LCDR3上的人源化氨基酸残基取代鼠源氨基酸残基而使本发明的抗HBV表面抗原S的人源化抗体比现有技术的人源化抗体更加人源化。而且, 通过减少FR区中可能结合MHC II类分子的氨基酸序列而显著降低在人体中的免疫原性可能性, 并表现优秀的抗原结合亲和性。因此, 本发明的人源化抗体能够用于预防乙肝病毒感染。

15

为了减弱肽与MHC II分子的结合亲和性，本发明人用苏氨酸取代SEQ. ID. No: 44代表的氨基酸序列P9位上的丝氨酸，用天冬氨酸取代SEQ. ID. No: 45代表的氨基酸序列P6位上的苏氨酸。结果，对于SEQ. ID. No: 44，可以结合肽的MHC II类分子的数目降低到11个(55%)。对于SEQ. ID. No: 45，在51个MHC II类分子中仅有1个分子可以结合肽。

因此，为了生产针对MHC II类分子结合亲和性减弱的人源化重链，构建了具有S44T和T68D突变的S44T/T68D突变体，其中苏氨酸取代第44位上的丝氨酸（用SEQ. ID. No: 46和47代表的引物对）以及天冬氨酸取代第68位上的苏氨酸（用SEQ. ID. No: 48和49代表的引物对）。

用限制性酶*EcoRI*和*ApaI*消化上述突变体 S44T/T68D的可变区的两个末端后，本发明人将上述片段克隆到pcDdA-HC表达载体的*EcoRI*-*ApaI*限制性酶切位点，而构建了重组表达载体。该表达载体已经于2001年9月26日保藏于韩国生命科学和生物技术研究所以(KRIBB)的韩国典型培养物收藏中心，保藏号为：KCTC 10080BP。

将人源化重链表达载体pcDdA-HzSIVh和人源化轻链表达载体pCMV-dhfr-HzSIIIk转染到动物细胞系后，将上述转化体温育48小时而从中表达人源化抗体HzS-IV。测定得到的上清液中存在的人源化抗体HzS-IV的抗原结合亲和性，发现本发明的人源化抗体HzS-IV显示与人源化抗体HzS-III几乎相同程度的结合亲和性(参见图12)。

实施例12: 人源化抗体HzS-III和HzS-IV的氨基酸序列比较

将人源化抗体HzS-III和HzS-IV的重链 / 轻链可变区的氨基酸序列与野生型小鼠单克隆抗体H67和人源化抗体HZII-H67的氨基酸序列作比较。

结果如图13和图14所示，本发明的人源化抗体HzS-III和HzS-IV预期可能产生较低的HAMA应答，因为人源化抗体HzS-III和HzS-IV的重链 / 轻链可变区的氨基酸序列在重链的HCDR1, HCDR2, HCDR3或轻链的

<210>	4		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P1		
<400>	4		
	cccactgaac gttgtagtca gtg		23
<210>	5		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P2		
<400>	5		
	ctacaacgtt cagtgggtgc gcaag		25
<210>	6		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	HC		
<400>	6		
	gatgggccct tggtaggagc		20
<210>	7		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P3		
<400>	7		
	cgcaccagc taatgttgta gtcagtg		27
<210>	8		

序列表

- <110> 韩国生命工学研究院所
- <120> 抗乙肝病毒表面抗原S的人源化抗体及其制备方法
- <130> 1fpo-09-05
- <150> KR10-2000-0057891
<151> 2000-10-02
- <150> KR10-2001-0060966
<151> 2001-09-29
- <160> 49
- <170> KopatentIn 1.55
- <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠
- <400> 1
Asp Tyr Asn Ile Gln
1 5
- <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 人
- <400> 2
Asp Tyr Asn Val Asp
1 5
- <210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> HL
- <400> 3
gagaattcac attcagatg tacttg

<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P4		
<400>	8		
	caacattaac tgggtgcgcc aggcccc		27
<210>	9		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P5		
<400>	9		
	gtaaggatac atatatccca tccactcaag		30
<210>	10		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P6		
<400>	10		
	gggatatatg tatccttaca ctggtgg		27
<210>	11		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P7		
<400>	11		
	cagtaccacc actgtaagga taaatatac		30
<210>	12		
<211>	26		

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P8	
<400>	12	
	ccttacagtg gtaggtactgg ctacag	26
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P9	
<400>	13	
	gtgactctgc cctggaactt ctgg	24
<210>	14	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P10	
<400>	14	
	ccagggcaga gtcacattga ctg	23
<210>	15	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P11	
<400>	15	
	gtaacatag gctcttgac agtaatagac	30
<210>	16	
<211>	28	
<212>	DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> P12

<400> 16

gtgcaagagc ctatggttac gacgagtc

28

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P13

<400> 17

gtaaccggcg tttcttgac agtaatag

28

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P14

<400> 18

caagaaacgc cggttacgac gagtctg

27

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P15

<400> 19

gtcgtaggca tagtttcttg cacag

25

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>		
<223>	P16	
<400>	20	
	gaaactatgc ctacgacgag tctgcctac	29
<210>	21	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P17	
<400>	21	
	ctcgtcggca ccatagtttc ttgcac	26
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P18	
<400>	22	
	ctatggtgcc gagtctgctt actg	24
<210>	23	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P19	
<400>	23	
	cagactcggc gtaacatag tttcttg	27
<210>	24	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	P20	
<400>	24	
	ggttacggcg agtctgctta ctgggg	26
<210>	25	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P21	
<400>	25	
	cagaggcgtc gtaaccatag tttc	24
<210>	26	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P22	
<400>	26	
	ggttacgacg cctctgctta ctggggc	27
<210>	27	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P23	
<400>	27	
	gtaagcggcc tcgtcgtaac catgg	25
<210>	28	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	P24	
<400>	28	
	gacgaggccg cttactgggg ccaagg	26
<210>	29	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P25	
<400>	29	
	gtaagcagac gagtcgtaac catag	25
<210>	30	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P26	
<400>	30	
	cgactcgtct gcttactggg gccaaag	26
<210>	31	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P27	
<400>	31	
	ccagtaacca gactcgtcgt aacc	24
<210>	32	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P28	

<400>	32		
		cgagtctggt tactggggcc aaggg	25
<210>	33		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	LL		
<400>	33		
		caaagcttgg aagcaagatg gaatca	26
<210>	34		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P29		
<400>	34		
		ccttagtttg cagacagaaa taatttgcag	30
<210>	35		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P30		
<400>	35		
		ctgtctgcaa actaaggcgg ttccg	25
<210>	36		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	LC		

<400> 36
gaagtcgacc taacactctc ccctgtt 27

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> P31

<400> 37
cctccttact ttgctgacag aaataatttg 30

<210> 38
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> P32

<400> 38
gtcagcaaag taaggagggtt ccgtacac 28

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 39
Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 40
Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 41

Asn Tyr Gly Tyr Asp Glu Ser Ala

1

5

<210> 42

<211> 112

<212> PRT

<213> 人 HzS-III-VL

<400> 42

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly

1

5

10

15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Asn Tyr

20

25

30

Gly Ile Asn Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35

40

45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Lys Gly Thr Gly Val Pro Ala

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn

65

70

75

80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85

90

95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

110

<210> 43

<211> 118

<212> PRT

<213> 人 HzS-III-VH

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	
<210>	46	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P33	
<400>	46	
ggaaagaccc ttgagtggat ggg		23
<210>	47	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P34	
<400>	47	
ctcaagggtc tttccggggg cc		22
<210>	48	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P35	
<400>	48	
gcagagtcga tttgactgta gacaattc		28
<210>	49	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	P36	

<400> 49

cagtcaaatc gactctgccc tggaac

26

NL GAA TTC ACA TTC ACG ATG TAC TTG GGA CTG AAC TAT GTA TTC ATA GTT TTT CTC TTA AAT GGT GTC CAG AGT
 H2II-67 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 -V_H GAG GTT CAG CTG GTG CAA TCT GGA GCC GAG GTG AAG AAA CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTA TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAT
 突变体 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 GAG GTT CAG CTG GTG CAA TCT GGA GCC GAG GTG AAG AAA CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTA TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAT

CDR1 CDR2
 Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Gly
 ACA TTC ACT GAC TAC AAC ATT CAG TGG GTG CGC CAG GCC CCC GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATG GGA TAT ATT TAT CCT TAC ACT GGT
 Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met Gly Tyr Met Tyr Pro Tyr Ser Gly
 ACA TTC ACT GAC TAC AAC GTT AAC TGG GTG CGC CAG GCC CCC GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATG GGA TAT ATG TAT CCT TAC AGT GGT

Gly Thr Gly Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Ser Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 GGT ACT GGC TAC AGC CAG AAG TTC CAG AGC AGG GTC ACA TTG ACT GTA GAC AAT TCC GCG AGC ACA GCC TAT ATG GAA CTC AGC AGC
 Gly Thr Gly Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 GGT ACT GGC TAC AGC CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACA TTG ACT GTA GAC AAT TCC GCG AGC ACA GCC TAT ATG GAA CTC AGC AGC

CDR3
 Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Gly Tyr Asp Glu Ser Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAC TAT GGT TAC GAC GAG ACG GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC
 Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA GCC GCC GCC GCC GCC GCC GGT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC

Ser
 TCG
 P11 ← P12 →
 P13 ← P14 →
 P15 ← P16 →
 P17 ← P18 →
 P19 ← P20 →
 P21 ← P22 →
 P23 ← P24 →
 P25 ← P26 →
 Thr Val Ser Ser
 ACT GTC TCT TCA
 Thr Val Ser Ser
 ACT GTC TCT TCA
 GCC TCC ACC AAG GGC CCA TC
 ← HC

图 1

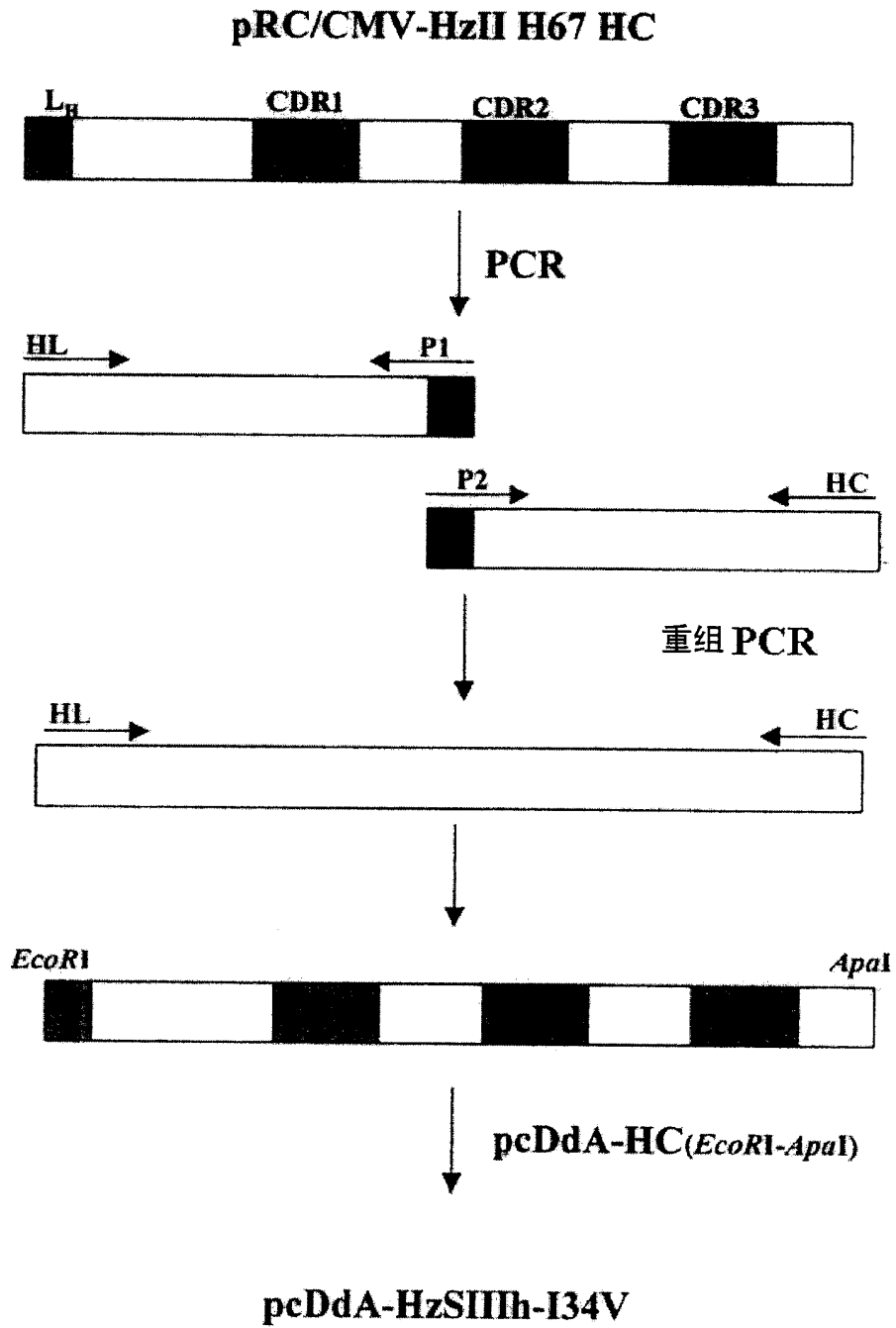


图 2

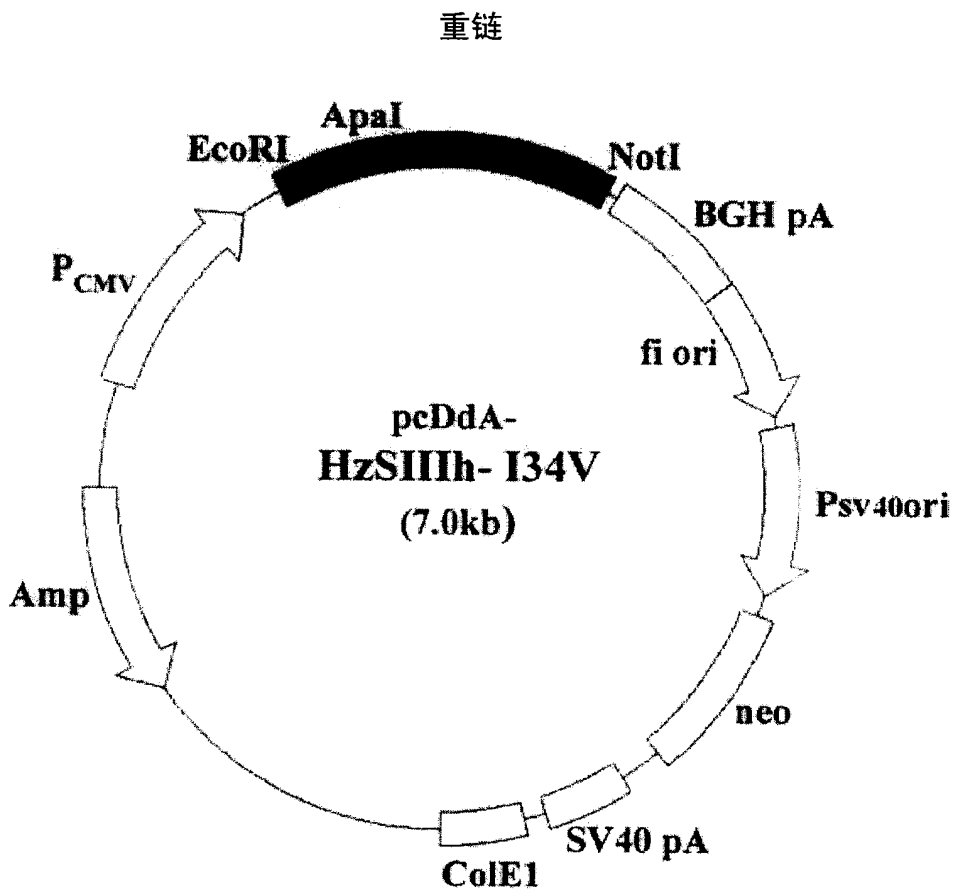


图 3

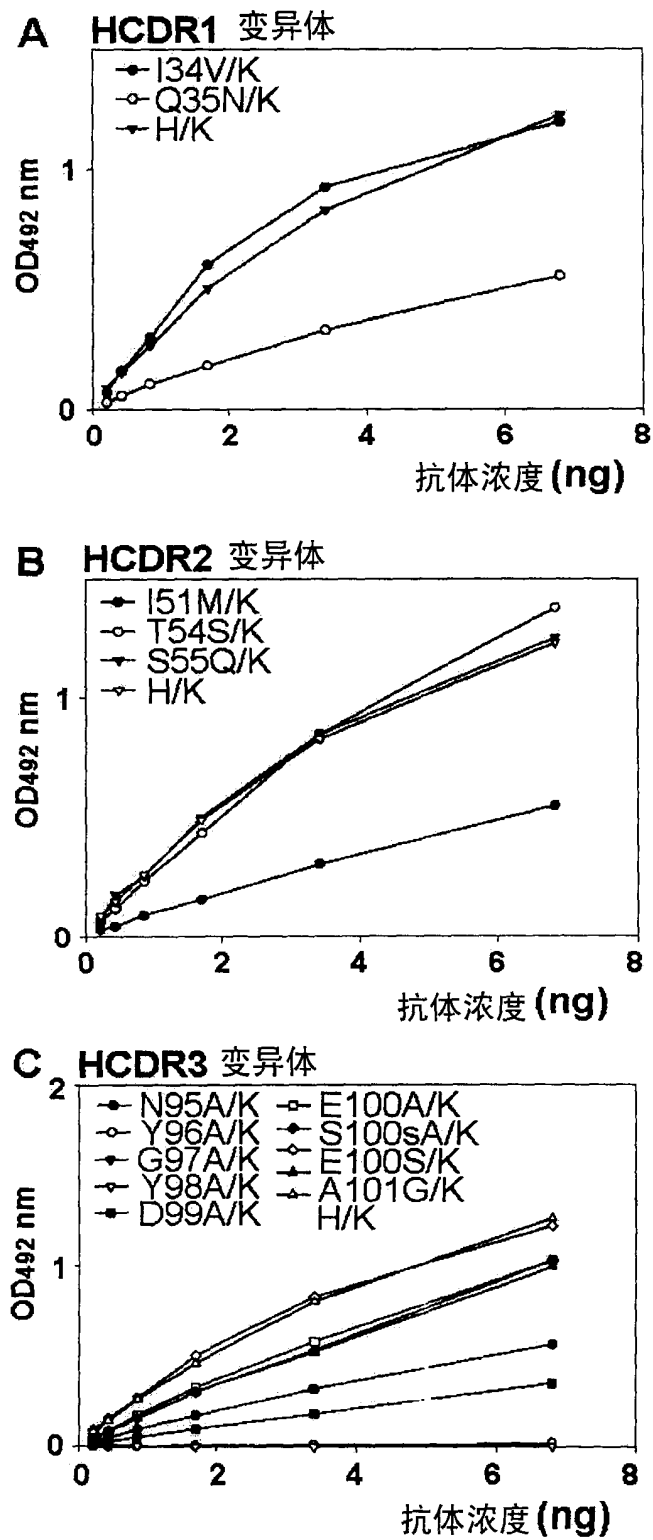


图 4

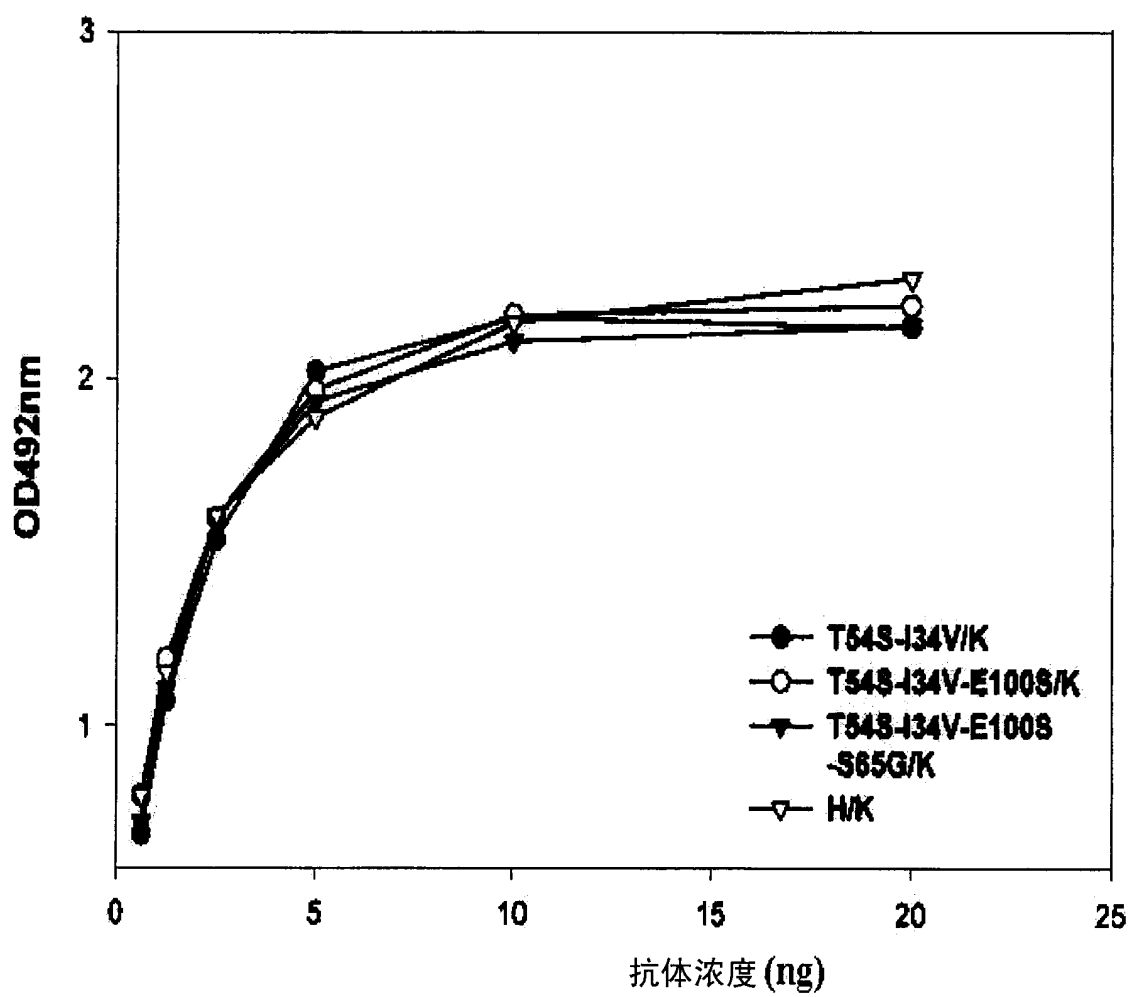


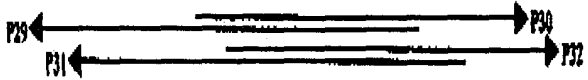
图 5

LA AAG CTT GGA AGC AAG ATG GAT TCA CAG GCC CAG GTT CTT ATG TTA CTG CTG CTA TGG GTA TCT GGT ACC TGT GGG
 H2II-H57 LL →
 -V₁ Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
 GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CCA GGG CAG AGG GCC ACC ATC ACC TGC AGA GCC AGC GAA
 Mutants Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
 GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CCA GGG CAG AGG GCC ACC ATC ACC TGC AGA GCC AGC GAA

CDR1 Ser Val Ser Asn Tyr Gly Ile Asn Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser
 AGT GTT AGT AAT TAT GGC ATT AAT TTT ATT AAC TGG TTC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT ACT GCA TCC
 Ser Val Ser Asn Tyr Gly Ile Asn Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser
 AGT GTT AGT AAT TAT GGC ATT AAT TTT ATT AAC TGG TTC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT ACT GCA TCC

Asn Lys Gly Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Glu
 AAC AAA GGA ACC GGG GTC CCT GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACA ATC AAT CCT GTG GAG GCT GAA
 Asn Lys Gly Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Glu
 AAC AAA GGA ACT GGG GTC CCT GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACA ATC AAT CCT GTG GAG GCT GAA

CDR3
 Asp Thr Ala Asn Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 GAT ACT GCA AAT TAT TTC TGT CAG CAA ACT AAG GAG GTT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG
 Asp Thr Ala Asn Tyr Phe Cys Leu Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 GAT ACT GCA AAT TAT TTC TGT CTG CAA AGT AAG GAG GTT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG ACT GTG



GGTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG
 AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGA
 GAAACACAAAGTCTACGCCCTCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGTGCACTTC
 ← LC

图 6

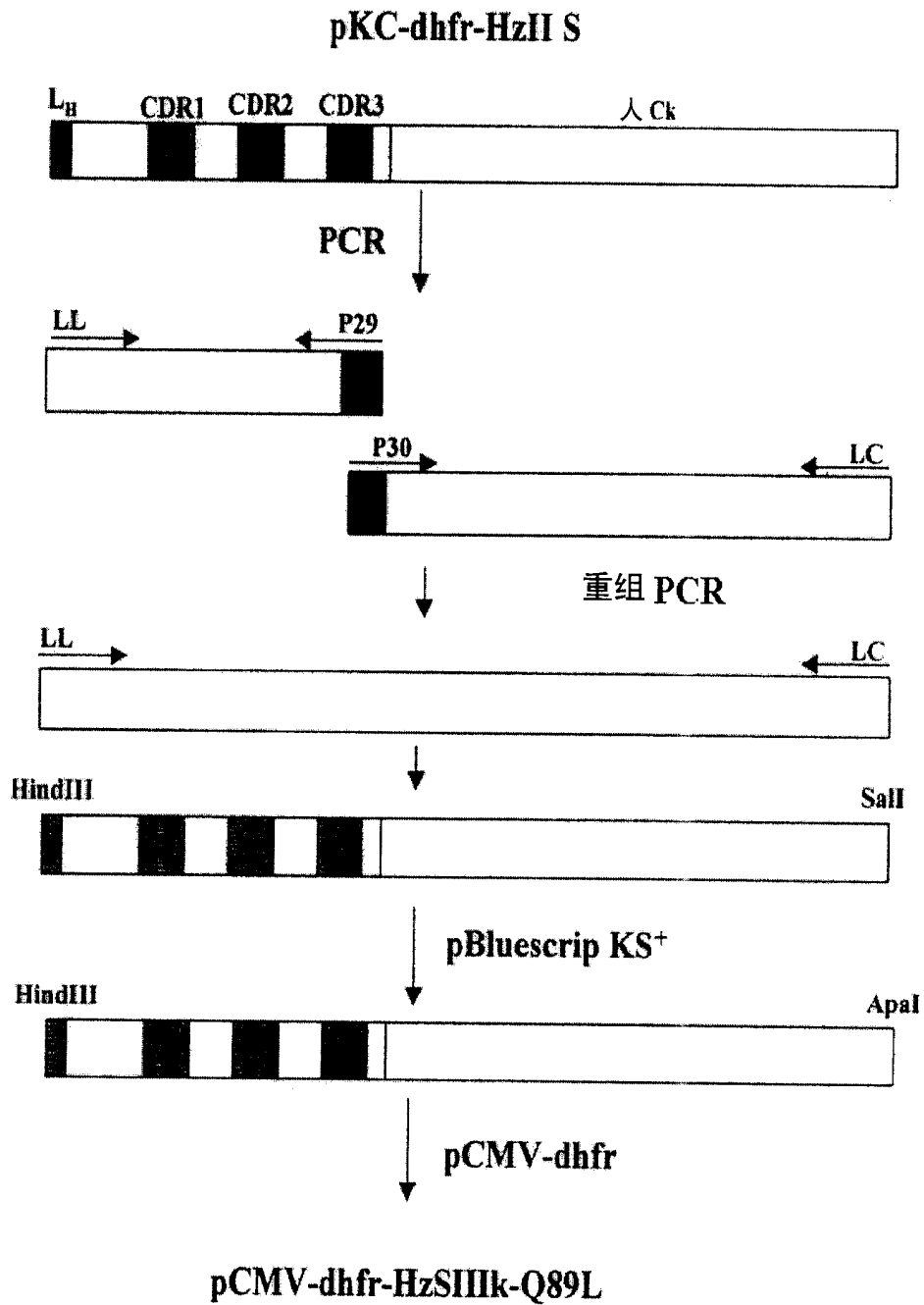


图 7

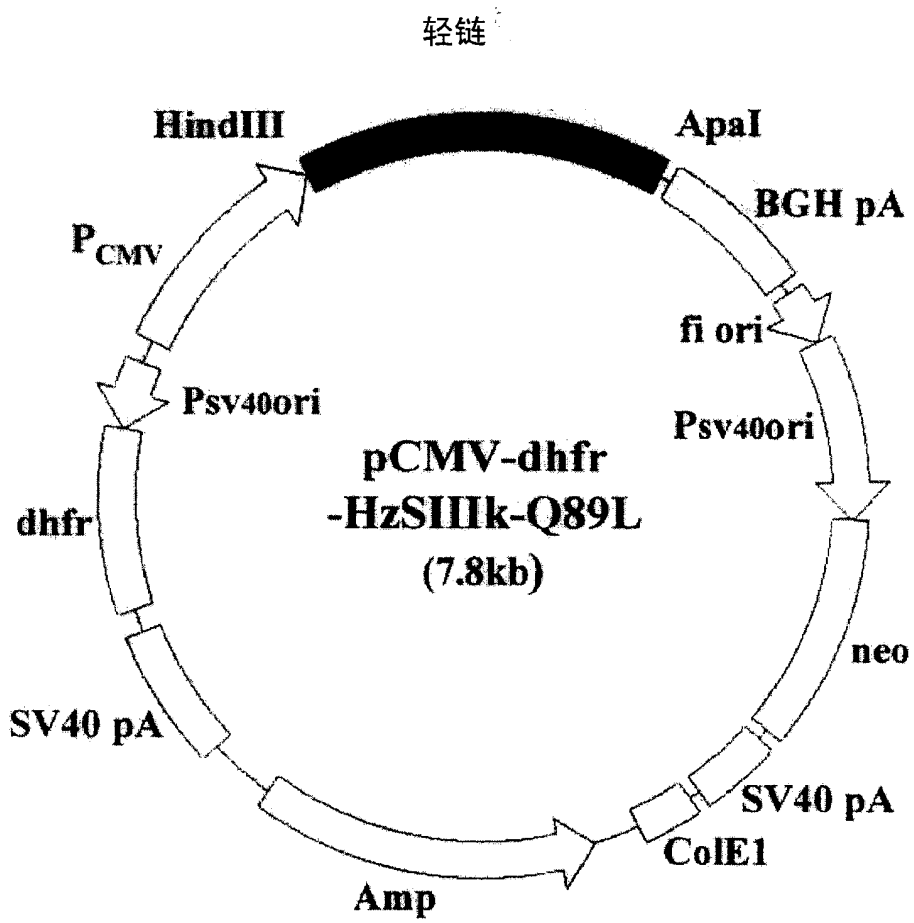


图 8

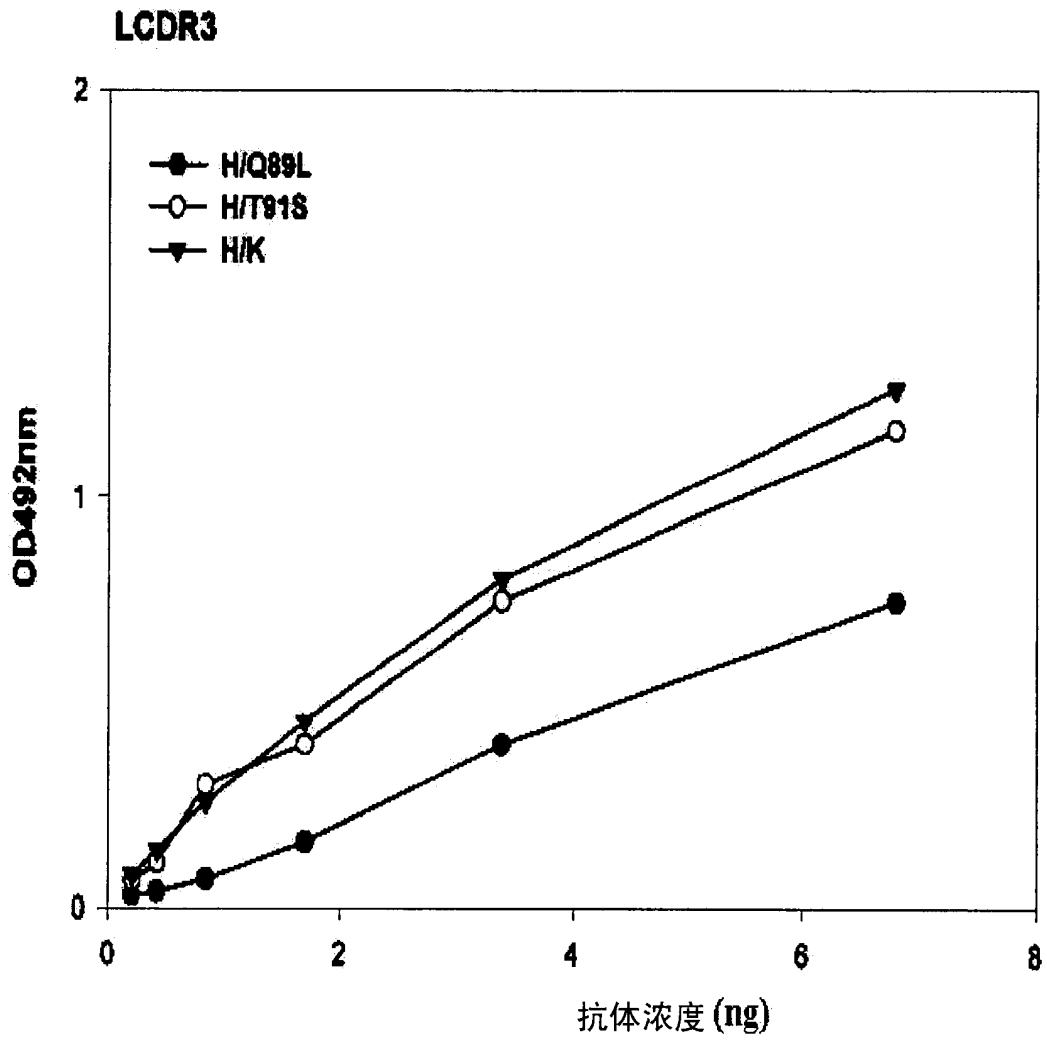


图 9

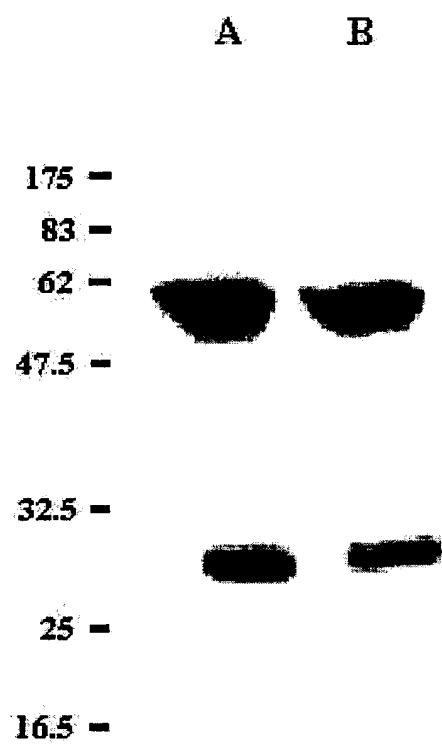


图 10

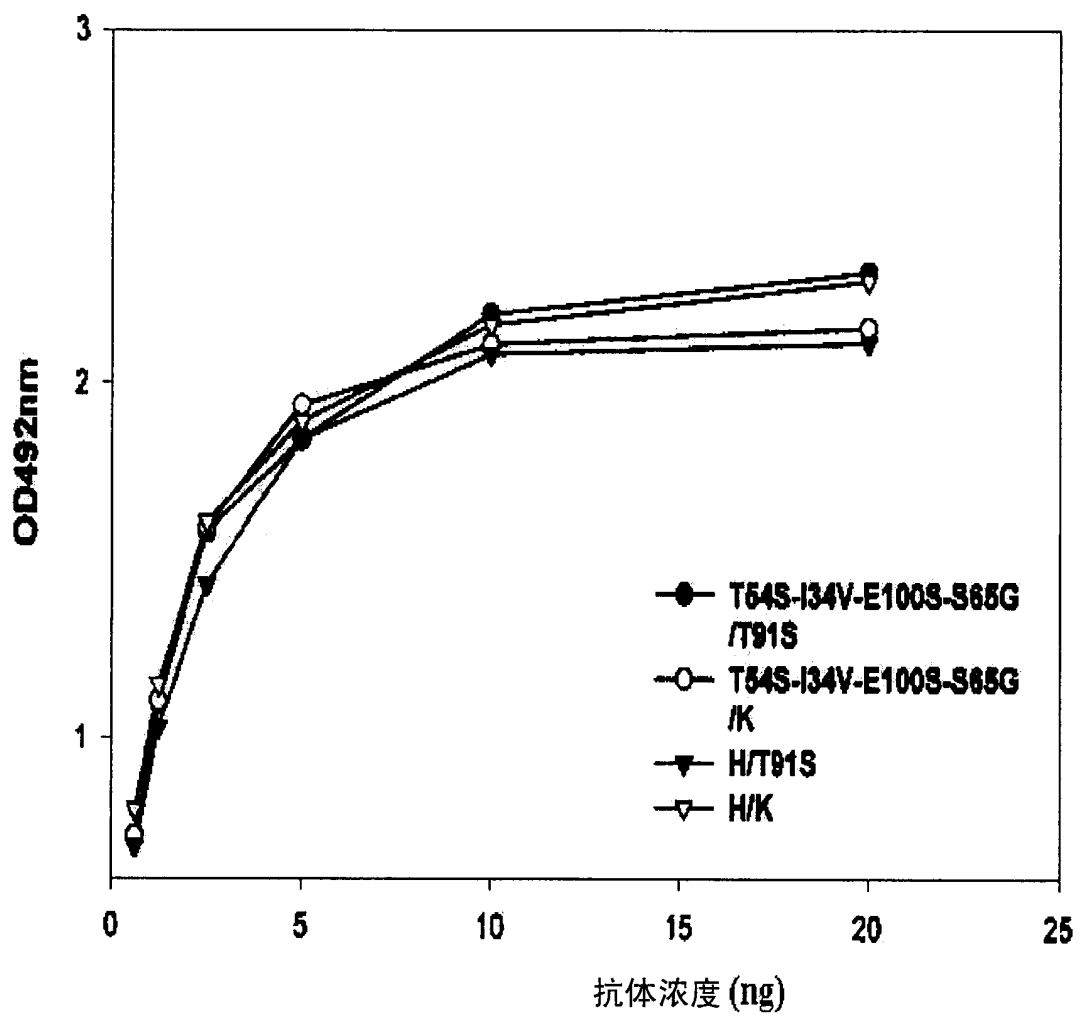


图 11

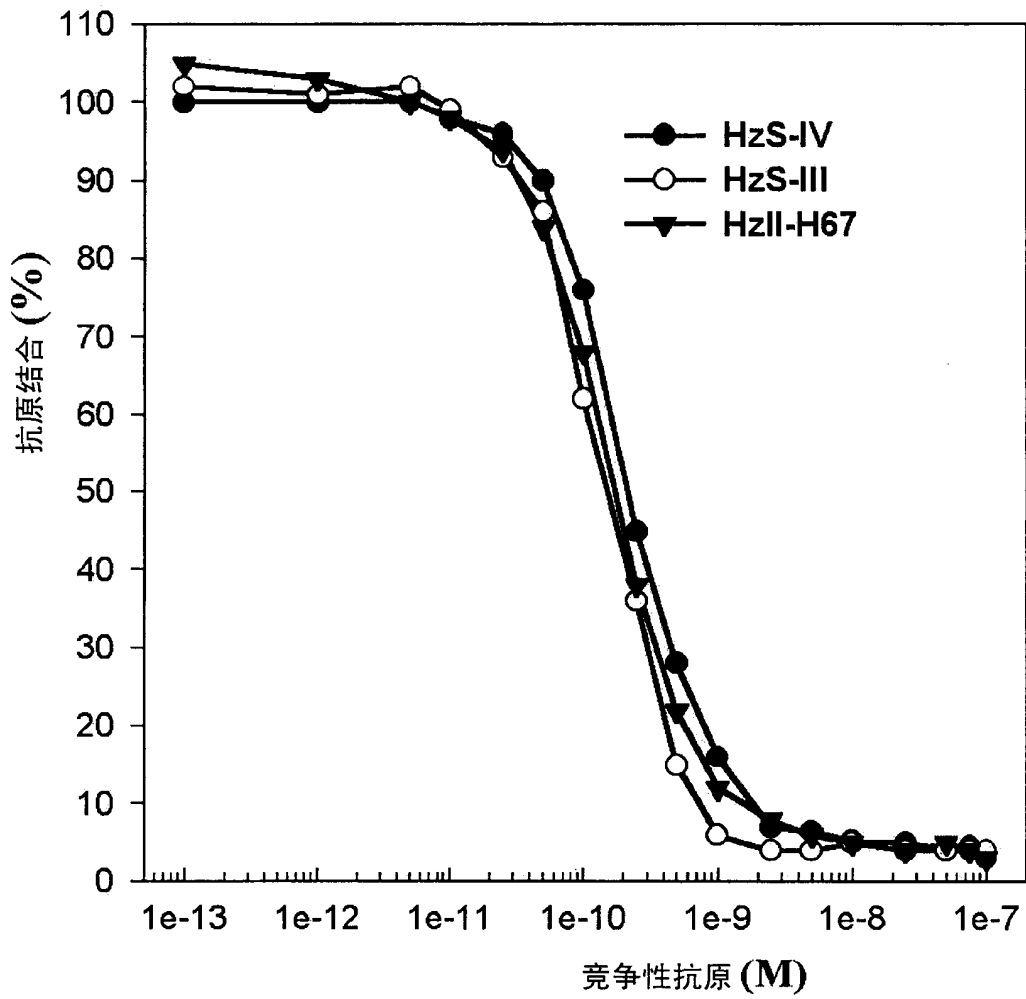


图 12

H67-V_H Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 人 (DP-25) Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 HZII-H67-V_H Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 HzS-III-V_H Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 HzS-IV-V_H Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

CDR1

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Gln Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Val Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Val Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Thr Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser

CDR2

Gly Gly Thr Gly Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Phe Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
 Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
 Gly Gly Thr Gly Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Ser Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
 Gly Gly Thr Gly Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
 Gly Gly Thr Gly Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Asp Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser

CDR3

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Gly Tyr Asp Glu Ser Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 Ser Leu Arg Ser Phe Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Gly Tyr Asp Glu Ser Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

Val Thr Val Ser Ala

Val Thr Val Ser Ser

Val Thr Val Ser Ser

Val Thr Val Ser Ser

图 13

H67-V₁ Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 人 (B1) Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 H2II-H67-V₁ Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 H2S-III-V₁ Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

CDR1

CDR2

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala
 Glu Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala
 Glu Ser Val Ser Asn Tyr Gly Ile Asn Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala
 Glu Ser Val Ser Asn Tyr Gly Ile Asn Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala

Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Val
 Ser Asn Lys Asp Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala
 Ser Asn Lys Gly Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala
 Ser Asn Lys Gly Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala

CDR3

Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys Asn Phe Pro
 Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

图 14