



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.12

(21) Номер заявки
202191706

(22) Дата подачи заявки
2019.12.18

(51) Int. Cl. *C07K 16/08* (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗИРУЮЩИЕ ВИРУС ГЕПАТИТА В, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/782,274; 62/860,085

(32) 2018.12.19; 2019.06.11

(33) US

(43) 2021.10.28

(86) PCT/US2019/067216

(87) WO 2020/132091 2020.06.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХУМАБС БИМЕД СА (CH)

(72) Изобретатель:
Корти Давиде (CH)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2017059878
WO-A1-2017060504

HINTON PAUL R ET AL.: "An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 176, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 346-356, XP002482524, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/JIMMUNOL.176.1.346 table II

TIMOTHY T. KUO ET AL.: "Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics", MABS, 1 September 2011 (2011-09-01), pages 422-430, XP055079703, DOI: 10.4161/mabs.3.5.16983 table 1 paragraph "LS" spanning pages 426-427

US-B2-8802820

WO-A2-2017106346

KARIN KREBS ET AL.: "T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor That Binds Hepatitis B?Virus Envelope Proteins Control Virus Replication in Mice", GASTROENTEROLOGY: OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN GASTROENTEROLOGICAL ASSOCIATION, vol. 145, no. 2, 1 August 2013 (2013-08-01), pages 456-465, XP055236846, US ISSN:

0016-5085, DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.047 the whole document

HO ET AL.: "Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines", PHARMACEUTICAL BIOPROCESSING, vol. 1, no. 1, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 71-87, XP008180553, the whole document

AVIDAN U. NEUMANN ET AL.: "Novel mechanism of antibodies to hepatitis B virus in blocking viral particle release from cells", HEPATOLOGY, vol. 52, no. 3, 25 May 2010 (2010-05-25), pages 875-885, XP55727361, ISSN: 0270-9139, DOI: 10.1002/hep.23778 the whole document

DAN LI ET AL.: "A potent human neutralizing antibody Fc-dependently reduces established HBV infections", ELIFE, vol. 6, 26 September 2017 (2017-09-26), pages 1-30, XP55727358, DOI: 10.7554/eLife.26738 introduction, discussion, Fig. 4

GAO YING ET AL.: "Antibody-mediated immunotherapy against chronic hepatitis B virus infection", HUMAN VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS, TAYLOR & FRANCIS, US, vol. 13, no. 8, 1 January 2017 (2017-01-01), pages 1768-1773, XP009502684, ISSN: 2164-5515, DOI: 10.1080/21645515.2017.1319021 the whole document

WO-A2-2018207023

DILILLO DAVID J ET AL.: "Differential Fc-Receptor Engagement Drivers an Anti-tumor Vaccinal Effect" CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 161, no. 5, 11 May 2015 (2015-05-11), pages 1035-1045, XP029129128, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2015.04.016 the whole document

FURMAN JENNIFER L ET AL.: "Early Engineering Approaches to Improve Peptide Developability and Manufacturability", THE AAPS JOURNAL, SPRINGER US, BOSTON, vol. 17, no. 1, 23 October 2014 (2014-10-23), pages 111-120, XP035420767, DOI: 10.1208/S12248-014-9681-9 [retrieved on 2014-10-23] pages 113,115

US-A1-2018244756

(57) Настоящее изобретение относится к антителам и к их антигенсвязывающим фрагментам, которые могут связываться с областью антигенной петли поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) и могут нейтрализовать инфекцию, вызываемую вирусом гепатита В (HBV) и вирусом гепатита дельта (HDV). Настоящее изобретение также относится к эпитопам, с которыми связываются антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также к гибридным белкам, которые содержат антигенсвязывающие фрагменты, и к нуклеиновым кислотам, которые кодируют их, а также к клеткам, которые продуцируют такие антитела и фрагменты антител. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению антител и фрагментов антител согласно изобретению для диагностики, профилактики и лечения гепатита В и гепатита D.

Заявление относительно списка последовательностей

Список последовательностей, представленный в настоящей заявке, приводится в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в настоящее описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий Список последовательностей, имеет название 930485_402_WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл имеет размер 109 кБ, был создан 16 декабря, 2019 и подан в электронном виде на EFS-Web.

Настоящее изобретение относится к области иммунотерапии заболевания, вызываемого вирусом гепатита В (HBV) и вирусом гепатита дельта (HDV) и к ее применению. Описанные здесь белки, связывающиеся с вирусом гепатита В, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, способны связываться с эпитопом, расположенным в области антигенной петли S-домена оболочечных белков HBV (HBsAg). В некоторых вариантах осуществления изобретения, белки, связывающиеся с вирусом гепатита В, могут связываться с любым или всеми известными генотипами HBsAg, а также с вариантами HBsAg и могут нейтрализовать HBV-инфекцию. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют такие связывающие белки, и к клеткам-хозяевам, экспрессирующим эти белки. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам применения описанных здесь антител и фрагментов антител для диагностики, профилактики и лечения заболеваний, а также к способам скрининга.

Как было описано ранее, HBV состоит из (i) оболочки, содержащей три родственных поверхностных белка (поверхностного антигена гепатита В, HBsAg) и липид, и (ii) икосаэдрического нуклеокапсида, включающего геном вирусной ДНК и ДНК-полимеразу. Капсид HBV образуется в цитозоле инфицированной клетки во время упаковки комплекса репликации РНК-прегенама и приобретает способность к почкованию во время синтеза вирусной геномной ДНК посредством обратной транскрипции прегенама в просвете частицы. Три оболочечных белка HBV, S-HBsAg, М-HBsAg и L-HBsAg, образуют сложную трансмембранную складку в эндоплазматическом ретикулуме и связанные дисульфидными связями гомо- и гетеродимеры. Во время почкования во внутриклеточной мембране, короткий линейный домен в области ргеS цитозоля взаимодействует со связывающими участками на поверхности капсида. Затем вирионы секретируются в кровь. Кроме того, поверхностные белки могут почковаться в отсутствие капсидов и образовывать субвирусные частицы (SVP), которые также секретируются в 3-4 log-избытке по отношению к вирионам. Высокий уровень HBsAg может истощать HBsAg-специфический Т-клеточный ответ, а поэтому было высказано предположение, что он является фактором, играющим важную роль в вирусной иммунотолерантности у пациентов с хроническим гепатитом В (CHB) (Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF, Pathologie Biologie, 2010; 58: 258-66).

Вирус гепатита В вызывает потенциально опасные для жизни острые и хронические инфекции печени. Острый гепатит В характеризуется вирусемией с симптомами или без симптомов, и с риском возникновения острого гепатита (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Электронная публикация (Epub) в настоящее время находится в печати]). ВОЗ сообщает, что несмотря на эффективную вакцину против гепатита В, доступную с 1982 года, 240 миллионов человек инфицированы хроническим гепатитом В и более 780000 человек умирает каждый год из-за осложнений гепатита В. Приблизительно у одной трети пациентов с хроническим гепатитом В (CHB) развивается цирроз, печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома, и по оценкам специалистов, в год умирает 600000 человек (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Электронная публикация (Epub) в настоящее время находится в печати]).

Для пациентов, инфицированных HBV, тяжелые осложнения могут развиваться в результате коинфицирования или суперинфицирования вирусом HDV. Согласно данным ВОЗ, гепатитом D инфицированы приблизительно 15 миллионов человек во всем мире. HDV рассматривается как субвирусный сателлит, поскольку он может распространяться только в присутствии HBV. HDV является одним из наименее известных вирусов животных (40 нм), при этом его геном составляет только 1,6 т.п.о. и кодирует S и L HDAg. Все другие белки, необходимые для репликации генома HDV, включая РНК-полимеразу, обеспечиваются клеткой-хозяином, а оболочка HDV обеспечивается HBV. При введении в перmissive клетки, геном РНК HDV реплицируется и ассоциируется с множеством копий белков, кодируемых HDV с последующей сборкой рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса. RNP экспортируется из клетки оболочечными белками HBV, которые способны собирать липопротеиновые везикулы, мигрирующие в просвет компартмента перед аппаратом Гольджи с последующей секрецией. Кроме того, оболочечные белки HBV также обеспечивают механизм для нацеливания HDV на неинфицированную клетку, обеспечивая тем самым распространение HDV.

Осложнения, вызываемые HDV, включают, с достаточно высокой вероятностью, печеночную недостаточность при острых инфекциях и быстрое развитие цирроза печени с повышенной вероятностью развития рака печени при хронических инфекциях. В 20% случаев, в комбинации с вирусом гепатита В, гепатит D дает наибольшую смертность от всех инфекций, вызываемых вирусом гепатита (Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus

infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. Gut. 2000 Mar;46(3):420-6). Единственным апробированным лечением хронической HDV-инфекции является лечение интерфероном-альфа. Однако, лечение HDV интерфероном-альфа является относительно неэффективным и не очень хорошо переносится пациентами. Лечение интерфероном-альфа приводит к поддерживаемому вирусологическому ответу в течение шести месяцев после лечения у одной четверти пациентов. Кроме того, нуклеозидные (нуклеотидные) аналоги (NA) были протестированы при гепатите дельта, но они оказались неэффективными. Комбинированная терапия с использованием NA вместе с интерфероном также не дала желаемых результатов (Zaigham Abbas, Minaam Abbas Management Of Hepatitis delta: neopew therapeutic options. World J Gastroenterol 2015 August 28; 21 (32): 9461-9465). В соответствии с этим, необходимо разработать новые терапевтические подходы.

Краткое описание чертежей

Представленные здесь чертежи приводятся для иллюстрации предмета изобретения и включены для более подробного описания настоящего изобретения. Эти чертежи никоим образом не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

На фиг. 1 показано связывание HBC34-V7 и двух сконструированных антител согласно изобретению ("HBC34-V34"; "HBC34-V35") в указанных концентрациях с HBsAg adw (верхняя панель) и с HBsAg adr (нижняя панель), как было определено в прямых ELISA-анализах на основе антигена. Все антитела были получены в виде IgG1 (glm17, 1 аллотип).

На фиг. 2А-К показано связывание HBC34-V7, HBC34-V34 и HBC34-V35 со всеми известными генотипами HBsAg ((А)-(J), соответственно) и с контролем (К). Были использованы генотипические последовательности, представляющие антигенную внешнюю петлю HBsAg, как показано в примере 5 публикации РСТ № WO 2017/060504. Окрашивание проводили с помощью FACS. Концентрации антител указаны на оси x на графиках.

На фиг. 3А-V показано связывание *in vitro* (3А-3R) некоторых антител HBC с HBsAg и его нейтрализация (3S-3V). На фиг. 3А и 3В показано связывание HBC34-V7 и HBC34-V35, содержащих Fc-области дикого типа или их варианты, с HBsAg adw в прямом ELISA-анализе на основе антигена (2 эксперимента; данные "эксперимента 1" показаны на фиг. 3А, а данные "эксперимента 2" показаны на фиг. 3В). Кривые связывания антигена показаны в верхней панели каждого чертежа. Значения EC₅₀ (определенные путем построения кривых с помощью Graphpad Prism) показаны в средней панели каждого чертежа. Связывание с планшетами без покрытия (контроль) показано в нижней панели каждого чертежа. Fc-области: "HBC34v7" и "HBC34-V35"=Fc дикого типа; "HBC34-V35-MLNS"=Fc с M428L/N434S. "HBC34-V35-MLNS-GAALIE"=Fc с M428L/N434S/G236A/A330L/I332E. Было протестировано три партии HBC34-V35. Было также протестировано две партии HBC34-V35-MLNS, и две партии HBC34-v35-MLNS-GAALIE. Была использована одна партия HBC34-v7. На фиг. 3С-3Н показано связывание HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с клетками Expi293, экспрессирующими HBsAg от всех десяти известных генотипов HBV или контроля. Связывание определяли с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как средняя интенсивность флуоресценции (ось y) у трансфицированных популяций, как было определено путем стробирования сигнала, полученного с использованием ложнотрансфицированных клеток. Для каждого HbsAg были протестированы серийные разведения трех тестируемых препаратов (12 точек, 1 в 3, начиная с 10 мкг/мл). На фиг. 3I-3R показано связывание HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с клетками Expi293, экспрессирующими HBsAg от девятнадцати (19) вариантов HBsAg или контроля. Связывание определяли с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как средняя интенсивность флуоресценции трансфицированных популяций, как было определено путем стробирования сигнала, полученного с использованием ложнотрансфицированных клеток. Для каждого HbsAg были протестированы серийные разведения трех тестируемых препаратов (12 точек, 1 в 3, начиная с 10 мкг/мл). Концентрация антитела указана на оси x. На фиг. 3S и 3U проиллюстрирована нейтрализующая способность указанных антител HBC против генотипа D HBV, оцениваемая путем определения уровней HBsAg (вверху) и HbeAg (внизу) в супернатанте культуры клеток HBVD-инфицированных клеток HepG2, экспрессирующих NTCP. Данные представлены как среднее значение ± ср. кв. ош. для одного из двух независимых экспериментов. На фиг. 3T и 3V показаны значения EC₅₀. Геометрическое среднее и диапазон (в скобках) значений EC₅₀ определяли в двух независимых экспериментах.

На фиг. 4 проиллюстрирована нейтрализация (значение EC₅₀) отдельных генотипов HBV посредством HBC34-V35-MLNS-GAALIE с использованием системы псевдотипирования HDV.

На фиг. 5-8 показано влияние HBC34-V35 на уровни HBAg в сыворотке *in vivo* у мышей с моделью HBV-инфекции. Мышам SCID, инфицированным HBV генотипа С, трансплантировали первичные гепатоциты человека и вводили HBC34-V35 в концентрации 1, 5 или 15 мг/кг или PBS (контроль), как описано в примере 5. На фиг. 5 показана концентрация ДНК HBV в сыворотке до и после лечения. На фиг. 6 показана концентрация HBsAg в сыворотке до и после лечения. На фиг. 7 показана концентрация HBeAg в сыворотке до и после лечения. На фиг. 8 показана концентрация HBcAg в сыворотке до и после лечения. "Tmt"=лечение.

На фиг. 9A-F показано связывание HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с человеческими FcR. (A)-(E): связывание с FcγR, оцениваемое с помощью биослойной интерферометрии (BLI). His-меченные человеческие FcγR ((A) FcγRIIa, аллель H131; (B) FcγRIIa, аллель R131; (C) FcγRIIa, аллель F158; (D) FcγRIIa, аллель V158; (E) FcγRIIb) в концентрации 2 мкг/мл захватывали на сенсорах против пента-His в течение 6 минут. Затем FcγR-нагруженные сенсоры обрабатывали в течение 5 мин раствором кинетического буфера (pH 7,1), содержащим 2 мкг/мл каждого mAb (левая часть графика) в присутствии 1 мкг/мл фрагмента F(ab')₂ козьего антитела против человеческих IgG, то есть, фрагмента F(ab')₂, который является специфическим (для перекрестного сшивания человеческих mAb посредством Fab-фрагмента), с последующим проведением стадии диссоциации в том же буфере в течение дополнительных 4 мин (правая часть графика). Профили ассоциации и диссоциации измеряли в реальном времени и представляли как изменение картины интерференции с использованием Octet® RED96 (ForteBio). (F) In vitro связывание антител HBC34 с FcRn при различных значениях pH, как было определено с помощью биослойной интерферометрии (BLI). Момент времени 0 с означает переключение состояния буфера базовой линии на буфер, содержащий антитела. Момент времени 300 с (пунктирная вертикальная линия) означает переключение на контрольный буфер при соответствующем значении pH. Кривые указывают на профили ассоциации и диссоциации при изменении картины интерференции.

На фиг. 10 показано связывание HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с человеческим Clq, как было измерено с помощью Octet®. Сенсоры против человеческого Fab (CHI) были использованы для захвата посредством Fab-фрагмента полноразмерного mAb IgG1 HBC34v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE при 10 мкг/мл в течение 10 мин. Затем IgG-нагруженные сенсоры обрабатывали в течение 4 мин раствором кинетического буфера (pH 7,1), содержащим 3 мкг/мл очищенного человеческого Clq (левая часть графика), с последующим проведением стадии диссоциации в том же буфере в течение еще 4 мин (правая часть графика). Профили ассоциации и диссоциации измеряли в реальном времени и представляли как изменения картины интерференции с использованием Octet® RED96 (ForteBio).

На фиг. 11A и 11B показана in vitro активация человеческого FcγRIIa с помощью опосредованной рецепторами активации NFAT-опосредованного люциферазного репортера в сконструированных клетках Jurkat. Активацию FcγRIIa тестировали с помощью апробированного коммерчески доступного анализа с использованием биорепортера, в котором рекомбинантный HBsAg (Engerix B) использовали в качестве антигена-мишени. Серийные разведения HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE и контрольного (Ctr) mAb инкубировали с 0,2 мкг/мл HBsAg при 37°C в течение 25 мин. Эффекторные клетки Jurkat (Promega), экспрессирующие либо низкоаффинный FcγRIIa, аллель F158(A), либо высокоаффинный FcγRIIa, аллель V158(B), ресуспендировали в буфере для анализа, а затем добавляли в планшеты для анализа. После инкубирования при 37°C в течение 24 ч добавляли реагент для анализа с использованием люциферазы Bio-Glo™ (Promega) и измеряли люминесценцию с использованием люминометра (Bio-Tek).

На фиг. 12A и 12B показана in vitro активация человеческого FcγRIIa с помощью опосредованной рецепторами активации NFAT-опосредованного люциферазного репортера в сконструированных клетках Jurkat. Активацию человеческого FcγRIIa тестировали с помощью апробированного коммерчески доступного анализа с использованием биорепортера, в котором рекомбинантный HBsAg (Engerix B) использовали в качестве антигена-мишени. Серийные разведения HBC34v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE и контрольного (Ctr) mAb инкубировали с 2 мкг/мл (A) или 0,2 мкг/мл (B) HBsAg при 37°C в течение 25 мин. Эффекторные клетки Jurkat (Promega), экспрессирующие высокоаффинный FcγRIIa, ресуспендировали в буфере для анализа, а затем добавляли в планшеты для анализа. После инкубирования при 37°C в течение 23 ч добавляли реагент для анализа с использованием люциферазы Bio-Glo™ (Promega) и измеряли люминесценцию с использованием люминометра (Bio-Tek).

На фиг. 13A и 13B показана in vitro активация человеческого FcγRIIb с помощью опосредованной рецепторами активации NFAT-опосредованного люциферазного репортера в сконструированных клетках Jurkat. Активацию человеческого FcγRIIb тестировали с помощью апробированного коммерчески доступного анализа с использованием биорепортера, в котором рекомбинантный HBsAg (Engerix B) использовали в качестве антигена-мишени. Серийные разведения HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE и контрольного (Ctr) mAb инкубировали с 1 мкг/мл HBsAg при 37°C в течение 15 мин. Эффекторные клетки Jurkat (Promega), экспрессирующие FcγRIIb, ресуспендировали в буфере для анализа, а затем добавляли в планшеты для анализа. После инкубирования при 37°C в течение 20 ч добавляли реагент для анализа с использованием люциферазы Bio-Glo™ (Promega) и измеряли люминесценцию с использованием люминометра (Bio-Tek). На фиг. 13B, контрольное mAb (фиг. 13A) обозначено как "Ctr mAb1". Второе контрольное mAb, обозначенное как "Ctr mAb2", представляет собой вариант HBC34-V35, включающий Fc IgG1 со следующими мутациями, которые усиливают связывание с FcγRIIb: G237D/P238D/H268D/P271G/A330R (Mimoto et al. Prot Eng Des Sel 26 (10): 589-598 (2013)).

На фиг. 14A и 14B показан in vitro цитолиз клеток человеческой гепатомы PLC/PRF/5 первичными человеческими NK-клетками в присутствии HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE. (A) ADCC тестировали с использованием свежих NK-клеток, выделенных у одного донора, ранее

генотипированного по экспрессии гетерозиготного FcγRIIIa (F/V) с высокой (V158) и низкой (F158) аффинностью. Серийные разведения HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS, HBC34-V35-MLNS-GAALIE, анти-HBV mAb 17.1.41, и контрольного mAb добавляли к HBsAg-секретирующей клеточной линии гепатомы PLC/PRF/5 (также называемой клетками Александра). Клетки PLC/PRF/5 инкубировали вместе с антителами при комнатной температуре в течение 10 мин. NK-клетки добавляли в планшеты для анализа (в отношении эффекторных клеток:клетки-мишени=10:1) и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Гибель клеток определяли путем оценки уровня высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). (B) Окрашивание клеток человеческой гепатомы PLC/PRF/5 mAb HBC34-V35 и 17.1.41 оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки интенсивно промывали, фиксировали формальдегидом (4%) или фиксировали и делали проницаемыми (с использованием 0,5% сапонина), а затем окрашивали различными концентрациями mAb HBC34-V35 и 17.1.41. Связывание этих человеческих mAb (в случае HBC34-V35, сконструированных человеческих mAb) детектировали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела, специфичного к Fcγ-фрагменту и к F(ab')₂-фрагменту козьего антитела против человеческого IgG Alexa Fluor® 647 AffiniPure.

На фиг. 15A и 15B показана *in vitro* активация первичных человеческих NK-клеток в присутствии HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE и HBsAg. Активацию NK-клеток тестировали с использованием свежих клеток, выделенных у двух доноров, ранее генотипированных по экспрессии (A) гетерозиготного FcγRIIIa с высокой (V158) и низкой (F158) аффинностью. Серийные разведения HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS-GAALIE и HBC34-V35-LALA mAb инкубировали с NK-клетками в течение 4 ч. Активацию NK-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания NK-клеток анти-CD107a mAb в качестве функционального маркера для идентификации активности NK-клеток. CD107a, также известный как LAMP-1, является маркером дегрануляции NK-клеток.

На фиг. 16 показаны результаты исследований по взаимодействию лекарственных средств *in vitro*, а именно, между HBC34-V35-MLNS-GAALIE и ингибитором полимеразы/обратной транскриптазы Энтекавиром (ETV).

Подробное описание изобретения

Если это не оговорено особо, то все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют свои общепринятые значения, известные специалистам в данной области.

В настоящем описании, если это не оговорено особо, термин "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", используется как синоним, например, термина "имеющий", "имеет" "включающий", "включает" или т.п., и очевидно, что эти термины означают включение указанного элемента, отношения, целого числа (включая, если это необходимо, его часть, например, одну десятую и одну сотую целого числа), концентрации или стадии, но не исключают любые другие неуказанные элементы, отношения, целые числа, концентрации или стадии. Следует отметить, что любой интервал концентраций, процентный диапазон, диапазон отношений или диапазон целых чисел включают значение любого целого числа в указанном интервале и, при необходимости, его доли (такой как одна десятая и одна сотая целого числа), если это не оговорено особо. Кроме того, следует отметить, что любой диапазон чисел, указанный в настоящей заявке и относящийся к любому физическому признаку, такому как полимерные субъединицы, размер или толщина, включает любое целое число в указанном интервале, если это не оговорено особо. Термин "состоящий из" означает вариант термина "содержать", из которого исключены любые другие незаъявленные элементы, целые числа или стадии. В контексте настоящего описания, термин "содержать" охватывает термин "состоять из". Термин "состоящий, по существу, из" не эквивалентен термину "содержащий" и относится к указанным материалам или стадиям формулы изобретения или к материалам или стадиям, которые не оказывают существенного влияния на основные характеристики заявляемого предмета изобретения.

Кроме того, следует отметить, что отдельные соединения или группы соединений, полученные из различных комбинаций описанных здесь структур и заместителей, раскрыты в настоящей заявке в той же степени, как если бы каждое соединение или группа соединений были указаны отдельно. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных заместителей входит в объем настоящего изобретения.

Неопределенные артикли "a" и "an", определенный артикль "the" и другие языковые единицы, используемые в настоящем описании настоящего изобретения (а в частности в контексте нижеследующей формулы изобретения), могут употребляться как с существительными в единственном числе, так и с существительными во множественном числе, если это не оговорено особо или явно не противоречит контексту описания заявки. Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как один, оба, либо любую комбинацию альтернативных вариантов. Перечисление диапазонов значений в настоящей заявке служит в качестве сокращенного способа указания каждого отдельного значения, входящего в пределы данного интервала. Если это не оговорено особо, то каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было указано здесь отдельно. Никакую формулировку в данном описании не следует истолковывать как указывающую на какой-либо незаъявленный элемент как существенный для реализации изобретения, раскрытого в настоящей заявке.

Словосочетание "по существу" не исключает "полностью"; например, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может вообще не содержать Y. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, словосочетание "по существу" относится к данному количеству, эффекту или активности композиции, способа или применения согласно изобретению по сравнению с эталонной композицией, способом или применением и относится к снижению количества, эффекта или активности не более, чем на 50%, например не более, чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1% или менее от количества, эффекта или активности эталонной композиции, способа или применения.

Используемый здесь термин "приблизительно" означает $\pm 20\%$ от указанного диапазона, значения или состава, если это не оговорено особо.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что описанные далее элемент, компонент, событие или обстоятельство могут иметь место или отсутствовать, и что данное описание включает случаи наличия элемента, компонента, события или обстоятельства, а также случаи, когда они отсутствуют.

Используемый здесь термин "заболевание" обычно является синонимом терминам "расстройство" и "состояние" (патологическое состояние), в том смысле, что все они означают аномальное состояние организма или одного органа человека или животного, которое ухудшает нормальное функционирование организма и обычно проявляется различными признаками и симптомами, что приводит к тому, что человек или животное, страдающие этим заболеванием, имеют пониженную продолжительность или качество жизни.

Используемый здесь термин "лечение" индивидуума или пациента включает предупреждение, профилактику, ослабление, облегчение и терапию. Результаты лечения включают улучшенный клинический исход; уменьшение или облегчение симптомов, связанных с заболеванием; менее частое появление симптомов; улучшение качества жизни; более длительное безболезненное состояние; уменьшение тяжести заболевания; стабилизацию патологического состояния; замедление прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; увеличение продолжительности жизни или любые их комбинации. Термины "индивидуум" или "пациент" используются здесь как синонимы и охватывают всех млекопитающих, включая человека. Примерами индивидуумов являются человек, коровы, собаки, кошки, лошади, козы, овцы, свиньи и кролики. В одном варианте осуществления изобретения, пациентом является человек.

Используемый здесь термин "аминокислота" означает природные и синтетические аминокислоты, а также аминокислотные аналоги и аминокислотным миметики, которые функционируют подобно природным аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, которые были модифицированы, например, гидроксипролин, γ -карбоксихлутамат и О-фосфосерин. Аминокислотные аналоги означают соединения, которые имеют такую же основную химическую структуру, как и природная аминокислота, то есть, альфа-углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и с R-группой, например, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина и метионин-содержащий метилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, как и природная аминокислота. Аминокислотные миметики означают химические соединения, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно встречающейся в природе аминокислоте.

Используемые здесь термины "пептид", "полипептид" и "белок" и варианты этих терминов означают молекулу, которая содержит по меньшей мере две аминокислоты, связанные друг с другом (нормальной или модифицированной) пептидной связью. Так, например, пептид, полипептид или белок может содержать множество аминокислот или состоять из множества аминокислот, выбранных из 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, или аналога или миметика аминокислоты, каждый из которых связан друг с другом по меньшей мере пептидной связью. Пептид, полипептид или белок может содержать L-аминокислоты и/или D-аминокислоты (или их аналоги или миметики), или они могут состоять из них. Термины "пептид", "полипептид", "белок" также включают "пептидомиметики", которые определены как пептидные аналоги, содержащие непептидные структурные элементы, которые способны имитировать или подавлять биологическое действие природного родительского пептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептидомиметик не обладает такими свойствами, как ферментативное расщепление пептидных связей.

Пептид, полипептид или белок, помимо этих аминокислот, может содержать аминокислоты, отличающиеся от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, или он может состоять из аминокислот, отличающихся от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид, полипептид или белок согласно изобретению может содержать аминокислоты, которые были модифицированы по природным механизмам, таким как посттрансляционное созревание, или химические реакции (например, реакции синтеза), которые известны специалистам в данной области и включают механизмы, которые описаны в настоящей заявке. Такие модификации могут появляться в любом положении полипептида; например, в пептидном остове; в аминокислотной цепи; или у карбокси- или амино-концов. Пептид или полипептид могут быть разветвленными, например, после убихитинизации, либо они могут быть циклическими, с разветвлением

или без разветвления. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также включают модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Так, например, модификации пептида, полипептида или белка могут включать ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное связывание нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное связывание липида или липидного производного, ковалентное связывание фосфатидилинозита, ковалентное или нековалентное перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, гликозилирование, включая ПЭГилирование, гидроксиглирование, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолиз, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфирование, присоединение аминокислот, такое как аргинилирование или убихитинизацию. Такие модификации описаны в литературе (см. *Proteins Structure and Molecular Properties* (1993) 2nd Ed., T. E. Creighton, New York; *Post-translational Covalent Modifications of Proteins* (1983) V. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York; Seifter et al. (1990) *Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors*, *Meth. Enzymol.* 182: 626-646 and Rattan et al., (1992) *Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging*, *Ann NY Acad Sci*, 663: 48-62). В соответствии с этим, термины "пептид", "полипептид", "белок" могут включать, например, липопептиды, липопротеины, гликопептиды, гликопротеины и т.п. Также рассматриваются варианты белков, пептидов и полипептидов согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированные белки, пептиды и полипептиды содержат аминокислотную последовательность или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентична определенной аминокислотной последовательности или эталонной аминокислотной последовательности, как описано в настоящей заявке.

Используемые здесь термины "(поли)пептид" и "белок" могут использоваться как синонимы и означают полимер из аминокислотных остатков, таких как множество аминокислотных мономеров, связанных пептидными связями.

"Молекула нуклеиновой кислоты" или "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" означают полимерное соединение, включающее ковалентно связанные нуклеотиды, которые могут быть образованы из природных субъединиц (например, пуриновые или пиримидиновые основания) или неприродных субъединиц (например, морфолиновое кольцо). Пуриновые основания включают аденин, гуанин, гипоксантин и ксантин, а пиримидиновые основания включают урацил, тимин и цитозин. Мономеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфоритоат, фосфордитоат, фосфорселеноат, фосфордиселеноат, фосфоранилитоат, фосфоранилидат, фосфорамидат или т.п.

Молекулы нуклеиновой кислоты включают полирибонуклеиновую кислоту (РНК), полидезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, любая из которых может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Если молекула нуклеиновой кислоты является одноцепочечной, то она может представлять собой кодирующую цепь или некодирующую цепь (антисмысловую цепь). Полинуклеотиды (включая олигонуклеотиды) и их фрагменты могут быть получены, например, посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) или путем трансляции *in vitro*, или они могут быть получены путем лигирования, расщепления, действия эндонуклеазы или действия экзонуклеазы.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, кодирующие одну и ту же аминокислотную последовательность. Некоторые варианты нуклеотидных последовательностей могут также включать интрон(ы), который(е) может (могут) быть удален(ы) посредством котранскрипционных или посттранскрипционных механизмов. Различные нуклеотидные последовательности могут кодировать одну и ту же аминокислотную последовательность в результате избыточности или вырожденности генетического кода, либо посредством сплайсинга, либо и того и другого.

Также рассматриваются варианты молекул нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Варианты молекул нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичны молекуле нуклеиновой кислоты описанного здесь определенного или эталонного полинуклеотида или гибридизуются с полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации в присутствии 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при температуре приблизительно 65-68°C или в присутствии 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия и 50% формамида приблизительно при 42°C. Варианты молекул нуклеиновой кислоты сохраняют способность кодировать гибридный белок или его связывающий домен, имеющий описанные здесь функциональные свойства, такие как специфическое связывание с молекулой-мишенью.

Используемый здесь термин "вариант последовательности" означает любую последовательность, имеющую одно или более изменений по сравнению с эталонной последовательностью, где эталонная последовательность представляет собой любую опубликованную последовательность и/или последовательности, перечисленные в "Таблице последовательностей и SEQ ID NO: (список последовательностей)", то есть, SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 139. Таким образом, термин "вариант последовательности" включает варианты нуклеотидной последовательности и варианты аминокислотной

последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант последовательности, относящийся к нуклеотидной последовательности и эталонной последовательности, также является нуклеотидной последовательностью, тогда как в некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант последовательности, относящийся к аминокислотной последовательности и эталонной последовательности, также представляет собой аминокислотную последовательность. Используемый здесь "вариант последовательности" может быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен эталонной последовательности.

"Процент идентичности последовательностей" означает взаимосвязь между двумя или более последовательностями, определенную путем сравнения последовательностей. Методы определения идентичности последовательностей могут быть разработаны так, чтобы обеспечивалось наилучшее соответствие между сравниваемыми последовательностями. Так, например, последовательности могут быть выровнены для оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в одну или в обе, то есть, в первую и во вторую аминокислотную последовательность или в последовательность нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания). Кроме того, при сравнении, неомологичные последовательности могут быть игнорированы. Упомянутый здесь процент идентичности последовательностей вычисляют по всей длине эталонной последовательности, если это не оговорено особо. Способы определения идентичности и сходства последовательностей можно найти в общедоступных компьютерных программах. Выравнивание последовательностей и вычисление процента идентичности могут быть осуществлены с использованием программы BLAST (например, BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN или BLASTX). Математический алгоритм, используемый в программах BLAST, можно найти у Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997. В контексте настоящего описания, следует отметить, что в тех случаях, когда для анализа последовательности используется компьютерная программа, то результаты такого анализа основаны на "значениях по умолчанию" эталонной программы. "Значения по умолчанию" означают любой набор значений или параметров, которые были первоначально загружены вместе с программным обеспечением при первом запуске программы.

"Вариант последовательности", относящийся к последовательности нуклеиновой кислоты (нуклеотидной последовательности), имеет измененную последовательность, в которой один или более нуклеотидов в эталонной последовательности были делетированы или заменены, или один или более нуклеотидов встроены в эталонную нуклеотидную последовательность. Используемые здесь нуклеотиды имеют стандартные однобуквенные обозначения (A, C, G или T). Из-за вырожденности генетического кода, "вариант" нуклеотидной последовательности может давать изменения в соответствующей эталонной аминокислотной последовательности, то есть, в "варианте" аминокислотной последовательности, либо такие изменения могут отсутствовать. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант нуклеотидной последовательности не приводит к получению варианта аминокислотной последовательности (например, в случае молчащей мутации). В некоторых вариантах осуществления изобретения рассматривается вариант нуклеотидной последовательности, который дает одну или более "немолчащих" мутаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант нуклеотидной последовательности согласно изобретению кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична эталонной аминокислотной последовательности. Описанные здесь нуклеотидные и аминокислотные последовательности также представляют собой оптимизированные по кодонам варианты эталонной нуклеотидной или аминокислотной последовательности или нуклеотидной или аминокислотной последовательности дикого типа. В любом из описанных здесь вариантов осуществления изобретения, полинуклеотид согласно изобретению может быть оптимизирован по кодону для клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид (см. например, Scholten et al., *Clin. Immunol.* 119:135-145 (2006)). Оптимизация по кодонам можно быть проведена с применением известных методик и инструментов, например, с использованием инструмента GenScript® OptimumGene™ или инструмента для синтеза генов GeneArt (Thermo Fisher Scientific). Последовательности, оптимизированные по кодонам, включают последовательности, которые были частично оптимизированы по кодонам (то есть, по меньшей мере один кодон был оптимизирован для экспрессии в клетке-хозяине), и последовательности, которые являются полностью оптимизированными по кодонам.

"Вариант последовательности", относящийся к аминокислотной последовательности, имеет измененную последовательность, в которой одна или более аминокислот были делетированы, заменены или встроены по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью. В результате изменений, такой вариант последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по

меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, или, по меньшей мере на 99% идентична эталонной аминокислотной последовательности. Так, например, на 100 аминокислот эталонной последовательности, вариант последовательности, который имеет не более чем 10 изменений, то есть, любую комбинацию делеций, инсерций или замен, "по меньшей мере на 90% идентичен" эталонной последовательности.

"Консервативная замена" относится к аминокислотным замещениям, которые не оказывают значительного влияния на свойства связывания конкретного белка или не изменяют эти свойства. Обычно, консервативными заменами являются замены, в которых заменяемый аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Консервативные замены включают замену в одной из следующих групп: группа 1: аланин (Ala или A), глицин (Gly или G), серин (Ser или S), треонин (Thr или T); группа 2: аспарагиновая кислота (Asp или D), глутаминовая кислота (Glu или Z); группа 3: аспарагин (Asn или N), глутамин (Gln или Q); группа 4: аргинин (Arg или R), лизин (Lys или K), гистидин (His или H); группа 5: изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), метионин (Met или M), валин (Val или V) и группа 6: фенилаланин (Phe или F), тирозин (Tyr или Y), триптофан (Trp или W). Дополнительно или альтернативно, аминокислоты могут быть распределены по группам с консервативными заменами на аминокислоты, имеющие подобные функции, химические структуры или состав (например, кислотные, основные, алифатические, ароматические или серусодержащие). Так, например, алифатическая группа может включать, для замены, Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы консервативных замен включают: серусодержащие: Met и Цистеин (Cys или C); кислотные: Asp, Asn, Glu и Gln; небольшие алифатические неполярные остатки или слегка полярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; полярные, положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; крупные алифатические, неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и крупные ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительную информацию можно найти в публикации Creighton (1984) *Proteins*. WH Freeman and Company.

Инсерции аминокислотной последовательности могут включать амино- и/или карбокси-концевые гибриды, длина которых составляет в пределах от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также инсерции внутри последовательности из одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают присоединение у N- или C-конца аминокислотной последовательности к репортерной молекуле или ферменту.

В целом, изменения в вариантах последовательностей не отменяют или значительно не снижают желаемые функции соответствующей эталонной последовательности. Так, например, предпочтительно, чтобы вариант последовательности согласно изобретению значительно не снижал или полностью не блокировал функциональность последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, а именно, связывание с одним и тем же эпитопом и/или достаточную нейтрализацию HBV- и HDV-инфекции по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, имеющим эталонную последовательность (или кодируемым эталонной последовательностью). Руководство по определению, какие нуклеотиды и аминокислотные остатки, соответственно, могут быть заменены, встроены или делетированы без отмены желаемой структуры или функциональности, можно найти с использованием, например, известных компьютерных программ.

Используемый здесь термин "последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, происходящая от указанных нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка", означает источник происхождения нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, происходящая от конкретной последовательности, может иметь аминокислотную последовательность, которая, по существу, идентична последовательности или ее части, от которой она происходит, а поэтому термин "по существу идентичный" включает варианты последовательностей, определенные выше. Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из конкретного пептида или белка, могут происходить от соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. В этом контексте, термин "соответствующий" относится к наличию одной и той же представляющей интерес функции или характеристики. Так, например, "внеклеточный домен" соответствует другому "внеклеточному домену" (другого белка), или "трансмембранный домен" соответствует другому "трансмембранному домену" (другого белка). Таким образом, "соответствующие" части пептидов, белков и нуклеиновых кислот могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области. Аналогичным образом, последовательность, происходящая от другой (например, "исходной") последовательности, может быть идентифицирована специалистом в данной области как имеющая свой орджин в исходной последовательности.

Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная от другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентична исходной нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (от которого она происходит). Однако, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, происходящая от другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может также иметь одну или более мутаций по сравнению с исходной нуклеиновой кислотой, с исходным пептидом, полипептидом или

белком (от которого она происходит), а в частности, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, происходящая от другой нуклеиновой кислоты, другого пептида, полипептида или белка, может представлять собой описанный выше вариант функциональной последовательности по сравнению с исходной нуклеиновой кислотой, исходным пептидом, полипептидом или белком (от которого она происходит). Так, например, в пептиде/белке, один или более аминокислотных остатков могут быть заменены другими аминокислотными остатками, или в них могут быть введены инсерции или делеции одного или более аминокислотных остатков.

Используемый здесь термин "мутация" относится к изменению в последовательности нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью, последовательностью дикого типа или эталонной последовательностью. Мутация, например, по сравнению с эталонной геномной последовательностью, может представлять собой, например, (природную) соматическую мутацию, спонтанную мутацию, индуцированную мутацию, например, индуцируемую ферментами, химическими веществами или облучением, или мутацию, полученную посредством сайт-направленного мутагеназа (методами молекулярной биологии для получения специфических и нацеленных изменений в последовательности нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотной последовательности). Таким образом, следует отметить, что термины "мутация" или "мутагенез" также включают физическое продуцирование или индуцирование мутации, например, в последовательности нуклеиновой кислоты или в аминокислотной последовательности. Мутация включает замену, делецию и инсерцию одного или более нуклеотидов или аминокислот, а также инверсию нескольких последовательно расположенных нуклеотидов или аминокислот. Для достижения мутации в аминокислотной последовательности, мутация может быть введена в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную аминокислотную последовательность, для экспрессии (рекомбинантного) мутантного полипептида. Мутация может быть достигнута, например, путем изменения (например, посредством сайт-направленного мутагеназа) кодона (например, путем замены одного, двух или трех нуклеотидных оснований) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну аминокислоту, для получения кодона, который кодирует другую аминокислоту, или который кодирует одну и ту же аминокислоту, или путем синтеза варианта последовательности.

Термин "введенный", если он относится к встраиванию молекулы нуклеиновой кислоты в клетку, означает "трансфекцию", или "трансформацию", или "трансдукцию", и включает введение молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в геном клетки (например, в хромосому, плазмиду, пластиду или митохондриальную ДНК), что будет приводить к превращению в автономный репликон или к временной экспрессии (например, трансфецированной мРНК).

Используемый здесь термин "рекомбинантный" (например, рекомбинантное антитело, рекомбинантный белок, рекомбинантная нуклеиновая кислота или т.п.), относится к любой молекуле (антителу, белку, нуклеиновой кислоте или т.п.), которая была получена, экспрессирована, создана или выделена рекомбинантными методами, и которая не встречается в природе. Термин "рекомбинантный" может использоваться как синоним термина "сконструированный" или "неприродный" и может относиться к организму, микроорганизму, клетке, молекуле нуклеиновой кислоты или к вектору, которые включают по меньшей мере одно генетическое изменение, или были модифицированы путем введения экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, где такие изменения или модификации вводятся методами генной инженерии (то есть, человеком). Генетические изменения включают, например, модификации, которые вводят экспрессируемые молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие белки, гибридные белки или ферменты, или другие добавления, делеции, замены или другие функциональные дизрупции в молекулу нуклеиновой кислоты генетического материала клетки. Дополнительные модификации включают, например, некодирующие регуляторные области, в которых модификации изменяют экспрессию полинуклеотида, гена или оперона.

Используемый здесь термин "гетерологичный" или "неэндогенный" или "экзогенный" относится к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которые не являются нативными для клетки-хозяина или индивидуума, или к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которые являются нативными для клетки-хозяина или индивидуума, имеющего модификацию. Термины "гетерологичный", "неэндогенный" или "экзогенный" включают гены, белки, соединения или молекулы нуклеиновой кислоты, которые были мутированы или каким-либо иным образом изменены так, что структура, активность или то и другое отличались между нативными и измененными генами, белками, соединениями или молекулами нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гетерологичные, неэндогенные или экзогенные гены, белки или молекулы нуклеиновой кислоты могут не быть эндогенными для клетки-хозяина или индивидуума, но вместо этого, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие гены, белки или молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть добавлены в клетку-хозяина путем конъюгирования, трансформации, трансфекции, электропорации и т.п., где добавленная молекула нуклеиновой кислоты может интегрироваться в геном клетки-хозяина или может существовать в виде внехромосомного

генетического материала (например, в виде плазмиды или другого самореплицирующегося вектора). Термин "гомологичный" или "гомолог" относится к гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, обнаруженных в клетке-хозяине некоторых видов или штаммов, или происходящих от них. Так, например, гетерологичный или экзогенный полинуклеотид или ген, кодирующий полипептид, могут быть гомологичными нативному полинуклеотиду или гену и могут кодировать гомологичный полипептид или активность, но полинуклеотид или полипептид могут иметь измененную структуру, последовательность, уровень экспрессии или любую их комбинацию. Неэндогенный полинуклеотид или ген, а также кодируемый полипептид или активность могут происходить от одного и того же вида, другого вида или их комбинации.

Используемый здесь термин "эндогенный" или "нативный" относится к полинуклеотиду, гену, белку, соединению, молекуле или активности, которые обычно присутствуют в клетке-хозяине или у индивидуума.

Используемые здесь термины "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" являются синонимами, и все эти термины включают потомство. Таким образом, термины "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную клетку индивидуума и полученные из нее культуры без учета количества переносов. Также очевидно, что все потомство не может быть точно идентичным с точки зрения содержания ДНК из-за специально введенных или случайных мутаций. Модифицированное потомство, которое имеет такие же или, по существу, те же самые функции, фенотипы или биологические активности, скринированные на их присутствие в первоначально трансформированной клетке, входят в объем этого термина. Если будут встречаться другие термины, то это будет понятно из контекста.

Настоящее изобретение частично относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам и гибридным белкам, которые способны нейтрализовать вирусы гепатита В и гепатита дельта. Варианты антител, антигенсвязывающих фрагментов и гибридных белков согласно изобретению могут быть использованы в способах профилактики, лечения или ослабления или диагностики HBV и HDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения, описанные здесь антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки связываются с двумя или более различными генотипами антигена поверхности вируса гепатита В и с двумя или более различными инфекционными мутантами антигена поверхности вируса гепатита В. В конкретных вариантах осуществления изобретения, описанные здесь антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки связываются со всеми известными генотипами антигена поверхности вируса гепатита В и со всеми известными инфекционными мутантами антигена поверхности вируса гепатита В.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты.

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые способны связываться с областью антигенной петли HBsAg и способны нейтрализовать инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

Используемый здесь термин "антитело", если это не оговорено особо, означает интактное антитело, содержащее по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями (хотя в этой связи следует отметить, что антитела с тяжелой цепью, которые не имеют легких цепей, все же входят в объем термина "антитело"), а также означает любую антигенсвязывающую часть или фрагмент интактного антитела, которые обладают или сохраняют способность связываться с молекулой-мишенью антигена, распознаваемого интактным антителом, такой как, например, фрагмент scFv, Fab или F(ab')₂. Таким образом, используемый здесь термин "антитело" употребляется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и их функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты, включая антигенсвязывающие фрагменты (Fab), фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, наноантитело). Этот термин охватывает генетически сконструированные и/или модифицированные иным образом формы иммуноглобулинов, такие как интраантитела, пептидоантитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические антитела, например, биспецифические антитела, диантитела, триантитела и тетраантитела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если это не оговорено особо, то следует отметить, что термин "антитело" охватывает его функциональные фрагменты. Этот термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и подклассы IgM, IgE, IgA и IgD.

Используемые здесь термины "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент" и "фрагмент антитела" являются синонимами и означают любой фрагмент антитела согласно изобретению, который сохраняет антигенсвязывающую активность антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

Человеческие антитела являются известными (см., например, van Dijk, M. A., and van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Человеческие антитела могут быть получены у трансгенных

животных (например, мышей), которые способны, после иммунизации, продуцировать полный спектр или набор человеческих антител в отсутствие продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Перенос матрицы гена иммуноглобулина человеческой зародышевой линии таким мышам с мутацией зародышевой линии будет приводить к продуцированию человеческих антител после заражения антигеном (см. например, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 3340). Человеческие антитела могут быть также получены в библиотеках фагового представления (Hoogenboom, H. R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J. D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Способы Cole et al., и Boerner et al. также могут быть применены для получения человеческих моноклональных антител (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); and Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Человеческие моноклональные антитела могут быть получены с использованием усовершенствованной технологии иммортализации клеток EBV-B, как описано в публикации Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. Nat Med. 10(8):871-5. Используемый здесь термин "человеческое антитело" также включает такие антитела, которые были модифицированы, например, в варибельной области для сообщения нужных свойств антителам и их фрагментам согласно изобретению.

Используемый здесь термин "варибельная область" (варибельная область легкой цепи (V_L), варибельная область тяжелой цепи (V_H)) означает каждый полипептид варибельной области пары легких и тяжелых цепей, которые, в большинстве случаев, непосредственно участвуют в связывании антитела с антигеном.

Антитела согласно изобретению могут иметь любой изотип (например, IgA, IgG, IgM, IgE, IgD; то есть, могут содержать тяжелую цепь α , γ , μ , ϵ или δ). Так, например, антитела изотипа IgG могут представлять собой антитела подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретных вариантах осуществления изобретения, антитело согласно изобретению представляет собой антитело IgG1. Описанные здесь антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут включать легкую цепь κ или λ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь HBsAg-специфические антитела принадлежат к изотипу IgG и могут блокировать выделение HBV и HBsAg из инфицированных клеток. В соответствии с этим, в некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело согласно изобретению может связываться внутри клеток и, таким образом, блокировать высвобождение вирионов HBV и HBsAg.

Термины "VL" и "VH" относятся к варибельной связывающей области легкой и тяжелой цепи антитела, соответственно. Варибельные связывающие области состоят из дискретных, точно определенных подобластей, известных как "комплементарность-определяющие области" (CDR) и "каркасные области" (FR). Термины "комплементарность-определяющая область" и "CDR" являются синонимами термина "гиперварибельная область" или "HVR" и известны специалистам как последовательности аминокислот в варибельных областях TCR или антитела, которые сообщают специфичность к антигену и/или аффинность связывания и разделены каркасной последовательностью. Вообще говоря, существуют три CDR в каждой варибельной области белка, связывающегося с иммуноглобулином, например, в случае антител, области VH и VL содержат шесть CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3; LCDR1, LCDR2, LCDR3, также упоминаемых здесь как CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно). Используемый здесь термин "вариант" CDR означает функциональный вариант последовательности CDR, имеющий вплоть до 1-3 аминокислотных замен, делеций или их комбинаций.

Последовательности иммуноглобулинов могут быть выровнены в соответствии со схемой нумерации (например, по Кэбату, EU, International Immunogenetics Information System (IMGT) и Aho), которая позволяет выявить эквивалентные положения остатков и сравнивать различные молекулы с помощью пакета программ по нумерации антигенных рецепторов и их классификации (ANARCI) (2016, Bioinformatics 15: 298-300). Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению могут содержать всю или часть тяжелой цепи (HC), легкой цепи (LC) или и того и другого. Так, например, полноразмерное интактное мономерное антитело IgG обычно включает VH, CH1, CH2, CH3, VL и CL. Fc-компоненты описаны далее. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с любой из раскрытых здесь последовательностей VH и VL, соответственно.

В табл. 1 показаны аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи (VH), переменных областей легкой цепи (VL), CDR, тяжелых цепей (HC) и легких цепей (LC) некоторых репрезентативных антител согласно изобретению.

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
HBC34-V35 VH; HBC34-V34 VH; HBC23-LC40A VH; HBC23-LC40S VH; HBC34-LC40A VH; HBC34-LC40S VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVD SVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTAV YYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSS
HBC34v31_LC40A VH HBC34v31_LC40S HBC34v32_LC40A VH HBC34v32_LC40S VH HBC34v33_LC40A VH HBC34v32_LC40S VH	VH 67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKLYVD SVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTAV YYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSS
HBC34-V35 VL	89	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL
HBC34-V34 VL	90	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL
HBC34-V23-VL_C40S	110	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA SWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL
HBC34-V23-VL_C40A	111	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA AWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL
HBC34-V31-VL_C40S	112	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL
HBC34-V31-VL_C40A	113	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL
HBC34-V32-VL_C40S	114	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL
HBC34-V32-VL_C40A	115	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL
HBC34-V33-VL_C40S	116	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA SWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL
HBC34-V33-VL_C40A	117	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA AWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL

HBC34-VL_C40S	118	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTWDSTTV VFGGGTRLTVL
HBC34-VL_C40A	119	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTWDSTTV VFGGGTRLTVL
HBC34-V35 CDRH1; HBC34-V34 CDRH1; HBC34-V23_LC40S CDRH1; HBC34-V23_LC40A CDRH1; HBC34-V31_LC40S CDRH1; HBC34-V31_LC40A CDRH1; HBC34-V32_LC40S CDRH1; HBC34-V32_LC40A CDRH1; HBC34-V33_LC40S CDRH1; HBC34-V33_LC40A CDRH1; HBC34_LC40S CDRH1; HBC34_LC40A CDRH1	34	GRIFRSFY
HBC34-V35 CDRH2; HBC34-V34 CDRH2; HBC34-V23_LC40S CDRH2; HBC34-V23_LC40A CDRH2; HBC34-V31_LC40S CDRH2; HBC34-V31_LC40A CDRH2; HBC34-V32_LC40S CDRH2; HBC34-V32_LC40A CDRH2; HBC34-V33_LC40S CDRH2; HBC34-V33_LC40A CDRH2; HBC34_LC40S CDRH2; HBC34_LC40A CDRH2 (short CDRH2)	35	NQDGSEK
HBC34-V35 CDRH2; HBC34-V34 CDRH2; HBC34-V23_LC40S CDRH2; HBC34-V23_LC40A CDRH2; HBC34-V31_LC40S CDRH2; HBC34-V31_LC40A CDRH2; HBC34-V32_LC40S CDRH2; HBC34-V32_LC40A CDRH2; HBC34-V33_LC40S CDRH2; HBC34-V33_LC40A CDRH2; HBC34_LC40S CDRH2; HBC34_LC40A CDRH2 (long CDRH2)	66	INQDGSEK
HBC34-V35 CDRH3; HBC34-V34 CDRH3; HBC34-V23_LC40S CDRH3; HBC34-V23_LC40A CDRH3; HBC34-V31_LC40S CDRH3; HBC34-V31_LC40A CDRH3; HBC34-V32_LC40S CDRH3; HBC34-V32_LC40A CDRH3; HBC34-V33_LC40S CDRH3; HBC34-V33_LC40A CDRH3; HBC34_LC40S CDRH3; HBC34_LC40A CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
HBC34-V35 CDRL1; HBC34-V34 CDRL1; HBC34-V23_LC40S CDRL1;	37	KLGNKN

HBC34-V23_LC40A CDRL1; HBC34-V31_LC40S CDRL1; HBC34-V31_LC40A CDRL1; HBC34-V32_LC40S CDRL1; HBC34-V32_LC40A CDRL1; HBC34-V33_LC40S CDRL1; HBC34-V33_LC40A CDRL1; HBC34_LC40S CDRL1; HBC34_LC40A CDRL1		
HBC34-V35 CDRL2; HBC34-V34 CDRL2; HBC34-V23_LC40S CDRL2; HBC34-V23_LC40A CDRL2; HBC34-V31_LC40S CDRL2; HBC34-V31_LC40A CDRL2; HBC34-V32_LC40S CDRL2; HBC34-V32_LC40A CDRL2; HBC34-V33_LC40S CDRL2; HBC34-V33_LC40A CDRL2; HBC34_LC40S CDRL2; HBC34_LC40A CDRL2 (короткая CDRL2)	38	EVK
HBC34-V35 CDRL2; HBC34-V34 CDRL2; HBC34-V23_LC40S CDRL2; HBC34-V23_LC40A CDRL2; HBC34-V31_LC40S CDRL2; HBC34-V31_LC40A CDRL2; HBC34-V32_LC40S CDRL2; HBC34-V32_LC40A CDRL2; HBC34-V33_LC40S CDRL2; HBC34-V33_LC40A CDRL2; HBC34_LC40S CDRL2; HBC34_LC40A CDRL2 (длинная Lcdr2)	39	VIYEVKYRP
HBC34-V35 CDRL3; HBC34-V34 CDRL3; HBC34-V23_LC40S CDRL3; HBC34-V23_LC40A CDRL3; HBC34-V32_LC40S CDRL3; HBC34-V32_LC40A CDRL3; HBC34-V33_LC40S CDRL3; HBC34-V33_LC40A CDRL3;	58	QTFDSTTVV
HBC34_LC40S CDRL3; HBC34_LC40A CDRL3; HBC34-V31_LC40S CDRL3; HBC34-V31_LC40A CDRL3;	40	QTWDSTTVV
HC HBC34-V35-MLNS-GAALIE и HBC34-V34-MLNS-GAALIE (g1M17, 1)	91	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVD SVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTAV YYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPAPPELLAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPLPEEKTKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQ

		KSLSLSPGK
HC HBC34-V35-MLNS и HBC34-V34-MLNS	92	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVD SVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNNLRVEDTAV YYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQ KSLSLSPGK
LC HBC34-V35	93	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
LC HBC34-V34	94	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
HBC24 VH	95	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTKY AMSWVRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDTY YADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAED TALYYCAKDVGVIGSYYYYYAMDVWGQGTAV TVSS
HBC24 VL	96	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGLSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRFSG SGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYAYSPPR WTFGQGTKVEIK
HBC24 CDRH1	97	GSTFTKYA
HBC24 CDRH2	98	ISGSVPGF
HBC24 CDRH3	99	LYYCAKDVGVIGSYYYYYAMDV
HBC24 CDRL1	100	QGLSSSY
HBC24 CDRL2	101	SAS
HBC24 CDRL3	102	QQYAYSPPRWT
HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 HC (VH-шарнирная область-CH1- CH2-CH3) (дикого типа)	129	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVD SVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNNLRVEDTAV YYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Fc hlgG1 дикого типа	137	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV

		VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HBC34-V7, HBC34-V23, HBC34-V34, HBC34-V35, HBC34_C40S, HBC34_C40A, HBC34-V23_C40S, HBC34-V23_C40A HC с мутацией GAALIE в Fc hIgG1	138	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVD SVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNLRVEDTAV YYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Описанные здесь фрагменты антител могут быть получены из антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей химическим восстановителем. Альтернативно, фрагменты антител могут быть получены путем клонирования и экспрессии части последовательностей тяжелых или легких цепей. Настоящее изобретение охватывает одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), происходящие от тяжелой и легкой цепей антитела, как описано в настоящей заявке, включая, например, scFv, содержащий CDR антитела согласно изобретению, мономеры и димеры тяжелой или легкой цепи, однодоменные антитела с тяжелой цепью, однодоменные антитела с легкой цепью, а также одноцепочечные антитела, в которых переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены пептидным линкером.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело согласно изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержат очищенное антитело, моноклональное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть, в некоторых вариантах осуществления изобретения, мультиспецифическими (например, биспецифическими, триспецифическими, тетраспецифическими или т.п.) и могут быть представлены в любом мультиспецифичном формате, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению представляют собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое или триспецифическое антитело. Форматы биспецифических антител описаны, например, в публикациях Spiess Et Ak. Mol. Immunol 67 (2): 95 (2015) и Brinkmann and Kontermann, mAb 9 (2):182-212 (2017), в которых биспецифические форматы и способы их получения включены в настоящее описание посредством ссылки и включают, например, биспецифическими вещества, связывающиеся с Т-клетками (BiTE), DART, сборку "узлы в дырках" (КИН), сборку scFv-CH3-КИН, общие антитела с легкой цепью КИН, TandAb, триантитела, TriBi-миниантитела, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂-scFv₂, четырехвалентные HCab, интраантитела, перекрестно связанные mAb, Fab двойного действия (DAF) ("два в одном" или "четыре в одном"), DutaMab, DT-IgG, заряженные пары, пары обмена цепей Fab, антитела SEEDbodies, Triomabs, сборку LUZ-Y, Fcab, κλ-антитела, ортогональные Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, КИН IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, антитело Zybody и DVI-IgG ("четыре в одном"). Биспецифическое или мультиспецифическое антитело может содержать связывающий домен, специфичный к HBV и/или HDV согласно изобретению в комбинации с другим HBV- и/или HDV-специфическим связывающим доменом согласно изобретению, или в комбинации с другим связывающим доменом, который специфически связывается с HBV и/или HDV (например, в одном и том же или в другом эпитопе), или со связывающим доменом, который специфически связывается с другим антигеном.

Фрагменты антител согласно изобретению могут сообщать одновалентные или мультивалентные взаимодействия и могут содержаться в различных структурах, как описано выше. Так, например, молекулы scFv могут быть синтезированы для создания трехвалентного "триантитела" или четырехвалентного "тетраантитела". Молекулы scFv могут включать домен Fc-области с образованием двухвалентных миниантител. Кроме того, последовательности согласно изобретению могут представлять собой компонент мультиспецифических молекул, в которых последовательности согласно изобретению

нацелены на эпитопы согласно изобретению, а другие области молекулы связываются с другими мишенями. Примеры молекул включают, но не ограничиваются ими, биспецифические Fab2, триспецифические Fab3, биспецифические scFv и диантитела (Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 9: 1126-1136).

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей заявке, включая, но не ограничиваясь ими, scFv, в некоторых вариантах осуществления изобретения, могут содержаться в гибридном белке, который способен специфически связываться с антигеном, как описано в настоящей заявке. Используемый здесь термин "гибридный белок" означает белок, который в одной цепи имеет по меньшей мере два отдельных домена или мотива, где домены или мотивы не встречаются в природных условиях вместе или в данной структуре в белке. Полинуклеотид, кодирующий гибридный белок, может быть сконструирован с помощью ПЦР, методами рекомбинантных ДНК или т.п., или такие гибридные белки могут быть синтезированы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибридный белок способен экспрессироваться на поверхности клетки-хозяина, например Т-клеток, NK-клеток или NK-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибридный белок содержит (i) внеклеточный компонент, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv); (ii) трансмембранный компонент (например, трансмембранный домен CD4, CD8, CD27, CD28 или его функциональный вариант или часть, или любые их комбинации); и (iii) внутриклеточный компонент, содержащий сигнальный домен костимулирующего белка, или его функциональный вариант или его часть (например, сигнальный домен CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD2, CD5, ICAM-1 (CD54), LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), GITR, CD30, CD40, BAFF-R, HVEM, LIGHT, MKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, или его функциональный вариант или любая их комбинация) и/или эффекторный домен (например, от CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD25, CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, Wnt, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTα, TCRα, TCRβ, TRIM, Zap70, PTCH2 или любой их комбинации).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибридный белок, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), которая может быть экспрессирована на клеточной поверхности клетки-хозяина, такой как Т-клетка, NK-клетка или NK-Т-клетка, для использования в клеточной иммунотерапии. Молекулы CAR и принципы их конструирования описаны, например, в публикациях Sadelain et al., *Cancer Discov.*, 3(4):388 (2013); Harris and Kranz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 37(3):220 (2016); Stone et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 63(11):1163 (2014); Xu et al., 2018 *Oncotarget* 9:13991; Androulla et al., 2018 *Curr. Pharm. Biotechnol. Volume 19* (April 2018); Wu et al., 2016 *Expert Opin. Biol. Ther.* 16:1469; Ren et al., 2017 *Protein Cell* 8:634; где молекулы CAR, конструкции CAR и принципы их конструирования в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Во всем описании изобретения, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки могут отдельно или вместе (например, в любой комбинации) называться "связывающими белками".

Связывающие белки согласно изобретению могут быть представлены в очищенной форме. Так, например, антитело может присутствовать в композиции, которая по существу не содержит других полипептидов, например, где менее, чем 90% (по массе), обычно менее, чем 60%, а чаще всего менее, чем 50% композиции составляют другие полипептиды.

Связывающие белки согласно изобретению могут быть иммуногенными у человека и/или у хозяев, не являющихся человеком (или у гетерологичных хозяев); например, у мышей. Так, например, антитело может иметь идиотоп, который является иммуногенным у хозяев, не являющихся человеком, но не у человека. Антитела согласно изобретению для их применения в медицине включают антитела, которые обычно не выделяют у хозяев, таких как мыши, козы, кролики, крысы, млекопитающие, не являющиеся приматами, или т.п., а в некоторых случаях, их не получают путем гуманизации или не выделяют у ксено-мышей. Также рассматриваются модифицированные формы раскрытых антител, которые были сконструированы в целях снижения известной или потенциальной иммуногенности и/или других потенциальных свойств или в целях сообщения желаемой структуры и/или функциональности антителу животного, не являющегося человеком, такого как мышь (например, "муринизированному" антителу, где один или более аминокислотных остатков, последовательностей или мотивов человека заменены остатком, последовательностью или мотивом, которые имеют пониженную или отмененную иммуногенность или другое свойство, или имеют желаемую структуру и/или функцию у мыши (например, для исследований на мышах-моделях).

Аминокислотные последовательности репрезентативных муринизированных антител согласно изобретению представлены в табл. 2.

Описание последовательности муринизированного антитела	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
HBC34-V7-мю (IgG2a) HC	122		ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFR

		SFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKL YVDSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNNLRVE DTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSV SSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTK VDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVF IFPPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIE RTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVT LTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLSDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
HBC34-V7-мЮ (IgG2a) LC	123	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKN VCWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDST TVVFGGTRTLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEEL ETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPV TQGMETTQPSKQSNNKYMSSYLTLTARA WERHSSYSCQVTHEGHTVEKLSRADCS
HBC34-V35-мЮ (IgG2a) HC	124	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFR SFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKL YVDSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNNLRVE DTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSV SSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTK VDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVF IFPPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIE RTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVT LTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLSDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
HBC34-V35-мЮ (IgG2a) LC	125	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKN VAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDST TVVFGGTRTLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEEL ETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPV TQGMETTQPSKQSNNKYMSSYLTLTARA WERHSSYSCQVTHEGHTVEKLSRADCS
HBC24-мЮ (IgG2a) HC	126	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTK YAMSWVRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGID TYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLR AEDTALYYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWG QGTAVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN LLGGPSVFIFFPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVD VSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVN NKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLCMVTDMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLSDSGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTP GK
HBC24-мЮ (IgG2a) LC	127	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGLSSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRF

		SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAY SPRWTFGQGTKVEIKADAAPTVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDE YERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
--	--	--

Используемый здесь термин "нейтрализующее антитело" (или антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок) представляет собой антитело, которое может нейтрализовать, то есть, предотвращать, ингибировать, уменьшать, препятствовать или снижать способность патогена иницировать и/или переносить инфекцию хозяину (например, в организм хозяина или в клетку хозяина). Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют", используются здесь как синонимы. Эти антитела могут быть использованы отдельно или в комбинации (например, два или более из раскрытых здесь антител в комбинации или антитело согласно изобретению комбинации с другим агентом, который может представлять собой антитело или может не представлять собой антитело, включая антитело, способное нейтрализовать инфицирование HBV В и/или D) в качестве профилактических или терапевтических агентов в соответствующем препарате, в комбинации с активной вакцинацией, в качестве диагностического средства, или в качестве средства для получения препарата, как описано в настоящей заявке.

Используемый здесь термин "специфически связывается" или "специфичный к" относится к ассоциации или объединению связывающего белка (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) или домена, связывающегося с молекулой-мишенью с аффинностью или с K_a (то есть, с константной равновесной ассоциации конкретного взаимодействия с единицами $1/M$), которая равна или превышает $10^5 M^{-1}$ (то есть, равна отношению константы ассоциации $[K_{on}]$ к константе диссоциации $[K_{off}]$ для этой реакции связывания), но без значительной ассоциации или объединения с какими-либо другими молекулами или компонентами в образце. Связывающие белки или связывающие домены могут быть классифицированы как "высокоаффинные" связывающие белки или связывающие домены, или как "низкоаффинные" связывающие белки или связывающие домены. "Высокоаффинные" связывающие белки или связывающие домены означают связывающие белки или связывающие домены, имеющие K_a по меньшей мере $10^7 M^{-1}$, по меньшей мере $10^8 M^{-1}$, по меньшей мере $10^9 M^{-1}$, по меньшей мере $10^{10} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{11} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{12} M^{-1}$ или по меньшей мере $10^{13} M^{-1}$. "Низкоаффинные" связывающие белки или связывающие домены означают связывающие белки или связывающие домены, имеющие K_a до $10^7 M^{-1}$, до $10^6 M^{-1}$ или до $10^5 M^{-1}$. Альтернативно, аффинность может быть определена как константа равновесной диссоциации (K_d) конкретного взаимодействия с единицами M (например, от $10^{-5} M$ до $10^{-13} M$). Термины "связывание" и "специфическое связывание" и аналогичные термины не включают неспецифическое связывание.

Связывание связывающего белка может быть определено или оценено с помощью подходящего анализа, такого как, например, анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) например, с использованием системы *Viasage*TM; анализы на кинетическое исключение, такие как *KinExA*[®]; и анализы с применением биослойной интерферометрии (например, с использованием платформы *ForteBio*[®] Octet); анализы с применением изотермической титрационной калориметрии (ИТС) или т.п., ELISA-анализ на связывание с антигеном (например, прямой или непрямой) посредством визуализации, например, по оптической плотности на 450 нм, или с помощью проточной цитометрии, или т.п.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающие белки согласно изобретению могут связываться с областью антигенной петли HBsAg. Оболочка вируса гепатита В обычно содержит три "оболочечных белка HBV" (также называемых "HBsAg", "поверхностным антигеном гепатита В"): S-белок (для "небольшой молекулы", также обозначаемый S-HBsAg), M-белок (для "средней молекулы", также обозначаемый M-HBsAg) и L-белок (для "крупной молекулы", также обозначаемый L-HBsAg). S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg имеют один и тот же С-конец (также называемый "S-доменом", 226 аминокислот), который соответствует S-белку (S-HBsAg), и который играет важную роль в сборке и инфекционности вируса. S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме (ER), а затем подвергаются сборке и секретируются в виде частиц посредством аппарата Гольджи. S-домен содержит четыре предсказанных трансмембранных (TM) домена, причем, N-конец и С-конец S-домена открыты для просвета. Трансмембранные домены TM1 и TM2, как предполагается, необходимы для котрансляционной интеграции белка в ER-мембрану, а трансмембранные домены TM3 и TM4 находятся в С-концевой трети S-домена. "Область антигенной петли" HBsAg находится между предсказанными трансмембранными доменами TM3 и TM4 S-домена HBsAg, а поэтому область антигенной петли содержит аминокислоты 101-172 S-домена, который содержит всего 226 аминокислот (Salisse J and Sureau C, 2009, Journal Of Virology 83: 9321-9328). Детерминанта инфекционности находится в области антигенной петли оболочечных белков HBV. В частности, остатки между 119 и 125 HBsAg содержат мотив CXXC, который считается важным для инфекционности HBV и HDV (Jaoude GA, Sureau C, Journal of Virology, 2005; 79: 10460-6).

Если в настоящем описании упоминаются положения в аминокислотной последовательности S-

домена HbsAg, то такие положения указаны со ссылкой на аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 (показана ниже) или на природные или искусственные варианты последовательностей.

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSP
 TSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIFLIFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTG
PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSIDGNCCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSI.LVP
 FVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI

(SEQ ID NO: 3; аминокислоты 101-172 подчеркнуты).

Так, например, термин "аминокислоты 101-172 S-домена" означает аминокислотные остатки в положениях 101-172 полипептида в соответствии с SEQ ID NO: 3. Однако, специалисту в данной области известно, что мутации или изменения (включая, но не ограничиваясь ими, замену, делецию и/или добавление, например, HBsAg другого генотипа или другого мутанта HBsAg, как описано в настоящей заявке) могут происходить в природе в аминокислотной последовательности S-домена HBsAg или могут быть искусственно введены в аминокислотную последовательность S-домена HBsAg без какого-либо влияния на его биологические свойства. Поэтому, используемый здесь термин "S-домен HBsAg" охватывает все указанные полипептиды, включая, например, полипептид согласно SEQ ID NO: 3 и его природные или искусственные мутанты. Кроме того, если в настоящей заявке описаны фрагменты последовательности S-домена HBsAg (например, аминокислоты 101-172 или аминокислоты 120-130 S-домена HBsAg), то они включают не только соответствующие фрагменты последовательности SEQ ID NO: 3, но также и соответствующие фрагменты последовательности его природных или искусственных мутантов. Так, например, выражение "аминокислотные остатки в положениях 101-172 S-домена HBsAg" охватывает аминокислотные остатки в положениях 101-172 SEQ ID NO: 3 и соответствующие фрагменты его мутантов (природных или искусственных мутантов). Используемые здесь выражения "соответствующие фрагменты последовательности" и "соответствующие фрагменты" относятся к фрагментам, которые расположены в равных положениях последовательностей, если последовательности подвергаются оптимизированному выравниванию, а именно, если эти последовательности выравнивают таким образом, чтобы получить самый высокий процент идентичности.

M-белок (M-HBsAg) соответствует S-белку, удлинённому N-концевым доменом из 55 аминокислот, называемым "pre-S2". L-белок (L-HBsAg) соответствует M-белку, удлинённому N-концевым доменом из 108 аминокислот, называемым "pre-S1" (генотип D). Пре-S1- и пре-S2-домены L-белка могут присутствовать либо на внутренней поверхности вирусных частиц (на цитоплазматической стороне ER), где, очевидно, они играют решающую роль в сборке вируса, либо на внешней поверхности (на стороне просвета ER), доступной для взаимодействия с клетками-мишенями и играющей важную роль в инфекционности вируса. Кроме того, поверхностные белки HBV (HBsAg) не только включаются в оболочки вириона, но также могут спонтанно отпочковываться из мембран промежуточных компартментов ER-аппарата Гольджи с образованием пустых "субвирусных частиц" (SVP), которые высвобождаются из клетки посредством секреции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок связываются с областью антигенной петли HBsAg и способны связываться со всеми S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок нейтрализует инфекцию, вызываемую вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижает инфекционность вируса гепатита В и вируса гепатита дельта.

Для изучения и количественной оценки инфекционности вируса (или "нейтрализации") в лаборатории могут быть проведены стандартные "анализы на нейтрализацию". Для анализа на нейтрализацию, вирусы животных обычно размножают в клетках и/или в клеточных линиях. Может быть проведен анализ на нейтрализацию, в котором культивируемые клетки инкубируют с фиксированным количеством HBV или HDV в присутствии (или в отсутствии) антитела (или антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка), подлежащего тестированию. В таком анализе могут быть оценены уровни поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) или антигена гепатита В (HBeAg), секретлируемого в супернатант клеточной культуры, и/или может быть проведено окрашивание на HBsAg с получением данных. Так, например, для HDV может быть проведено иммунофлуоресцентное окрашивание на дельта-антиген.

В конкретном варианте осуществления анализа на нейтрализацию HBV, культивируемые клетки, например, клетки НераRG, такие как дифференцированные клетки НераRG, инкубируют с фиксированным количеством HBV в присутствии или в отсутствии тестируемого антитела. В таком варианте осуществления изобретения, инкубирование может быть проведено, например, в течение 16 часов при 37°C. Инкубирование может быть проведено в среде (например, с добавлением 4% ПЭГ 8000). После инкубирования, клетки могут быть промыты и дополнительно культивированы. Для измерения

инфекционности вируса, уровни поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) и антигена е гепатита В (HBeAg), секретированного в супернатант культуры, например, со дня 7 до дня 11 после инфицирования, можно определить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Кроме того, окрашивание на HBsAg может быть проведено с помощью иммунофлуоресцентного анализа. В варианте анализа на нейтрализацию HDV может быть проведен, по существу, тот же самый анализ, как и для HBV, лишь с тем отличием, что сыворотки от HDV-носителей могут быть использованы в качестве инокулята HDV-инфекции на дифференцированных клетках HeparG (вместо HBV). Для детектирования могут быть использованы данные иммунофлуоресцентного окрашивания на антиген дельта.

Варианты связывающих белков согласно изобретению обладают высокой нейтрализующей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация описанного здесь антитела, необходимая для 50% нейтрализации вируса гепатита В (HBV) и вируса гепатита дельта (HDV), составляет, например, приблизительно 10 мкг/мл или менее. В других вариантах осуществления изобретения, концентрация связывающего белка, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет приблизительно 5 мкг/мл. В других вариантах осуществления изобретения, концентрация описанного здесь белка, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет приблизительно 1 мкг/мл. В других вариантах осуществления изобретения, концентрация связывающего белка, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет приблизительно 750 нг/мл. В других вариантах осуществления изобретения, концентрация связывающего белка, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет 500 нг/мл или менее. В таких вариантах осуществления изобретения, концентрация описанного здесь связывающего белка, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, может быть выбрана из 450 нг/мл или менее, 400 нг/мл или менее, 350 нг/мл или менее, 300 нг/мл или менее, 250 нг/мл или менее, 200 нг/мл или менее, 175 нг/мл или менее, 150 нг/мл или менее, 125 нг/мл или менее, 100 нг/мл или менее, 90 нг/мл или менее, 80 нг/мл или менее, 70 нг/мл или менее, 60 нг/мл или менее или 50 нг/мл или менее.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, которые могут нейтрализовать как HBV, так и HDV, могут быть использованы для профилактики и лечения гепатита В и гепатита D. Инфицирование HDV обычно происходит одновременно с инфицированием HBV или после него (например, инокуляция HDV В в отсутствие HBV не вызывает гепатита D, поскольку HDV, для его собственной репликации требуется наличие HBV), и гепатит D обычно наблюдается у хронических носителей HBV.

Варианты раскрытых связывающих белков способствуют клиренсу HBsAg и HBV. В конкретных вариантах осуществления изобретения, связывающие белки стимулируют клиренс как HBV, так и субвирусных частиц вируса гепатита В (SVP). Клиренс HBsAg или субвирусных частиц может быть оценен путем измерения уровня HBsAg, например, в пробе крови, взятой, например, у пациента с гепатитом В. Аналогичным образом, клиренс HBV может быть оценен путем измерения уровня HBV, например, в пробе крови, взятой, например, у пациента с гепатитом В.

В сыворотке пациентов, инфицированных HBV, помимо инфекционных частиц (HBV), обычно присутствует избыток (обычно в 1000-100000 раз) пустых субвирусных частиц (SVP), состоящих только из оболочечных белков HBV (HBsAg) в форме относительно небольших сфер и нитей различной длины. Было показано, что субвирусные частицы сильно повышают внутриклеточную репликацию вирусов и генную экспрессию HBV (Bruns M. et al., 1998, J. Virol. 72 (2): 1462-1468). Это также важно с точки зрения инфекционности сывороток, содержащих HBV, поскольку инфекционность зависит не только от числа вирусов, но также и от числа SVP (Bruns M et al., 1998, J. Virol. 72 (2): 1462-1468). Кроме того, избыток субвирусных частиц может служить в качестве ловушки благодаря поглощению нейтрализующих антител и, следовательно, замедлять клиренс инфекции. В некоторых случаях считается, что потеря поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) является идеальной конечной точкой лечения и наиболее близкой к положительному результату лечения хронического гепатита В (CHB).

Варианты связывающих белков согласно изобретению могут стимулировать клиренс HbsAg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающие белки могут стимулировать клиренс субвирусных частиц вируса гепатита В. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающие белки могут быть использованы для лечения хронического гепатита В.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению способен связываться с HBsAg генотипа, выбранного из генотипов HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающие белки согласно изобретению способны связываться с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 генотипами HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. Примерами различных генотипов HBsAg являются следующие генотипы: GenBank, номер доступа J02203 (HBV-D, ауw3); GenBank, номер доступа FJ899792.1 (HBV-D, adw2); GenBank, номер доступа AM282986 (HBV-A); GenBank, номер доступа D23678 (HBV-B1, Япония); GenBank, номер доступа AB117758 (HBV-C1, Камбоджа); GenBank, номер доступа AB205192 (HBV-E, Гана); GenBank, номер доступа X69798 (HBV-F4, Бразилия); GenBank, номер доступа AF160501 (HBV-G, США); GenBank, номер доступа AY090454 (HBV-H, Никарагуа); GenBank, номер доступа AF241409 (HBV-I, Вьетнам); и

GenBank, номер доступа AB486012 (HBV-J, Борнео). Примеры аминокислотных последовательностей области антигенной петли S-домена HBsAg различных генотипов описаны в настоящей заявке (например, SEQ ID NO: 5-15).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться с одним или более, а в некоторых случаях, по меньшей мере с 6 из 10 генотипов HBsAg, A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться по меньшей мере с 8 из 10 генотипов A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться со всеми 10 генотипами HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. HBV дифференцируется в несколько генотипов в соответствии с геномной последовательностью. До настоящего времени были определены восемь хорошо известных генотипов (A-H) генома HBV. Кроме того были идентифицированы два других генотипа I и J (Sunbul M, 2014, World J. Gastroenterol 20 (18): 5427-5434). Известно, что генотип влияет на прогрессирование заболевания, и были определены различия между генотипами в ответ на противовирусную терапию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению способен связываться с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 мутантами HBsAg, имеющими мутации в области антигенной петли, где такие мутанты выбраны из HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R и HBsAg N146A. Эти мутанты представляют собой встречающиеся в природе мутанты на основе S-домена генотипа HBsAg D, GenBank, номер доступа No. FJ899792 (SEQ ID NO: 4). Мутированный(е) аминокислотный(е) остаток(остатки) в каждом из описанных здесь мутантов указан(ы) по его(их) названию.

SEQ ID NO: 4:

MENVTSGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQS
 PITSNHSPTSCPPITCPGYRWMCLRRFHFHFLFLLLCFLFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTGT
GPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVP
 FVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCLWVYI

(область антигенной петли, то есть, аминокислоты 101-172, подчеркнута).

Аминокислотные последовательности области антигенной петли S-домена HBsAg различных мутантов показаны в SEQ ID NO: 16-33.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь связывающий белок способен связываться с одним или более, а в некоторых случаях, по меньшей мере, с 12 инфекционными мутантами HBsAg, выбранными из HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R и HBsAg N146A. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться по меньшей мере с 15 инфекционными мутантами HBsAg, выбранными из HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R и HBsAg N146A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться с каждым из нижеприведенных инфекционных мутантов HBsAg: HBsAg Y100C/P120T; HBsAg P120T; HBsAg P120T/S143L; HBsAg C121S; HBsAg R122D; HBsAg R122I; HBsAg T123N; HBsAg Q129H; HBsAg Q129L; HBsAg M133H; HBsAg M133L; HBsAg M133T; HBsAg K141E; HBsAg P142S; HBsAg S143K; HBsAg D144A; HBsAg G145R; и HBsAg N146A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок (например, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) способен снижать концентрацию ДНК HBV в сыворотке млекопитающего, имеющего HBV-инфекцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен снижать концентрацию HBsAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего HBV-инфекцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен снижать концентрацию HBsAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего HBV-инфекцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен снижать концентрацию HBsAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего HBV-инфекцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен снижать концентрацию ДНК HBV, HBsAg, HBeAg и/или HBcAg в сыворотке у млекопитающего в течение приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней после одного введения связывающего белка.

Термин "эпитоп" или "антигенный эпитоп" включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или белковую детерминанту, которая распознается и специфически связывается с родственной связывающей молекулой, такой как иммуноглобулин, химерный антигенный рецептор или другая связывающая молекула, домен или белок. Эпитопные детерминанты обычно содержат химически

активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и могут иметь специфические трехмерные структурные свойства, а также специфические зарядовые свойства.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться с эпитопом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, или по меньшей мере четыре аминокислоты области антигенной петли HbsAg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться по меньшей мере с двумя аминокислотами, выбранными из аминокислот 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться по меньшей мере с тремя аминокислотами, выбранными из аминокислот 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок способен связываться по меньшей мере с четырьмя аминокислотами, выбранными из аминокислот 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. В данном описании, положение аминокислот (например, 115-133, 120-133, 120-130) относится к S-домену HBsAg, как описано выше, который присутствует во всех трех оболочечных белках HBV S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg, где S-HBsAg обычно соответствует S-домену HBsAg.

Используемый здесь термин "образуемый", если он относится к эпитопу, означает, что эпитоп, с которым связывается связывающийся белок, может быть линейным (непрерывным) или конформационным (прерывистым). Линейный или прямой эпитоп представляет собой эпитоп, который распознается антителом в соответствии с его линейной аминокислотной последовательностью или первичной структурой. Конформационный эпитоп может распознаваться в соответствии с его трехмерной формой и белковой структурой. В соответствии с этим, если эпитоп является линейным эпитопом и содержит более, чем одну аминокислоту, расположенную в положениях, выбранных из аминокислотных положений 115-133 или из аминокислотных положений 120-133 S-домена HBsAg, то аминокислоты, входящие в этот эпитоп, могут быть расположены в соседних положениях первичной структуры (например, представляют собой последовательно расположенные аминокислоты в аминокислотной последовательности). В случае конформационного эпитопа (трехмерной структуры), аминокислотная последовательность обычно образует трехмерную структуру в виде эпитопа, и, таким образом, аминокислоты, образующие эпитоп, могут находиться, а могут и не находиться в соседних положениях первичной структуры (то есть, они могут представлять собой, а могут и не представлять собой последовательно расположенные аминокислоты в аминокислотной последовательности).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп, с которым связывается связывающийся белок, представляет собой конформационный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере две аминокислоты области антигенной петли HBsAg, где по меньшей мере две аминокислоты выбраны из аминокислот 120-133 или из аминокислот 120-130 S-домена HBsAg, и где по меньшей мере две аминокислоты не находятся в соседних положениях (первичной структуры). В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере три аминокислоты области антигенной петли HBsAg, где по меньшей мере три аминокислоты выбраны из аминокислот 120-133 или из аминокислот 120-130 S-домена HBsAg, и где по меньшей мере две из трех аминокислот не находятся в соседних положениях (первичной структуры). В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере четыре аминокислоты области антигенной петли HBsAg, где по меньшей мере четыре аминокислоты выбраны из аминокислот 120-133 или из аминокислот 120-130 S-домена HBsAg, и где по меньшей мере две из четырех аминокислот не находятся в соседних положениях (первичной структуры).

Аминокислоты, с которыми связываются описанные здесь антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок (то есть, аминокислоты, образующие эпитоп), которые не находятся в соседних положениях первичной структуры, в некоторых случаях, отделены друг от друга одной или более аминокислотами, с которыми не связываются антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять аминокислот могут быть расположены между двумя аминокислотами, не локализованными в соседних положениях, имеющих в эпитопе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере аминокислоты P120, 021, R122 и C124 S-домена HBsAg. В других вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 88:

PCRXC

где X означает любую аминокислоту или ее отсутствие; X означает любую аминокислоту; X означает T, Y, R, S или F; X означает T, Y или R; или X означает T или R.

В других вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 80:

TGPCRTC

или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 80.

В других вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 85:

STTSTGPCRTC

или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 145-151 S-домена HBsAg:

GNCTCIP

(SEQ ID NO: 81).

В других вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 80 и аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 81.

В других вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 85 и/или аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 87.

Как описано выше, эпитоп, с которым связывается связывающийся белок согласно изобретению, может быть линейным (непрерывным) или конформационным (прерывистым). В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с конформационным эпитопом, а в некоторых таких вариантах осуществления изобретения, конформационный эпитоп присутствует только в невозстанавливающих условиях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с линейным эпитопом. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, линейный эпитоп присутствует в невозстанавливающих условиях и восстанавливающих условиях.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом в антигенной петле HBsAg, образованной аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 1:

$$X_1 X_2 X_3 TC X_4 X_5 X_6 A X_7 G$$

где X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 могут представлять собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 представляют собой аминокислоты, которые были консервативно заменены по сравнению с аминокислотами 120-130 SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 представляют собой аминокислоты, которые были консервативно заменены по сравнению с аминокислотами 20-30 любой из SEQ ID NO 5-33.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, X_1 в SEQ ID NO: 1 представляет собой небольшую аминокислоту. Используемый здесь термин "небольшая" аминокислота означает любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, цистеина, глицина, пролина, серина, треонина и валина. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, X_1 представляет собой пролин, серин или треонин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_2 в SEQ ID NO: 1 представляет собой небольшую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_2 может быть выбран из цистеина или треонина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_3 в SEQ ID NO: 1 представляет собой заряженную аминокислоту или алифатическую аминокислоту. Используемый здесь термин "заряженная" аминокислота означает любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и гистидина. Используемый здесь термин "алифатическая" аминокислота означает любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, глицина, изолейцина, лейцина и валина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_3 выбран из аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты или изолейцина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_4 SEQ ID NO: 1 представляет собой небольшую аминокислоту и/или гидрофобную аминокислоту. Используемый здесь термин "гидрофобная" аминокислота означает любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, валина, триптофана, тирозина, метионина, пролина и глицина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_4 выбран из метионина или треонина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_5 SEQ ID NO: 1 представляет собой небольшую аминокислоту и/или гидрофобную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_5 выбран из треонина, аланина или изолейцина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, X_6 SEQ ID NO: 1 представляет собой небольшую аминокислоту и/или гидрофобную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, X₆ выбран из треонина, пролина или лейцина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, X₇ SEQ ID NO: 1 представляет собой полярную аминокислоту или алифатическую аминокислоту. Используемый здесь термин "полярная" аминокислота означает любую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты, аспарагина, аргинина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, глутамина, триптофана, тирозина, серина и треонина. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, X₇ представляет собой глутамин, гистидин или лейцин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом в антигенной петле HBsAg, образованной аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2:

X₁ X₂ X₃ TC X₄ X₅ X₆A X₇G

где X₁ представляет собой P, T или S,

X₂ представляет собой C или S,

X₃ представляет собой R, K, D или I,

X₄ представляет собой M или T,

X₅ представляет собой T, A или I,

X₆ представляет собой T, P или L, и

X₇ представляет собой Q, H или L

(SEQ ID NO: 2)

Что касается эпитопов, образованных аминокислотными последовательностями в соответствии с SEQ ID NO: 1 или 2, то следует отметить, что используемый здесь термин "образуемый" не означает, что раскрытый связывающий белок обязательно будет связываться с каждой аминокислотой SEQ ID NO: 1 или 2. В частности, связывающий белок может связываться только с некоторыми из аминокислот SEQ ID NO: 1 или 2, в результате чего другие аминокислотные остатки могут действовать как "спейсеры".

В конкретных вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с эпитопом в антигенной петле HBsAg, образованной одной или более, двумя или более, тремя или более, или четырьмя или более аминокислотами аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO 5-33, приведенной ниже в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается с областью антигенной петли HBsAg, имеющей аминокислотную последовательность в соответствии с любой одной или более из SEQ ID NO 5-33, приведенной ниже в Таблице 3, или с ее вариантом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению связывается со всеми вариантами антигенных петель HBsAg, имеющих аминокислотную последовательность, соответствующую любой из SEQ ID NO 5-33, приведенной ниже в табл. 3.

Табл. 3: репрезентативные аминокислотные последовательности области антигенной петли S-домена HBsAg (остатки 101-172 S-домена HBsAg, за исключением SEQ ID NO: 16, которая относится к остаткам 100-172 S-домена HBsAg, имеют релевантную мутацию) с различными используемыми здесь генотипами и мутантами.

Название	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
J02203 (D, ayw3)	5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCC TKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
FJ899792 (D, adw2)	6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
AM282986 (A)	7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRFSW
D23678 (B1)	8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCCCT KPTDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRFSW
AB117758 (C1)	9	QGMLPVCPLIPGTTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFSW
AB205192 (E)	10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMFPSCCCS KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
X69798 (F4)	11	QGMLPVCPLIPGTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCC SKPSDGNCTCIPISSWALGKYLWEWASARFSW
AF160501 (G)	12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRFSW
AY090454 (H)	13	QGMLPVCPLIPGTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCC TKPSDGNCTCIPISSWAFGKYLWEWASARFSW
AF241409 (I)	14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASARFSW
AB486012 (J)	15	QGMLPVCPLIPGTTTSTGPCRTCTITAQGTSMFPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFKFLWEWASVRFSW

HBsAg Y100C/P120T	16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCC CTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P120T	17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCC TKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P120T/S143L	18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCC TKPLDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg C121S	19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg R122D	20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYPSCCC TKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg R122I	21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg T123N	22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMYPSCCC TKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg Q129H	23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg Q129L	24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133H	25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSHYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133L	26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSLYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133T	27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSYPSCCCT KPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg K141E	28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT EPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P142S	29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT KSSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg S143K	30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT KPKDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg D144A	31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT KPSAGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg G145R	32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT KPSDRNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg N146A	33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT KPSDGACTIONCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, включающему: (i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую последовательность, которая по меньшей мере на 90% (то есть, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 41 или 67; и (ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 42; 59; 65; 89, 90 или 111-120, при условии, что аминокислота в положении 40 V_L в соответствии с нумерацией IMGT не является цистеином, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию, вызываемую вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

В других вариантах осуществления изобретения, (i) V_H содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 41 или 67; и/или (ii) V_L содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с любой из SEQ ID NO: 42, 59, 65, 89, 90 или 111-120.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в положении 40 V_L представляет собой аланин. В других вариантах осуществления изобретения, аминокислота в положении 40 V_L представляет собой серин. В других вариантах осуществления изобретения, аминокислота в положении 40 V_L представляет собой глицин.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с SEQ ID NO: (i) 34-36, 37, 38 и 40 соответственно; (ii) 34, 66, 37, 39 и 40, соответственно; (iii) 34-36, 37, 39 и 40, соответственно; (iv) 34, 66, 36, 37, 39 и 40, соответственно; (v) 34-36, 37, 38 и 58 соответственно; (vi) 34, 66, 36, 37, 38 и 58, соответственно; (vii) 34-36, 37, 39 и 58, соответственно; или (viii) 34, 36, 36, 37, 39 и 58, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V_L антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V_L антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 90. В других вариантах осуществления изобретения, V_L антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с любой из SEQ ID NO: 111-120. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V_H содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 41. В других вариантах осуществления изобретения, V_H содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 67.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, V_H содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 41, а V_L содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 89. В других вариантах осуществления изобретения, V_H содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 41, а V_L содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V_H содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 41, а V_L содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с любой из SEQ ID NO: 111-120. В других вариантах осуществления изобретения, V_H содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 67, а V_L содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с любой из SEQ ID NO: 89, 90 и 111-120.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, включающему: (i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 41 или 67; и (ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 96, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию, вызываемую вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

В других вариантах осуществления изобретения, (i) V_H содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 95; и/или (ii) V_L содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с SEQ ID NO: 97-102, соответственно.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, V_H содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 95; а V_L содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 96.

Fc-Фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) согласно изобретению содержит Fc-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент может происходить от человека, например, от человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4, или от Ig другого класса или изотипа. В конкретных вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты могут содержать Fc-фрагмент, происходящий от человеческого IgG1.

Используемый здесь термин "Fc-фрагмент" означает последовательность, содержащую часть, состоящую из части, состоящую по существу из части, или происходящую от части тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирной области непосредственно перед сайтом расщепления папаином (например, остатком 216 в нативном IgG, если учесть, что первый остаток константной области тяжелой цепи находится в положении 114), и заканчивающейся С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина. Соответственно, Fc-фрагмент может представлять собой полноразмерный Fc-фрагмент или его часть (например, домен). В некоторых вариантах осуществления изобретения, полноразмерный Fc-фрагмент содержит шарнирную область, СН2-домен и СН3-домен (например, аминокислоты в положениях 216-446 по EU). Дополнительный лизиновый остаток (K) иногда присутствует у крайнего С-конца Fc-фрагмента, но часто он отщепляется от зрелого антитела. Аминокислотные положения в Fc-фрагменте пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU

по Кэбату, см. например, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 1983 и 1987. Аминокислотные положения Fc-фрагмента также могут быть пронумерованы в соответствии с системой нумерации IMGT (включая уникальную нумерацию для C-домена и экзона) и системой нумерации по Кэбату.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент содержит по меньшей мере один из шарнирного домена (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области), CH2-домена, CH3-домена или их варианта, части или фрагмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент содержит по меньшей мере шарнирный домен, CH2-домен или CH3-домен. В других вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент представляет собой полноразмерный Fc-фрагмент. Аминокислотная последовательность репрезентативного Fc-фрагмента изотипа человеческого IgG1 представлена в SEQ ID NO: 137. Fc-фрагмент может также содержать одну или более аминокислотных инсерций, делеций или замен по сравнению с природным Fc-фрагментом. Так, например, по меньшей мере один из шарнирного домена, CH2-домена или CH3-домена или их части может быть делетирован. Так, например, Fc-фрагмент может содержать или состоять из них: (i) шарнирный домен (или его часть), связанный с CH2-доменом (или его частью), (ii) шарнирный домен (или его часть), связанный с CH3-доменом (или его частью), (iii) CH2-домен (или его часть), связанный с CH3-доменом (или его частью), (iv) шарнирный домен (или его часть), (v) CH2-домен (или его часть), или (vi) CH3-домен или его часть.

Fc-фрагмент согласно изобретению может быть модифицирован так, чтобы он имел изменения в аминокислотной последовательности полноразмерного Fc-фрагмента встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина, но при этом, сохранял или усиливал по меньшей мере одну желаемую функцию, сообщаемую природным Fc-фрагментом, и/или снижал нежелательную функцию встречающегося в природе Fc-фрагмента. Такие функции включают, например, связывание с Fc-рецептором (FcR), модуляцию времени полужизни антитела (например, посредством связывания с FcRn), функцию ADCC, связывание с белком А, связывание с G-белком и связывание с комплементом. Части природных Fc-фрагментов, которые сообщают такие функции, были описаны в литературе.

Так, например, для активации каскада комплемента, комплекс белка C1q может быть связан по меньшей мере с двумя молекулами IgG1 или с одной молекулой IgM, если молекула(ы) иммуноглобулина присоединена(ы) к антигенной мишени (Ward, E. S., and Ghetie, V. *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94). Burton, D. R. {*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206}, указывают на то, что область тяжелой цепи, содержащая аминокислотные остатки 318-337, участвует в фиксации комплемента. Duncan, A. R. и Winter, G. {*Nature* 332 (1988) 738-740}, которыми был проведен сайт-направленный мутагенез, сообщили, что Glu318, Lys320 и Lys322 образуют сайт связывания с C1q. Роль остатков Glu318, Lys320 и Lys322 в связывании с C1q подтверждается способностью короткого синтетического пептида, содержащего эти остатки, ингибировать опосредованный комплементом лизис.

Так, например, связывание FcR может быть опосредовано взаимодействием Fc-фрагмента (антитела) с Fc-рецепторами (FcR), которые являются специализированными рецепторами клеточной поверхности на клетках, включая гемопоэтические клетки. Fc-рецепторы принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов и, как было показано, опосредуют удаление покрытых антителом патогенов посредством фагоцитоза иммунных комплексов и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC; Van de Winkel, JG, and Anderson, C L, *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). FcR определяют по их специфичности к классам иммуноглобулинов; Fc-рецепторы для антител IgG называются FcγR, для IgE - FcεR, для IgA - FcαR и т.п., а неонатальные Fc-рецепторы обозначаются FcRn. Связывание с Fc-рецептором описано, например, Ravetch J.V. и Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P.J, et al. *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M. et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; и Gessner J.E., et al. *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

Перекрестное связывание рецепторов с Fc-доменом нативных антител IgG (FcγR) запускает эффекторные функции широкого ряда, включая фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность и высвобождение медиаторов воспаления, а также клиренс иммунных комплексов и регуляцию продуцирования антител. Fc-фрагменты, обеспечивающие перекрестное связывание рецепторов (например, FcγR), рассматриваются в настоящей заявке. У человека было охарактеризовано три класса FcγR, которые представляют собой: (i) FcγRI (CD64), который связывается с мономерным IgG с высокой аффинностью и экспрессируется на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и эозинофилах; (ii) FcγRII (CD32), который связывается с комплексным IgG со средней-низкой аффинностью, широко экспрессируется, в частности, на лейкоцитах, и, как считается, играет главную роль в антителопосредуемом иммунитете, и может быть подразделен на FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIC, которые выполняют различные функции в иммунной системе, но связываются с аналогично низкой аффинностью с IgG-Fc, и эктодомены этих рецепторов являются в высокой степени гомологичными; и (iii) FcγRIII (CD16), который связывается с IgG со средней-низкой аффинностью, и был обнаружен в двух формах: FcγRIIIA, который был обнаружен на NK-клетках, макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и Т-клетках, и, как предполагается, опосредует ADCC; и FcγRIIIB, который в высокой степени

экспрессируется на нейтрофилах.

Fc γ RIIA обнаруживается на многих клетках, участвующих в цитолизе (например, макрофагах, моноцитах, нейтрофилах), и, очевидно, может активировать процесс цитолиза. По-видимому, Fc γ RIIB играет определенную роль в процессах ингибирования и обнаруживается на В-клетках, макрофагах, тучных клетках и на эозинофилах. Важно отметить, как было показано, что 75% всех Fc γ RIIB находится в печени (Ganesan, L. P. et al., 2012: "Fc γ RIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes" *Journal of Immunology* 189: 4981-4988). Fc γ RIIB экспрессируется в большом количестве на синусоидальной эндотелии печени, называемом LSEC, и в клетках Купфера в печени, и LSEC является основным участком клиренса небольших иммунных комплексов (Ganesan, L. P. et al., 2012: Fc γ RIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes, *Journal of Immunology* 189: 4981-4988).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь антитела и их антигенсвязывающие фрагменты содержат Fc-фрагмент для связывания с Fc γ RIIB, а в частности, с Fc-областью, такие как, например, антитела типа IgG. Кроме того, может быть сконструирован Fc-фрагмент для усиления связывания Fc γ RIIB путем введения мутаций S267E и L328F, как описано Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933. Таким образом, клиренс иммунных комплексов может быть усилен (Chu, S., et al., 2014: Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xma7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor Fc γ RIIb. *Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts*). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела согласно изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты содержат сконструированный Fc-фрагмент с мутациями S267E и L328F, в частности, как описано Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933.

По-видимому, на В-клетках, Fc γ RIIB функционирует как ингибитор дальнейшего продуцирования иммуноглобулина и переключения изотипа, например, класса IgE. Было высказано предположение, что на макрофагах, Fc γ RIIB ингибирует фагоцитоз, опосредованный Fc γ RIIA. На эозинофилах и тучных клетках, В-форма может способствовать подавлению активации этих клеток посредством связывания IgE со своим отдельным рецептором.

Что касается связывания с Fc γ RI, то модификация в нативном IgG по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329 снижает уровень связывания с Fc γ RI. Замена остатков IgG2 в соответствующих положениях 233-236 на IgG1 и IgG4 снижает уровень связывания IgG1 и IgG4 с Fc γ RI в 10^3 раз и элиминирует ответ моноцитов человека на сенсibilизированные антителом эритроциты (Armour, K. L., et al. *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624).

Что касается связывания с Fc γ RII, то уменьшение уровня связывания с Fc γ RIIA наблюдается, например, для мутации по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 и K414 в IgG.

Двумя аллельными формами человеческого Fc γ RIIA являются вариант "H131", который связывается с Fc IgG1 с высокой аффинностью, и вариант "R131", который связывается с Fc IgG1 с низкой аффинностью. См. например, Bruhns et al., *Blood* 113:3716-3725 (2009).

Что касается связывания Fc γ RIII, то снижение уровня связывания с Fc γ RIIIA обнаруживается, например, для мутации по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 и D376. Картирование сайтов связывания на человеческом IgG1 для Fc-рецепторов, вышеупомянутые сайты мутации и способы оценки связывания с Fc γ RI и Fc γ RIIA описаны Shields, R. L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604.

Две аллельные формы человеческого Fc γ RIIIA представляют собой вариант "F158", связывается с Fc IgG1 с низкой аффинностью, и вариант "V158", который связывается с Fc IgG1 с высокой аффинностью. См. например, Bruhns et al., *Blood* 113:3716-3725 (2009).

Что касается связывания с Fc γ RII, то две области нативного Fc IgG, по-видимому, участвуют во взаимодействии между Fc γ RII и IgG, а именно: (i) с нижним сайтом шарнирной области Fc IgG, в частности, в аминокислотных остатках L, L, G, G (234-237, нумерация по EU), и (ii) с соседней областью CH2-домена Fc IgG, а в частности с петлей и нитями в верхнем CH2-домене, смежном с нижней шарнирной областью, например, в области P331 (Wines, B.D., et al., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313-5318). Кроме того, Fc γ RI, по-видимому, связывается с одним и тем же сайтом на Fc IgG, тогда как FcRn и белок А связываются с другим сайтом на Fc IgG, который, по-видимому, находится на границе CH2-CH3 (Wines, B.D., et al., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313-5318).

Также рассматриваются мутации, которые повышают аффинность связывания Fc-фрагмента согласно изобретению с Fc γ -рецептором (то есть, с одним или более) (например, по сравнению с контрольным Fc-фрагментом или антителом, содержащим этот фрагмент, который не содержит мутацию(и)). См. например, Delillo and Ravetch, *Cell* 161(5):1035-1045 (2015) and Ahmed et al., *J. Struc. Biol.* 194(1):78 (2016), где Fc-мутации и методы включены в настоящее описание посредством ссылки.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, связывающий белок может

содержать Fc-фрагмент, включающий мутацию, выбранную из G236A; S239D; A330L и I332E; или комбинацию, включающую любые два или более из них; например, S239D/I332E; S239D/A330L/I332E; G236A/S239D/I332E; G236A/A330L/I332E (также обозначаемые здесь как "GAALIE"); или G236A/S239D/A330L/I332E. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент не содержит S239D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент может содержать по меньшей мере часть или состоять по меньшей мере из части Fc-фрагмента, которая участвует в связывании с FcRn. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент содержит одну или более аминокислотных модификаций, которые повышают аффинность связывания, например, усиливают связывание с FcRn (например, при pH приблизительно 6,0), а в некоторых вариантах осуществления изобретения, увеличивают время полужизни *in vivo* молекулы, содержащей Fc-фрагмент (например, по сравнению с эталонным Fc-фрагментом или антителом, которое, в другом случае, является таким же, но не содержит модификацию(и)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент содержит Fc IgG или происходит от него, а мутация, увеличивающая время полужизни, включает любую одну или более из: M428L; N434S; N434H; N434A; N434S; M252Y; S254T; T256E; T250Q; P257I Q311I; D376V; T307A; E380A (нумерация по EU). В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация, увеличивающая время полужизни, включает M428L/N434S (также обозначаемую здесь как "MLNS"). В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация, увеличивающая время полужизни, включает M252Y/S254T/T256E. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация, увеличивающая время полужизни, включает T250Q/M428L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация, увеличивающая время полужизни, включает P257I/Q311I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация, увеличивающая время полужизни, включает P257I/N434H. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация, увеличивающая время полужизни, включает D376V/N434H. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация, увеличивающая время полужизни, включает T307A/E380A/N434A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит Fc-фрагмент, который включает мутации-замены M428L/N434S. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит Fc-фрагмент, который включает мутации-замены G236A/A330L/I332E. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент (например, IgG), который содержит мутацию G236A, мутацию A330L и мутацию I332E (GAALIE), и не содержит мутацию S239D (например, содержит нативный S в положении 239).

В конкретных вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, который содержит мутации-замены M428L/N434S и G236A/A330L/I332E, и не содержит S239D, но необязательно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, который содержит мутации-замены M428L/N434S и G236A/S239D/A330L/I332E.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению содержит: CDR и/или вариабельный домен и/или тяжелую цепь и/или легкую цепь в соответствии с любым из приведенных здесь репрезентативных антител против HBV, описанных в настоящей заявке, и/или в публикации PCT No WO 2017/060504 (включая антитела HBC34, HBC34-V7, HBC34-V23, HBC34-V31, HBC34-V32, HBC34-V33, HBC34-V34, HBC34-V35 (включая описанные здесь варианты антител HBC, которые содержат мутацию-замену в положении 40 в легкой цепи (например, замену природного цистеина на аланин, серин или т.п.) и HBC24); и Fc-Фрагмент, содержащий мутацию G236A, мутацию A330L и мутацию I332E (GAALIE), где Fc-фрагмент также содержит, но необязательно, мутацию M428L/N434S (MLNS). В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент не содержит S239D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит: аминокислотную последовательность CDRH1 в соответствии с SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность CDRH2 в соответствии с SEQ ID NO: 35 или 66, аминокислотную последовательность CDRH3 в соответствии с SEQ ID NO: 36, аминокислотную последовательность CDRL1 в соответствии с SEQ ID NO: 37, аминокислотную последовательность CDRL2 в соответствии с SEQ ID NO: 38 или 39 и аминокислотную последовательность CDRL3 в соответствии с SEQ ID NO: 58 или 40; и Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент не содержит мутацию S239D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент дополнительно содержит мутацию MLNS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит: аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) в соответствии с любой из SEQ ID NO: 41 или 67 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) в соответствии с любой из SEQ ID NO: 42, 59, 65, 89, 90 и 111-120; и Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент дополнительно содержит мутацию MLNS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 138 или 91 или 92

и/или аминокислотную последовательность легкой цепи в соответствии с любой из SEQ ID NO: 93 или 94. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 91 и аминокислотную последовательность легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 91 и аминокислотную последовательность легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 92 и аминокислотную последовательность легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 92 и аминокислотную последовательность легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит: аминокислотную последовательность CDRH1 в соответствии с SEQ ID NO: 97, аминокислотную последовательность CDRH2 в соответствии с SEQ ID NO: 98, аминокислотную последовательность CDRH3 в соответствии с SEQ ID NO: 99, аминокислотную последовательность CDRL1 в соответствии с SEQ ID NO: 100, аминокислотную последовательность CDRL2 в соответствии с SEQ ID NO: 101 и аминокислотную последовательность CDRL3 в соответствии с SEQ ID NO: 102; и Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент дополнительно содержит мутацию MLNS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит: аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) в соответствии с SEQ ID NO: 95 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) в соответствии с SEQ ID NO: 96; и Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент дополнительно содержит мутацию MLNS.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и обладает повышенной способностью связываться с человеческим FcγRIIA и/или человеческим FcγRIIAA по сравнению с контрольным полипептидом (то есть, с полипептидом, который может представлять собой связывающий белок, включающий Fc-фрагмент, который не содержит мутацию GAALIE).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эталонный полипептид включает Fc-фрагмент, который представляет собой Fc-фрагмент дикого типа (например, того же изотипа), или представляет собой Fc-фрагмент, который содержит одну или более мутаций-замен (или инсерций или делеций), при условии, что мутация-замена не является или не содержит GAALIE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит антитело HBC34-V35 с мутацией GAALIE (и необязательно с другими мутациями-заменами, такими как, например, MLNS), а эталонный полипептид представляет собой HBC34-V35 (включая Fc-фрагмент дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения, эталонный полипептид не содержит мутацию-замену, которая, как известно или как предполагается, влияет на связывание с человеческим FcγRIIA и/или с человеческим FcγRIIAA.

Связывание полипептидов, например, связывание Fc-фрагмента (или связывающего белка, содержащего этот фрагмент) и человеческого Fcγ-рецептора, такого как человеческий FcγRIIA, человеческий FcγRIIAA или человеческий FcγRIIB, или белок комплемента, такой как C1q, может быть определено или детектировано с применением методов, известных специалистам. Так, например, анализ с помощью биослойной интерферометрии (BLI) может быть осуществлен с использованием устройства Octet® RED96 (ForteBio, Fremont, California USA) в соответствии с инструкциями производителя для определения ассоциации и диссоциации в реальном времени между первым представляющим интерес полипептидом (например, HBC34v35, содержащим мутацию GAALIE) и вторым представляющим интерес полипептидом (например, FcγRIIA (H131), FcγRIIA (R131), FcγRIIA (F158), FcγRIIA (V158) или FcγRIIB), который захватывается на подложке датчика.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и обладающий повышенной способностью связываться с человеческим FcγRIIA (H131), человеческим FcγRIIA (R131), человеческим FcγRIIA (F158), человеческим FcγRIIA (V158) или любой их комбинацией по сравнению с контрольным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, не содержащий мутацию GAALIE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, повышенный уровень связывания определяют по увеличению (например, по одному или более из: более высокого пика сигнала; более высокой скорости ассоциации; более низкой скорости диссоциации; большей площади под кривой) при сдвиге сигнала по сравнению с контрольным связывающим белком в BLI-анализе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, BLI-анализ включает применение устройства Octet® RED96 (ForteBio, Fremont, California USA). В дополнительных вариантах осуществления изобретения, BLI-анализ включает захват меченого человеческого FcγR на датчике, содержащем антитело против пента-метки, и обработку связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит Fab IgG, а BLI-анализ дополнительно

включает обработку захваченного человеческого Fc γ R связывающим белком в присутствии фрагмента, связывающегося с Fab антитела IgG для перекрестного связывания связывающих белков посредством Fab-фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и обладает повышенной способностью связываться с человеческим Fc γ RIIA (H131), человеческим Fc γ RIIA (R131), человеческим Fc γ RIIA (F158), человеческим Fc γ RIIA (V158) по сравнению с контрольным полипептидом, где повышенное связывание может иметь сдвиг сигнала (в нанометрах) в BLI-анализе, который в 1,5, 2, 2,5, 3 или более раз превышает сдвиг сигнала, наблюдаемый с использованием эталонного связывающего белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE и обладает повышенной способностью связываться с человеческим Fc γ RIIA (H131), с человеческим Fc γ RIIA (R131), с человеческим Fc γ RIIA (F158), и с человеческим Fc γ RIIA (V158) по сравнению с эталонным полипептидом.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и имеет пониженный уровень связывания с человеческим Fc γ RIIB по сравнению с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и не связывается с человеческим Fc γ RIIB, как было определено, например, по отсутствию статистически значимого сдвига сигнала по сравнению с исходным уровнем в BLI-анализе.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и имеет пониженный уровень связывания с человеческим C1q (белком комплемента) по сравнению с контрольным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и не связывается с человеческим C1q, как было определено, например, по отсутствию статистически значимого сдвига сигнала по сравнению с исходным уровнем в BLI-анализе.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и активует человеческий Fc γ RIIA, человеческий Fc γ RIIA или оба, в большей степени, чем эталонный полипептид (то есть, полипептид, который может представлять собой HbsAg-специфический связывающий белок, который включает Fc-фрагмент, не содержащий мутацию GAALIE). В некоторых вариантах осуществления изобретения, эталонный полипептид включает Fc-фрагмент, который представляет собой Fc-фрагмент дикого типа или который содержит одну или более мутаций-замен, при условии, что такая мутация-замена не является GAALIE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок содержит антитело HBC34-V35 с мутацией GAALIE (и необязательно с другими мутациями-заменами, такими как, например, MLNS), а эталонным полипептидом является HBC34-V35 с Fc-фрагментом дикого типа.

Активация человеческого Fc γ R может быть определена или детектирована с применением методов, известных специалистам в данной области. Так, например, хорошо апробированный коммерчески доступный анализ с использованием биорепортера включает инкубирование HBsAg-специфического связывающего белка с рекомбинантным HBsAg (Engerix B, GlaxoSmithKline) в присутствии эффекторных клеток Jurkat (Promega; номер по каталогу G9798), стабильно экспрессирующих (i) представляющий интерес Fc γ R и (ii) люциферазный репортер светляка под контролем элемента ответа NFAT. Связывание Fc с экспрессированными на клеточной поверхности Fc γ R инициирует NFAT-опосредуемую экспрессию репортерного гена люциферазы. Затем измеряют люминесценцию с помощью люминометра (например, Bio-Tek) с использованием реагента для анализа на люциферазу Bio-Glo™ (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Активацию выражают как среднее значение относительных единиц люминесценции (RLU) по сравнению с фоном по следующей формуле: (RLU в концентрации [x] связывающего белка (например, mAb) - RLU фона).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и активует человеческий Fc γ RIIA (H131), человеческий Fc γ RIIA (R131), человеческий Fc γ RIIA (F158) и/или человеческий Fc γ RIIA (V158) в большей степени по сравнению с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, термин "более высокая степень активации" означает более высокий пик люминесценции и/или большую площадь люминесценции под кривой, как было определено с помощью люминесцентного анализа с использованием биорепортера, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и активует человеческий Fc γ RIIA (H131), человеческий Fc γ RIIA (R131), и человеческий Fc γ RIIA (F158) в большей степени, чем эталонный полипептид, где более высокая степень активации включает пик RLU, который в 1,5, 2, 2,5, 3 или более раз превышает пик RLU, наблюдаемый с использованием эталонного связывающего белка.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и не активует человеческий Fc γ RIIB, как было определено по отсутствию статистически значимой и/или измеримой RLU в люминесцентном анализе с

использованием биорепортера, как описано выше.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и активирует природную человеческую клетку-киллера (NK) в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения, активацию NK-клетки определяют по экспрессии CD107a (например, с помощью проточной цитометрии). В некоторых вариантах осуществления изобретения, NK-клетка включает клетку, которая имеет V158/V158-гомозиготный, F158/F158-гомозиготный или V158/F158-гетерозиготный генотип FcγRIIIa.

Следует отметить, что любой связывающий белок, включающий Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE согласно изобретению, может выполнять или иметь любые одну или более из описанных здесь функций, например, таких как повышенное связывание с человеческим FcγRIIA и/или с человеческим FcγRIIIA по сравнению с эталонным полипептидом; пониженное связывание с человеческим FcγRIIB по сравнению с эталонным полипептидом (и/или без связывания с человеческим FcγRIIB); пониженное связывание с человеческим Clq по сравнению с эталонным полипептидом (и/или без связывания с человеческим Clq); активация FcγRIIA, человеческого FcγRIIIA или другого в большей степени по сравнению с эталонным полипептидом; отсутствие активации человеческого FcγRIIB; и/или активация человеческой природной клетки-киллера (NK) в присутствии HBsAg в большей степени по сравнению с эталонным полипептидом (например, антителом, которое является специфичным к HBsAg и включает Fc-фрагмент, который не содержит мутацию GAALIE).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и: (i) имеет повышенное связывание с человеческим FcγRIIA, с человеческим FcγRIIIA или с тем и другим, по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E, где человеческий FcγRIIA представляет собой, но необязательно, H131 или R131, и/или человеческий FcγRIIIA представляет собой, но необязательно, F158 или V158; (ii) имеет пониженное связывание с человеческим FcγRIIB, по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E; (iii) не связывается с человеческим FcγRIIB; (iv) имеет пониженное связывание с человеческим Clq по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E; (v) не связывается с человеческим Clq; (vi) активирует FcγRIIA, человеческий FcγRIIIA или тот и другой в большей степени по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E, где человеческий FcγRIIA представляет собой, но необязательно, H131 или R131, и/или человеческий FcγRIIIA представляет собой, но необязательно, F158 или V158; (vii) не активирует человеческий FcγRIIB; (viii) активирует человеческую природную клетку-киллера (NK) в присутствии HBsAg в большей степени по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E, где эталонный полипептид представляет собой, но необязательно, антитело, которое связывается с HBsAg, и необязательно с HBsAg; (ix) имеет величину EC₅₀ HBsAg приблизительно от 12,75 нг/мл до приблизительно 19,9 нг/мл, или приблизительно от 12,75 нг/мл до приблизительно 12,84 нг/мл, или приблизительно 12,79 нг/мл, или приблизительно от 16,22 нг/мл до приблизительно 19,9 нг/мл, или приблизительно 17,97 нг/мл, и/или (b) имеет величину EC₅₀ HBeAg приблизительно от 10,78 нг/мл до приблизительно 13,72 нг/мл, или приблизительно от 10,78 нг/мл до приблизительно 10,93 нг/мл, или приблизительно 10,85 нг/мл, или приблизительно от 11,59 нг/мл до приблизительно 13,72 нг/мл, или приблизительно 12,61 нг/мл, где HBV представляет собой, но необязательно, HBV генотипа D, и где EC₅₀ определяют, но необязательно, *in vitro* путем оценки HBsAg или HBeAg, соответственно, секретлируемых клетками HepG2, сверхэкспрессирующими NTCP, и инфицированных HBV на 7-й день после введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента в клетки HepG2; (x) имеет EC₅₀ HBsAg приблизительно от 10,43 нг/мл до приблизительно 22,41 нг/мл, или приблизительно от 13,81 нг/мл до приблизительно 16,56 нг/мл, или приблизительно 15,12 нг/мл, или приблизительно от 12,24 нг/мл до приблизительно 22,41 нг/мл, или приблизительно 16,56 нг/мл, или приблизительно от 10,43 нг/мл до приблизительно 20,08 нг/мл, или приблизительно 14,47 нг/мл, и/или (b) имеет EC₅₀ HBeAg приблизительно от 10,39 нг/мл до приблизительно 13,99 нг/мл, или приблизительно от 10,63 нг/мл до приблизительно 10,66 нг/мл, или приблизительно 10,64 нг/мл, или приблизительно от 10,39 нг/мл до приблизительно 10,60 нг/мл, или приблизительно 10,49 нг/мл, или приблизительно от 13,25 нг/мл до приблизительно 13,99 нг/мл, или приблизительно 13,61 нг/мл, где HBV представляет собой, но необязательно, HBV генотипа D, и где EC₅₀ определяют *in vitro*, но необязательно, путем оценки HBsAg или HBeAg, соответственно, секретлируемых клетками HepG2, сверхэкспрессирующими NTCP, и инфицированных HBV на 7-й день после введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента в клетки HepG2; (xi) способен связываться с вариантом HBsAg, содержащим HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A или любую их комбинацию; (xii) имеет повышенное связывание с вариантом HBsAg, содержащим HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D,

HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A, или любую их комбинацию по сравнению с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с HBsAg и включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E; и/или (xiii) способен нейтрализовать (a) HBV генотипа А с EC₅₀ приблизительно 2,34 нг/мл; (b) HBV генотипа В с EC₅₀ приблизительно 2,22 нг/мл; (c) HBV генотипа С с EC₅₀ приблизительно 0,92 нг/мл; (d) HBV генотипа D с EC₅₀ приблизительно 1,10 нг/мл; (e) HBV генотипа Е с EC₅₀ приблизительно 1,12 нг/мл; (f) HBV генотипа F с EC₅₀ приблизительно 1,93 нг/мл; (g) HBV генотипа G с EC₅₀ приблизительно 1,43 нг/мл; и/или (h) HBV генотипа H с EC₅₀ приблизительно 1,93 нг/мл, где EC₅₀ необязательно определяют с использованием рекомбинантного HDV, сконструированного для экспрессии HBV генотипа HBsAg.

Альтернативно или дополнительно, Fc-фрагмент связывающего белка согласно изобретению может содержать по меньшей мере часть, которая, как известно, необходима для связывания белка А; и/или Fc-фрагмент антитела согласно изобретению включает по меньшей мере часть молекулы Fc, которая, как известно, необходима для связывания G-белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сохраненная функция включает клиренс HBsAg и HBVg. В соответствии с этим, в некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагмент содержит по меньшей мере часть, которая как известно, необходима для связывания с FcγR. Как описано выше, Fc-фрагмент может таким образом по меньшей мере содержать (i) нижний шарнирный сайт нативного Fc IgG, а в частности, аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, нумерация по EU), и (ii) смежную область CH2-домена нативного Fc IgG, а в частности, петлю и нити в верхнем CH2-доме, смежном с нижней шарнирной областью, например, в области P331, например, в области по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот в верхнем CH2-доме нативного Fc IgG вокруг P331, например, между аминокислотами 320 и 340 (нумерация по EU) нативного Fc IgG.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению содержит Fc-область. Используемый здесь термин "Fc-область" означает часть иммуноглобулина, образованную двумя или более Fc-фрагментами тяжелых цепей антитела. Так, например, Fc-область может представлять собой мономерную или "одноцепочечную" Fc-область (то есть, область scFv). Одноцепочечные Fc-области состоят из Fc-фрагментов, связанных в одной полипептидной цепи (например, кодируемых в одной непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты). Примеры областей scFv описаны в WO 2008/143954A2 и включены в настоящее описание посредством ссылки. Fc-область может представлять собой или содержать димерную Fc-область. "Димерная Fc-область" или "dcFc" означает димер, образованный Fc-фрагментами двух отдельных тяжелых цепей иммуноглобулина. Димерная Fc-область может представлять собой гомодимер из двух идентичных Fc-фрагментов (например, Fc-область природного иммуноглобулина) или гетеродимер из двух неидентичных Fc-фрагментов (например, один Fc-мономер димерной Fc-области содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию (например, замену, делецию, инсерцию или химическую модификацию), которая не присутствует в другом Fc-мономере, или один Fc-мономер может быть усеченным по сравнению с другим Fc-мономером).

Конкретные варианты включают антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие тяжелую цепь (например, VH-шарнирная область -CH1-CH2-CH3) в соответствии с SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 138, и легкую цепь (то есть, VL-CL) в соответствии с SEQ ID NO: 93 или SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 91 и легкую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 93. В других вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 92 и легкую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 94. В других вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 91 и легкую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 94. В других вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 92 и легкую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь или состоит из тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь или состоит из тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 138 и необязательно легкой цепи в соответствии с любой из SEQ ID NO: 93 или 94. Эти последовательности представлены в Списке последовательностей.

Описанные здесь Fc-фрагменты могут содержать Fc-последовательности или области одного или другого класса и/или подкласса. Так, например, Fc-фрагменты могут происходить от иммуноглобулина (например, человеческого иммуноглобулина) подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-фрагменты Fc-области принадлежат к одному и тому же классу и подклассу. Однако, Fc-область (или один или более Fc-фрагментов Fc-области) также может быть химерной, в результате чего химерная Fc-область может содержать Fc-фрагменты, происходящие от иммуноглобулинов различных классов и/или подклассов.

Так, например, по меньшей мере два из Fc-фрагментов димерной или одноцепочечной Fc-области могут происходить от иммуноглобулинов различных классов и/или подклассов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, димерная Fc-область может содержать последовательности двух или более различных изотипов или подклассов; например, SEEDbody ("сконструированные домены с обменом цепи"), см. Davis et al. *Protein Eng. Des. Sel.* 23(4):195 (2010).

Дополнительно или альтернативно, химерные Fc-области могут содержать один или более химерных Fc-фрагментов. Так, например, химерная Fc-область или фрагмент могут содержать одну или более частей, происходящих от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3), тогда как остальные Fc-области или фрагменты принадлежат к другому подклассу. Так, например, Fc-область или фрагмент Fc-полипептида может содержать CH2 и/или CH3-домен, происходящий от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG4), и шарнирную область от иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG3). Так, например, Fc-область или фрагмент может содержать шарнирную область и/или CH2-домен, происходящие от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG4) и CH3-домен от иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Так, например, химерная Fc-область может содержать Fc-фрагмент (например, полноразмерный Fc-фрагмент) иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG4) и Fc-фрагмент иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Так, например, Fc-область или фрагмент могут содержать CH2-домен иммуноглобулина IgG4 и CH3-домен иммуноглобулина IgG1. Так, например, Fc-область или фрагмент могут содержать CH1-домен и CH2-домен молекулы IgG4 и CH3-домен молекулы IgG1. Так, например, Fc-область или фрагмент могут содержать часть CH2-домена антитела конкретного подкласса, например, в положениях EU 292-340 CH2-домена. Так, например, Fc-область или фрагмент могут содержать аминокислоты в положениях 292-340 CH2, происходящего от фрагмента IgG4, остальная часть CH2 происходит от фрагмента IgG1 (альтернативно, 292-340 CH2 могут происходить от фрагмента IgG1, а остальная часть CH2 может происходить от фрагмента IgG4).

Также очевидно, что любое антитело, антигенсвязывающий фрагмент или Fc-область или фрагмент согласно изобретению могут принадлежать к любому аллотипу и/или гаплотипу. Так, например, аллотипы человеческого иммуноглобулина G включают аллотипы, раскрытые в публикации Jefferis и LeFranc, *mAbs* 1(4) 1-7 (2009), где аллотипы (включая G1m (1(a); 2(x); 3(f); и 17(z)); G2m (23(n)); G3m (21(g1); 28(g5); 11(b0); 5(b2); 13(b3); 14(b4); 10(b5); 15(s); 16(t); 6(c3); 24(c5); 26(u); и 27(v)); A2m (1 и 2); и Km (1, 2 и 3) и гаплотипы, и полученные аминокислотные последовательности и их комбинации включены в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или Fc-область или фрагмент согласно изобретению содержат IgG1-аллотип glm7, k1.

Кроме того, Fc-область или фрагмент может (дополнительно или альтернативно) содержать, например, химерную шарнирную область. Так, например, химерная шарнирная область может происходить, например, частично от молекулы IgG1, IgG2 или IgG4 (например, верхняя и нижняя шарнирная последовательность) и частично от молекулы IgG3 (например, средняя шарнирная последовательность). В другом примере, Fc-область или фрагмент может содержать химерную шарнирную область, происходящую частично от молекулы IgG1 и частично от молекулы IgG4. В другом примере, химерная шарнирная область может содержать верхний и нижний шарнирные домены молекулы IgG4 и средний шарнирный домен молекулы IgG1. Такая химерная шарнирная область может быть получена, например, путем замены пролина (Ser228Pro) в положении 228 EU в среднем шарнирном домене шарнирной области IgG4. В другом варианте осуществления изобретения, химерная шарнирная область может содержать аминокислоты в положениях 233-236 EU антитела IgG2 и/или мутацию Ser228Pro, где остальные аминокислоты шарнирной области происходят от антитела IgG4 (например, химерная шарнирная область с последовательностью ESKYGPCCPPCPAPPVAGP). Другие химерные шарнирные области, которые могут быть использованы в Fc-фрагменте антитела согласно изобретению, описаны в US 2005/0163783 A1.

В некоторых вариантах раскрытых здесь связывающих белков, Fc-фрагмент или Fc-область содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, происходящей от последовательности человеческого иммуноглобулина (например, от Fc-области или Fc-фрагмента молекулы человеческого IgG). Однако, полипептиды могут содержать одну или более аминокислот млекопитающих других видов. Так, например, Fc-фрагмент приматов или сайт связывания приматов может быть включен в рассматриваемые полипептиды. Альтернативно, одна или более мышиных аминокислот могут присутствовать в Fc-фрагменте или в Fc-области.

Молекула нуклеиновой кислоты

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, кодирующий антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению.

В табл. 4 показаны репрезентативные V_H-, V_L-, CH-, CL-, HC-и LC-кодирующие нуклеотидные последовательности согласно изобретению:

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
VH HBC34-V7, HBC34-V35, и HBC34-V34 (оптимизированные по кодонам)	103	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGCGGCTGG GTGCAGCCTGGCGGCTCCCAGAGGCTGAGCTGT GCCGCTTCTGGCAGGATCTTCCGGTCTTTTACA TGTCTTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGCAAGGGCC TGGAGTGGGTGGCTACCATCAACCAGGACGGCT CCGAGAAGCTGTATGTGGATAGCGTGAAGGGC AGATTCACAATCTCTCGCGACAACGCCAAGAAC TCCCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGAGGGTG GAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGCCGCTTGG TCTGGCAATAGCGGCGGCATGGACGTGTGGGA CAGGGCACCACCGTGTCCGTGTCCAGC
HBC34-V34 V _L (оптимизированные по кодонам)	104	AGTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCC GTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATCCCATGC AGCGGCGACAAGCTGGGCAACAAGAACGTGTCT CTGGTTTACGCATAAGCCTGGCCAGTCCCCCGT GCTGGTCACTACGAGGTGAAGTATAGGCCCCAG CGGCATCCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAACAG CGGCAATACAGCCACCCTGACAATCTCTGGCAC ACAGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCA GACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGG CGGCACCAGACTGACAGTGCTG
HBC34-V35 V _L (оптимизированные по кодонам)	105	AGTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCC GTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATCCCATGC AGCGGCGACAAGCTGGGCAACAAGAACGTGGC CTGGTTTACGCATAAGCCTGGCCAGTCCCCCGT GCTGGTCACTACGAGGTGAAGTATAGGCCCCAG CGGCATCCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAACAG CGGCAATACAGCCACCCTGACAATCTCTGGCAC ACAGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCA GACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGG CGGCACCAGACTGACAGTGCTG
HBC34-V7 V _L (оптимизированные по кодонам)	110	AGTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCC GTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATCCCATGC AGCGGCGACAAGCTGGGCAACAAGAACGTGTCT CTGGTTTACGCATAAGCCTGGCCAGTCCCCCGT GCTGGTCACTACGAGGTGAAGTATAGGCCCCAG CGGCATCCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAACAG CGGCAATACAGCCACCCTGACAATCTCTGGCAC ACAGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCA GACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGG CGGCACCAGACTGACAGTGCTG
HBC24 V _H (дикого типа)	106	gaggtgagctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctggggggtcct gagactctctgtgagcctctGGATCCACTTTTACCAATA TGCCatgagctgggtccgtcaggctccaggaaggggctggagtggtc gcaagtATTAGTGAAGTgttctgtgtttGGTATTGACAC Atactacgagactccgtaaggccggteaccatctccagagacactcca agaacacctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagacagccctt atattactgtGCGAAAGATGTCGGGGTTATCGGGTCA TACTATTACTACGCTATGGACGTCtggggtcaa
HBC24 V _L (дикого типа)	107	aaattgtgtgacgcagctccaggcaccctgtcttctccaggggaaagag ccacctctctcagggccagtCAGGGTCTTAGCAGCAGTT ACttagcctggtaccagcagaaacctggccagctcccagctcctcatat AGTGCCTCCaccagggccactggcatcccagacaggttcagtgccag tgggtctgggacagacttactctaccatcagcagactggagcctgaagatt tgaggtattactgtCAACAGTATGCTTACTCACCTCGG TGACGttcggccaagggaccaaggtggagatcaaac
HBC24 V _H (оптимизированные по кодонам)	108	GAGGTGCAGCTGCTGGAAGCGGCGGCGGCCT GGTGCAGCCCGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTG CGCCGCTCTGGCAGCACCTTACAAAGTATGC

		AATGTCTTGGGTGCGCCAGGCACCAGGCAAGGG CCTGGAGTGGGTGGCCTCCATCTCTGGCAGCGT GCCTGGCTTCGGCATCGACACCTACTATGCCGA TTCCGTGAAGGGCCGGTTTACAATCAGCAGAGA CACCTCCAAGAACACACTGTATCTGCAGATGAA TTCTCTGCGGGCCGAGGACACCGCCCTGTACTA TTGTGCCAAGGATGTGGGCGTGATCGGCAGCTA CTATTACTATGCAATGGACGTGTGGGGACAGGG AACAGCAGTGACAGTGAGCTCC
НВС24 V _L (оптимизированные кодонам)	по 109	GAGATCGTGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCACACTG TCCCTGTCCCCTGGAGAGAGAGCCACCCTGTCC TGCAGAGCCTCTCAGGGCCTGAGCTCCTCTTAC CTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCC CCTCGGCTGCTGATCTACTCTGCCTCCACCAGA GCAACAGGCATTCTTGACCGCTTCTCCGGATCT GGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACAATCAGC CGGCTGGAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTAATAT TGTGAGCAGTACGCCTATTCCCCAAGGTGGACC TTTGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAG
НВС34-V7, НВС34-V34, НВС34-V35 СН1-шарнирная область-СН2- СН3 (оптимизированные по кодонам)	130	GCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTCCTACTG GCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCCGGCGGCACA GCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTC CCAGAGCCCCTGACCGTGTCTTGGAACTCCGGC GCCCTGACCAGCGGAGTGCATAACATTTCCAGCT GTGCTGCAGAGCTCTGGCCTGTACTCTCTGTCCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCTTCCAGCCTGGGCA CCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGC CAAGCAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAG CCCAAGTCTTGTGATAAGACCCATACATGCCCT CCATGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGCCCA AGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAGGAT ACCCTGATGATCTCCAGAACCCCGAGGTGACA TGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCCT GAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGA GGAGCAGTACAACCTACCTATCGGGTGGTGTG CGTGTGACAGTGTGCTGACCAAGGATTGGCTGAA CGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCTAATAA GGCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTC CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCACAGG TGACACACTGCCTCCATCTCGCGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGA AGGGCTTCTATCCTTCCGACATCGCTGTGGAGT GGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAATTAC AAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGC TCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACA AGTCTCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCT GTTCTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATT ATACACAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCA AG
НВС34-V7, НВС34-V34, НВС34-V35 НС (VH-СН1-шарнирная область-СН2-СН3) (оптимизированные по кодонам)	по 131	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGCGGCTGG GTGCAGCCTGGCGGCTCCAGAGGCTGAGCTGT GCCGCTTCTGGCAGGATCTTCCGGTCTTTTACA TGTCTTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGCAAGGGCC TGGAGTGGGTGGCTACCATCAACCAGGACGGCT CCGAGAAGCTGTATGTGGATAGCGTGAAGGGC AGATTACAATCTCTCGCGACAACGCCAAGAAC TCCCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGAGGGTG GAGGATACCGCCGTGTAATTTGCGCCGCTTGG TCTGGCAATAGCGGCGGCATGGACGTGTGGGA CAGGGCACCAACCGTGTCCGTGTCCAGCGCCTCC

		<p> ACAAAGGGCCCAAGCGTGTTTCCACTGGCTCCC TCTTCCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCCGCT CTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAG CCCGTGACCGTGTCTTGGAACCTCCGGCGCCCTG ACCAGCGGAGTGCATACATTTCCAGCTGTGCTG CAGAGCTCTGGCCTGTA CTCTCTGTCCAGCGTG GTGACCGTGCCTCTTCCAGCCTGGGCACCCAG ACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGC AATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA GTCTTGTGATAAGACCCATACATGCCCTCCATG TCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGCCCAAGCGT GTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAGGATACCTT GATGATCTCCAGAACCCCGAGGTGACATCGCT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCCTGAGGT GAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCTAAGACCAAGCCAGGGAGGAGC AGTACA ACTCTACCTATCGGGTGGTGTCCGTGC TGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCA AGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCTAATAAGGCC TGCCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGG CCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCACAGGTGTAC AACTGCCTCCATCTCGCGATGAGCTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGC TTCTATCCTTCCGACATCGCTGTGGAGTGGGAG AGCAATGGCCAGCCAGAGAACAATTACAAGAC CACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTT CTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTC TCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTTC TGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTATAC ACAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGTG ATGAGGTACCGTGCAGCGGCCGGCAAGCCCCC CTCCCCGGGCTCTCGCGGTTCGTACGAGGAAAGC TT </p>
<p> HBC34-V7 CL (оптимизированные кодонам) </p>	<p> по 132 </p>	<p> GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACCCTG TTTCCACCCTCTTCCGAGGAGCTGCAGGCCAAC AAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCT ACCCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAAGGCTG ATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCGTGGAGACAA CAACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAAGTACG CCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGACACCAGAGC AGTGGAAGTCCCACCGCTCTTATTCTGCCAGG TGACCCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGACA GTGGCCCCACCGAGTGTCT </p>
<p> HBC34-V7 LC (VL-CL) (оптимизированные по кодонам) </p>	<p> 133 </p>	<p> AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCC GTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATCCCATGC AGCGGCGACAAGCTGGGCAACAAGAACGTGTG CTGGTTTCAGCATAAGCCTGGCCAGTCCCCCGT GCTGGTCATCTACGAGGTGAAGTATAGGCCAG CGGCATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAACAG CGGCAATACAGCCACCCTGACAATCTCTGGCAC ACAGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCA GACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGG CGGCACCAGACTGACAGTGTGGGACAGCCAA AGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCCTC TTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCT GGTGTGCTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCT GTGACAGTGGCTTGGAAAGGTGATAGCTCTCCC GTGAAGGCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAG CAAGCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAG CTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAAAGTC CCACCGCTCTTATTCTGCCAGGTGACCCATGA </p>

		GGGCAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCA CCGAGTGTCT
НВС34-V34, НВС34-V35-CL (оптимизированные по кодонам)	134	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACCCTG TTCCACCCTCTCCGAGGAGCTGCAGGCCAAC AAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCT ACCCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGAAGGCTG ATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCGTGGAGACAA CAACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAAGTACG CCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGACACCAGAGC AGTGAAGTCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGG TGACCCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGACA GTGGCCCCACCGAGTGTCT
НВС34-V34 LC (VL-CL) (оптимизированные по кодонам)	135	AGTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCC GTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATCCCATGC AGCGGCGACAAGCTGGGCAACAAGAACGTGTC CTGGTTTCAGCATAAGCCTGGCCAGTCCCCCGT GCTGGTCATCTACGAGGTGAAGTATAGGCCAG CGGCATCCCTGAGCGTTCTCTGGCTCCAACAG CGGCAATACAGCCACCCTGACAATCTCTGGCAC ACAGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCA GACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGG CGGCACCAGACTGACAGTGTGGGACAGCCAA AGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTCCACCCTC TTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCT GGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCT GTGACAGTGGCTTGAAGGCTGATAGCTCTCCC GTGAAGGCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAG CAAGCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAG CTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGAAGTC CCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGACCCATGA GGGCAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCA CCGAGTGTCT
НВС34-V35 LC (VL-CL) (оптимизированные по кодонам)	136	AGTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCC GTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATCCCATGC AGCGGCGACAAGCTGGGCAACAAGAACGTGGC CTGGTTTCAGCATAAGCCTGGCCAGTCCCCCGT GCTGGTCATCTACGAGGTGAAGTATAGGCCAG CGGCATCCCTGAGCGTTCTCTGGCTCCAACAG CGGCAATACAGCCACCCTGACAATCTCTGGCAC ACAGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCA GACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGG CGGCACCAGACTGACAGTGTGGGACAGCCAA AGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTCCACCCTC TTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCT GGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCT GTGACAGTGGCTTGAAGGCTGATAGCTCTCCC GTGAAGGCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAG CAAGCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAG CTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGAAGTC CCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGACCCATGA GGGCAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCA CCGAGTGTCT

Из-за избыточности генетического кода, настоящее изобретение также включает варианты последовательностей этих последовательностей нуклеиновых кислот, и, в частности, такие варианты последовательностей, которые кодируют одинаковые аминокислотные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности в соответствии с любой из SEQ ID NO: 103-110 и 130-136, где нуклеотидная последовательность представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии клеткой-хозяином.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты согласно

изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с любой из SEQ ID NO: 103-110 и 130-136.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид содержит V_H -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 103 и V_L -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 105. В других вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид содержит V_H -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 103, и V_L -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 104. В других вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид содержит V_H -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 108, и V_L -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 109.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, которые кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где полинуклеотид содержит V_H -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 103, и V_L -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 110 или состоит из этих последовательностей, где кодируемое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализуют инфекцию, вызываемую вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

В любом из описанных здесь вариантов осуществления изобретения, полинуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую CH_1 -шарнирную область- CH_2 - CH_3 , в соответствии с SEQ ID NO: 130, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую HC (VH - CH_1 -шарнирную область- CH_3 - CH_3), в соответствии с SEQ ID NO: 131. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид содержит CL -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 132, и/или LC (VL - CL)-кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 133. В других вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид содержит CL -кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 134, и/или LC (VL - CL)-кодирующую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135 или SEQ ID NO: 136.

Векторы.

Кроме того, в объем настоящего изобретения входят векторы, например экспрессионные векторы, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению.

Термин "вектор" означает конструкцию, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты. Вектор согласно изобретению является подходящим для включения или удерживания нужной последовательности нуклеиновой кислоты. Такими векторами могут быть векторы для хранения, экспрессионные векторы, клонирующие векторы, векторы для переноса и т.п. Вектор для хранения представляет собой вектор, который обеспечивает удобство хранения молекулы нуклеиновой кислоты. Таким образом, этот вектор может содержать последовательность, соответствующую, например, нужному антителу или фрагменту антитела согласно изобретению.

Используемый здесь термин "экспрессионный вектор" означает ДНК-конструкцию, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, которая функционально связана с подходящей регуляторной последовательностью, способной осуществлять экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие регуляторные последовательности включают промотор (например, гетерологичный промотор) для осуществления транскрипции, необязательную последовательность оператора для регуляции такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания с рибосомной мРНК, и последовательности, которые регулируют терминацию транскрипции и трансляции. Любой из элементов экспрессионного вектора, который вносит вклад в транскрипцию представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты, может быть гетерологичным по отношению к вектору. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто потенциальную геномную вставку. После переноса подходящему хозяину, вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина или, в некоторых случаях, интегрироваться в его геном. В настоящем описании, "плазида", "экспрессионная плазида", "вирус" и "вектор" часто используются как синонимы.

Клонирующий вектор обычно представляет собой вектор, содержащий сайт клонирования, который может быть использован для включения последовательностей нуклеиновой кислоты в вектор. Клонированным вектором может быть, например, плазмидный вектор или вектор бактериофага.

Вектор для переноса может представлять собой вектор, подходящий для переноса молекул нуклеиновой кислоты в клетку или в организм, например, вирусные векторы. Вектор согласно изобретению может представлять собой, например, РНК-вектор или ДНК-вектор. Вектор может представлять собой молекулу ДНК. Так, например, вектор согласно изобретению включает сайт клонирования, маркер отбора, такой как фактор резистентности к антибиотику, и последовательность, подходящую для репликации вектора, такую как ориджин репликации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор согласно изобретению представляет собой плазмидный вектор. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения, вектор содержит лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.

Клетки.

В своем дополнительном аспекте, настоящее изобретение также относится к клетке (также называемой "клеткой-хозяином"), экспрессирующей антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению; или содержащей вектор или полинуклеотид согласно изобретению.

Примеры таких клеток включают, но не ограничиваются ими, эукариотические клетки, например клетки дрожжей, клетки животных, клетки насекомых, клетки растений и прокариотические клетки, включая *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки представляют собой клетки млекопитающих. В некоторых таких вариантах, клетки представляют собой клеточную линию млекопитающего, такую как клетки CHO (например, клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., PNAS 77: 4216 (1980), CHO-KSV), клетки почки эмбриона человека (например, клетки HEK293T), клетки PER.C6, клетки Y0, клетки Sp2/0, клетки NS0, клетки печени человека, например, клетки Нера RG, миеломные клетки или гибридомные клетки. Другие примеры клеточных линий млекопитающих-хозяев включают мышинные клетки Сертоли (например, клетки ТМ4); линию почек обезьян CV1, трансформированную SV40 (COS-7); клетки почек детеныша хомячка (BHK); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки почек обезьяны (CV1); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Нер G2); клетки почек собак (MDCK; клетки печени лабораторных крыс (BRL 3A); клетки опухоли мышинной молочной железы (ММТ 060562); клетки TRI; клетки MRC 5; и клетки FS4. Клеточные линии млекопитающих-хозяев, подходящие для получения антител, также включают клеточные линии, описанные, например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol 248 (B. K. C. LO, ed. Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, такую как *E. coli*. Экспрессия пептидов в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, хорошо известна (см. например, Pluckthun, *A Bio/Technology* 9:545-551). Так, например, антитела могут продуцироваться в бактериях, а особенно, если не требуются гликозилирование и эффекторная функция Fc. Описание экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях можно найти, например, в патентах США 5648237, 5789199 и 5840523.

Клетки насекомых, подходящие для экспрессии связывающего белка согласно изобретению, известны специалистам в данной области и включают, например, клетки *Spodoptera frugiperda* Sf9, клетки *Trichoplusia ni* BTI-Tn5B1-4, и клетки *Spodoptera frugiperda* SfSWT01 "Mimic™". См. например, Palmberg et al. *J. Biotechnol.* 753 (3-4): 160-166 (2011). Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые могут быть использованы в комбинации с клетками насекомых, а в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, также являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих белок, и включают грибы и дрожжевые штаммы с гуманизированными паттернами гликозилирования, которые обеспечивают продуцирование антитела с частично или полностью человеческим паттерном гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414; Li et al. *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006).

Растительные клетки могут быть также использованы в качестве хозяев для экспрессии связывающего белка согласно изобретению. Так, например, технология PLANTIBODIES™ (описанная, например, в патентах США 5959177; 6040498; 6420548; 7125978 и 6417429) предусматривает использование трансгенных растений для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибридный белок экспрессируется на клеточной поверхности иммунной клеткой, например Т-клеткой, NK-клеткой или NK-Т-клеткой или любыми их подтипами.

Любая система экспрессии белка в соответствии с раскрытием настоящего изобретения может быть использована для получения описанных здесь связывающих белков. Подходящие экспрессионные системы включают трансгенных животных, описанных в *Gene expression Systems*, Academic Press, eds. Fernandez et al. 1999

В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетка может быть трансфицирована вектором согласно изобретению с использованием экспрессионного вектора. Термин "трансфекция" относится к введению молекул нуклеиновой кислоты, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, такие как эукариотические клетки. В контексте настоящего описания, термин "трансфекция" охватывает любой метод, известный специалистам, для введения молекул нуклеиновой кислоты в клетки, такие как эукариотические клетки, включая клетки млекопитающих. Такие методы включают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основе катионных липидов и/или липосом, преципитацию фосфатом кальция, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вирусов или трансфекцию на основе катионных полимеров, таких как DEAE-декстран или полиэтиленмин и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения, введение является невирусным.

Кроме того, клетки согласно изобретению могут быть трансфицированы стабильно или временно с использованием вектора согласно изобретению, например, для экспрессии антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. В таких вариантах осуществления изобретения, клетки стабильно трансфецируют описанным здесь вектором, кодирующим связывающий белок. Альтернативно, клетки могут быть временно трансфецированы вектором согласно изобретению, кодирующим связывающий белок согласно изобретению. В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, полинуклеотид может быть гетерологичным по отношению к клетке-хозяину.

В своем родственном аспекте, настоящее изобретение относится к способам получения антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка, где указанные способы включают культивирование клетки-хозяина согласно изобретению в условиях и в течение периода времени, достаточных для получения антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка.

В соответствии с этим, настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам-хозяевам, которые гетерологично экспрессируют антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению. Так, например, клетка может принадлежать к виду, который отличается от вида, от которого было полностью или частично получено данное антитело (например, СНО-клетки, экспрессирующие человеческое антитело или сконструированное человеческое антитело). В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка-хозяева определенного типа не экспрессирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в природе. Кроме того, клетка-хозяин может сообщать посттрансляционную модификацию (PTM; например, гликозилирование или фукозилирование) антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которая не присутствует в природном антителе или в антигенсвязывающем фрагменте (или в природном родительском антителе, из которого были сконструированы или получены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент). Такая PTM может давать функциональное различие (например, снижать иммуногенность). Соответственно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, продуцируемый клеткой-хозяином, как описано в настоящей заявке, может включать одну или более посттрансляционных модификаций, которые отличаются от антитела (или родительского антитела) в его природном состоянии (например, человеческое антитело, продуцируемое клеткой СНО, может содержать еще одну посттрансляционную модификацию, которая отличается от антитела, выделенного у человека и/или продуцируемого нативной человеческой В-клеткой или клеткой плазмы).

Необязательные дополнительные признаки антител, антигенсвязывающих фрагментов или гибридных белков.

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки согласно изобретению могут быть связаны, например, с лекарственным средством для доставки на участок, подвергаемый лечению, или с детектируемой меткой для облегчения визуализации участка, содержащего представляющие интерес клетки. Способы связывания антител с лекарственными средствами и с детектируемыми метками хорошо известны специалистам как способы визуализации с использованием детектируемых меток. Меченные антитела могут быть использованы в анализах широкого ряда, в которых используются метки широкого ряда. Детектирование образования комплекса антитело-антиген между антителом (или антигенсвязывающим фрагментом или гибридным белком) согласно изобретению и представляющим интерес эпитопом на HBsAg, а в частности, в области антигенной петли HBsAg, может быть облегчено путем присоединения детектируемого вещества к антителу. Подходящие средства для детектирования включают использование меток, таких как радионуклиды, ферменты, коферменты, флуоресцентные вещества, хемилюминесцентные вещества, хромогены, субстраты ферментов или кофакторы, ингибиторы ферментов, комплексы простетических групп, свободные радикалы, частицы, красители и т.п. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин-флуоресцеин, данзилхлорид или фикоэритрин; примером люминесцентного вещества является люминол; примеры биолюминесцентных веществ включают люциферазу, люциферин и экворин; а примеры подходящего радиоактивного вещества включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H . Такие меченные реагенты могут быть использованы в различных хорошо известных анализах, таких как радиоиммуноанализы, ферментные иммуноанализы, например, ELISA, флуоресцентные иммуноанализы и т.п. Таким образом, меченные антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки согласно изобретению могут быть использованы в таких анализах, например, как описано в патентах США 37616162, 3791732, 3817837 и 4233402.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтической частью, такой как цитотоксин, терапевтический агент или ион радиоактивного металла или радиоизотоп. Примеры радиоизотопов включают, но не ограничиваются ими, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 и т.п. Такие конъюгаты антител могут быть использованы для модификации данного биологического ответа; при этом, лекарственный фрагмент не должен ограничиваться классическими химическими терапевтическими средствами. Так, например, лекарственный фрагмент может

представлять собой белок или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин.

Способы конъюгирования такого терапевтического фрагмента с антителами хорошо известны. См. например, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotherapy of Drugs In Cancer Therapy", In *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Ed Reisfeld Et Al (Alan R Liss, Inc.), pp. 243-256; Ed Hellstrom и Др. (1987) "antibodies for Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery*, Ed Robinson Et al. (2d Ed; Marcel Dekker, Inc.), pp 623-653; Thorpe (1985) "Antibody support Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" in *Monoclonal Antibodies "84: Biological and Clinical Applications*, ed Pinchera Et Al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985) "Analysis, Results And Future Prospective of the Therapeutic Use of radiosensitive Antibody in Cancer Therapy "in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, ed Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; и Thorpe et al (1982) *Immunol. Rev.* 62: 119-158.

Альтернативно, антитело, фрагмент антитела или гибридный белок могут быть конъюгированы со вторым антителом или его фрагментом (или вторым гибридным белком) с образованием гетероконъюгата, как описано в патенте США 4676980. Кроме того, между метками и антителами согласно изобретению могут присутствовать линкеры, например, как описано в патенте США 4831175. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки могут быть непосредственно помечены радиоактивным йодом, индием, иттрием или другими радиоактивными частицами, и известны специалистам, например, как описано в патенте США 5595721. Обработка может состоять из комбинированной обработки конъюгированными и неконъюгированными антителами, антигенсвязывающими фрагментами и/или гибридными белками, вводимыми одновременно или последовательно, например, как описано в WO 00/52031; WO 00/52473.

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки, описанные в настоящей заявке, могут быть присоединены к твердому носителю. Кроме того, антитела согласно изобретению, их функциональные фрагменты или гибридные белки могут быть химически модифицированы путем ковалентного конъюгирования с полимером, например, с увеличением их времени полужизни в кровотоке. Примеры полимеров и способов их присоединения к пептидам описаны в патентах США 4766106, 4179337, 4495285 и 4609546. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полимеры могут быть выбраны из полиоксиэтилированных полиолов и полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ растворяется в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R может представлять собой водород или защитную группу, такую как алкильная или алканольная группа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, защитная группа может иметь от 1 до 8 атомов углерода. Так, например, защитная группа может представлять собой метил. Символ n означает положительное целое число. В одном варианте осуществления изобретения, n составляет от 1 до 1000. В другом варианте осуществления изобретения, n составляет от 2 до 500. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ПЭГ имеет среднюю молекулярную массу, выбранную из молекулярной массы в пределах от 1000 до 40000, от 2000 до 20000 и от 3000 до 12000. Кроме того, ПЭГ может иметь по меньшей мере одну гидроксигруппу, например ПЭГ может иметь концевую гидроксигруппу. Так, например, она представляет собой концевую гидроксигруппу, которую активируют так, чтобы она взаимодействовала со свободной аминогруппой на ингибиторе. Однако, следует отметить, что для получения ковалентно связанного ПЭГ/антитела согласно изобретению, тип и количество реакционноспособных групп могут варьироваться.

Водорастворимые полиоксиэтилированные полиолы могут быть также использованы вместе с описанными здесь антителами и антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящей заявке. Они включают полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу, полиоксиэтилированный глицерин (POG) и т.п. В одном варианте осуществления изобретения используется POG. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что поскольку глицериновый остов полиоксиэтилированного глицерина представляет собой такой же остов, который встречается в природе, например, у животных и у человека, содержащих моно-, ди-, триглицериды, то такое ветвление не обязательно должно рассматриваться как чужеродный агент в организме. POG может иметь молекулярную массу в таких же пределах, как и ПЭГ. Другая система доставки лекарственного средства, которая может быть использована для увеличения времени полужизни в кровотоке, представляет собой липосому. Способы получения систем доставки липосом известны специалистам в данной области. Другие системы доставки лекарственных средств известны специалистам и описаны, например, Pozannsky et al. (1980) и Pozannsky (1984).

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки согласно изобретению могут быть представлены в очищенной форме. Обычно, антитело, связывающий фрагмент или гибридный белок присутствуют в композиции, которая по существу не содержит других полипептидов, где, например, менее, чем 90% (по массе), обычно менее, чем 60% и чаще всего менее, чем 50% композиции составляют другие полипептиды.

Антитела, гибридные белки или антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть иммуногенными у хозяев, не являющихся человеком (или гетерологичных), например, у мышей. В

частности, антитела, антигенсвязывающие фрагменты или гибридные белки могут иметь идиотоп, который является иммуногенным у хозяев, не являющихся человеком. В частности, такие молекулы согласно изобретению для их введения человеку включают молекулы, которые не могут быть легко выделены у хозяев, таких как мыши, козы, кролики, крысы, млекопитающие, не являющиеся приматами, и т.п. и не могут быть получены путем гуманизации или их выделения у ксено-мышей.

Получение антител, антигенсвязывающих фрагментов и гибридных белков.

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки согласно изобретению могут быть получены любым способом, известным специалистам. Так, например, общая методика получения моноклональных антител с применением гибридомной технологии хорошо известна специалистам (Kohler, G and Milstein, C. 1975; Kozar et al. 1983). В одном варианте осуществления изобретения, используется альтернативный способ иммортализации EBV, описанный в WO 2004/076677.

В одном варианте осуществления изобретения, антитела получают с применением способа, описанного в WO 2004/076677. В таких способах, В-клетки, продуцирующие антитело, трансформируют EBV и активатором поликлональных В-клеток. Дополнительные стимуляторы роста и дифференцировки клеток могут быть, но необязательно, добавлены на стадии трансформации для дополнительного повышения эффективности. Этими стимуляторами могут быть цитокины, такие как IL-2 и IL-15. В одном аспекте изобретения, IL-2 добавляют на стадии иммортализации для дополнительного повышения эффективности иммортализации, но его применение не имеет важного значения. Иммортализованные В-клетки, полученные с применением этих способов, могут быть затем культивированы с применением методов, известных специалистам в данной области, и с использованием выделенных антител.

Другой способ получения антител описан в WO 2010/046775. В этом способе, плазматические клетки культивируют в ограниченных количествах или в виде отдельных плазматических клеток в микролуночных культуральных планшетах. Антитела могут быть выделены из культур клеток плазмы. Кроме того, из культур клеток плазмы может быть экстрагирована РНК, и ПЦР может быть осуществлена с применением методов, известных специалистам. VH- и VL-области антител могут быть амплифицированы с помощью ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскриптазой), секвенированы и клонированы в экспрессионный вектор, который затем трансфицируют в клетки НЕК293Т или другие клетки-хозяева. Клонирование нуклеиновой кислоты в экспрессионных векторах, трансфекция клеток-хозяев, культивирование трансфицированных клеток-хозяев и выделение продуцируемого антитела могут быть осуществлены любыми способами, известными специалистам в данной области.

Антитела могут быть дополнительно очищены, если это необходимо, с применением методов фильтрации, центрифугирования и различных хроматографических методов, таких как ВЭЖХ или аффинная хроматография. Методы очистки антител, например, моноклональных антител, включая методы получения фармацевтически чистых антител, хорошо известны специалистам.

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих антитела, фрагменты антител или гибридные белки согласно изобретению, могут быть применены стандартные методы молекулярной биологии. Необходимые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично с применением методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости, могут быть применены методы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антитела или гибридного белка согласно изобретению или их фрагменты, может быть использована любая подходящая система клетка-хозяин/вектор. Бактериальные системы, например *E. coli*, и другие бактериальные системы могут быть использованы частично для экспрессии фрагментов антител, таких как фрагменты Fab и F(ab')₂, а особенно, фрагменты Fv и фрагменты одноцепочечных антител, например, одноцепочечных Fv. Эукариотические системы, например, системы экспрессии клеток-хозяев млекопитающих могут быть использованы для получения более крупных молекул антител, включая полноразмерные молекулы антител. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, репрезентативные клетки-хозяева и клеточные линии, описанные в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, антигенсвязывающего фрагмента или молекулы гибридного белка согласно изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту согласно изобретению, в условиях, подходящих для экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела согласно изобретению, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела или фрагмент антитела может содержать только полипептид тяжелой или легкой цепи, и в этом случае, для трансфекции клеток-хозяев необходимо использовать только последовательность, кодирующую полипептид тяжелой цепи или легкой цепи. Для получения продуктов, содержащих как тяжелую, так и легкую цепи, клеточная линия может быть трансфицирована двумя векторами, то есть, первым вектором, кодирующим полипептид легкой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, может быть использован один вектор, где указанный вектор включает последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Альтернативно, антитела, антигенсвязывающие фрагменты и гибридные белки согласно изобретению могут быть получены путем (i) экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты

согласно изобретению в клетке-хозяине, например, с использованием вектора согласно изобретению, и (ii) выделения экспрессированного желаемого продукта. Кроме того, способ может включать (iii) очистку выделенного антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка. Трансформированные В-клетки и культивируемые клетки плазмы могут быть скринированы на клетки, продуцирующие антитела, антигенсвязывающие фрагменты или гибридные белки с желаемой специфичностью или функцией.

Скрининг может быть проведен с помощью любого иммуноанализа, например ELISA, путем окрашивания тканей или клеток (включая трансфицированные клетки), с помощью анализа на нейтрализацию или одним из ряда других способов, известных специалистам, для идентификации желаемой специфичности или функции. Анализ может быть выбран на основе простого распознавания одного или более антигенов, или он может быть выбран исходя из желаемой функции, например, для отбора нейтрализующих антител, а не только антигенсвязывающих антител, для отбора антител, которые могут изменять свойства клеток-мишеней, такие как их сигнальные каскады, форма, скорость роста, способность влиять на другие клетки, ответ на влияние других клеток или других реагентов или на изменение условий, статуса дифференцировки или т.п.

Затем отдельные трансформированные В-клеточные клоны могут быть получены из позитивной трансформированной В-клеточной культуры. Стадия клонирования для выделения отдельных клонов из смеси положительных клеток может быть проведена с использованием лимитирующего разведения, микроманипуляции, осаждения одиночных клеток методом клеточного сортирования или другим способом, известным специалистам в данной области.

Нуклеиновая кислота культивируемых клеток плазмы может быть выделена, клонирована и экспрессирована в клетках НЕК293Т или в других известных клетках-хозяевах с применением способов, известных специалистам в данной области.

Иммортализованные В-клеточные клоны или трансфицированные клетки-хозяева, описанные в настоящей заявке, могут быть использованы в различных способах, например, в качестве источника моноклональных антител, источника нуклеиновой кислоты (ДНК или мРНК), кодирующей представляющее интерес моноклональное антитело, для исследований и т.п.

Фармацевтические композиции.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению, нуклеиновую кислоту согласно изобретению, вектор согласно изобретению и/или клетку согласно изобретению.

Фармацевтические композиции могут также содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или наполнитель. Хотя носитель или наполнитель может облегчать введение, он не должен сам индуцировать образование антител, опасных для индивидуума, которому вводят такую композицию. Он не должен быть токсичным. Подходящие носители могут представлять собой крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, аминокислоты, аминокислотные сополимеры и неактивные вирусные частицы. Вообще говоря, фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции согласно изобретению могут представлять собой активные компоненты или неактивные компоненты.

Могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты или рН-забуферивающие вещества. Такие носители позволяют приготавливать фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для приема пациентом.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть получены в различных формах. Так, например, композиции могут быть получены в виде инъеклируемых растворов, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий. Могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией (например, лиофилизованная композиция, аналогичная Synagis™ и Herceptin™, для разбавления стерильной водой, содержащей консервант). Композиция может быть приготовлена для местного применения, например, в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть приготовлена для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея, или в виде сиропа (необязательно ароматизированного). Композиция может быть приготовлена для введения в легкие, например, в виде ингалятора с использованием только дисперсного порошка или спрея. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория или пессариев. Композиция может быть приготовлена для интраназального, внутриушного или глазного введения, например, в виде капель. Композиция может быть приготовлена в виде набора, созданного таким образом, чтобы комбинированная композиция была разведена непосредственно перед введением индивидууму. Так, например, лиофилизованное антитело может быть получено в форме набора со

стерильной водой или стерильным буфером.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, активный ингредиент в композиции согласно изобретению представляет собой молекулу антитела, фрагмент антитела или их вариант или производное, а в частности, активный ингредиент в композиции представляет собой антитело, фрагмент антитела, гибридный белок или его варианты и производные, как описано в настоящей заявке. По существу, он может быть восприимчивым к разложению в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композицию вводят в желудочно-кишечный тракт, то композиция может содержать агенты, которые защищают антитело от разрушения, но которые высвобождают антитело после их абсорбции из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей приводится в руководстве Gennaro (2000) Remington: The Science And Practice Of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут иметь рН от 5,5 до 8,5, а в некоторых вариантах осуществления изобретения, от 6 до 8. В других вариантах осуществления изобретения, рН описанной здесь фармацевтической композиции может составлять приблизительно 7. рН можно поддерживать с помощью буфера. Композиция может быть стерильной и/или апиrogenной. Композиция может быть изотонической для человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции согласно изобретению поставляются в герметично закрытых контейнерах.

В объем настоящего изобретения входят композиции, присутствующие в нескольких формах для введения; и эти формы включают, но не ограничиваются ими, формы, подходящие для парентерального введения, например, путем инъекции или инфузии, например, инъекции ударной дозы или непрерывного вливания. Если продукт предназначен для инъекции или инфузии, то он может быть получен в форме суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном наполнителе, и он может содержать агенты для приготовления композиции, такие как суспендирующие агенты, консерванты, стабилизаторы и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, молекула антитела может быть получена в сухой форме для последующего разведения подходящей стерильной жидкостью перед ее использованием. Носитель обычно представляет собой вещество, подходящее для хранения, транспортировки и/или введения соединения, такого как фармацевтически активное соединение, а в частности, антитела согласно изобретению. Так, например, носитель может представлять собой физиологически приемлемую жидкость, пригодную для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтически активного соединения, а в частности, антител согласно изобретению. Композиции согласно изобретению, после их приготовления, могут быть введены индивидууму непосредственно. В одном варианте осуществления изобретения, композиции адаптируют для их введения млекопитающему, например человеку.

Описанные здесь фармацевтические композиции могут быть введены любыми способами, включая, но не ограничиваясь ими, перорально, внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интрамедуллярно, внутрибрюшинно, интратекально, интравентрикулярно, трансдермально, чрескожно, местно, подкожно, интраназально, энтерально, подязычно, интравагинально или ректально. Для введения фармацевтических композиций согласно изобретению могут быть также использованы гипоспри. В конкретных вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция может быть приготовлена для перорального введения, например, в виде таблеток, капсул и т.п., для местного введения или введения в виде инъекций, например, в виде жидких растворов или суспензий. Могут быть также использованы твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией, например, если фармацевтическая композиция находится в лиофилизованной форме.

Для инъекции, например внутривенной, кожной или подкожной инъекции, или инъекции в участок поражения, активный ингредиент может быть представлен в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апиrogenным и имеет подходящие рН, изотоничность и стабильность. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Независимо от того, вводят ли индивидууму полипептид, пептид или молекулу нуклеиновой кислоты, клетки или другое фармацевтически приемлемое соединение согласно изобретению, такое введение обычно осуществляют в "профилактически эффективном количестве" или в "терапевтически эффективном количестве" или в "эффективном количестве" (в данном случае это возможно), достаточном для достижения у индивидуума благоприятного эффекта (например, улучшения исхода лечения; уменьшения или ослабления симптомов, связанных с заболеванием; снижения числа случаев появления симптомов; повышения качества жизни; удлинения периода без заболевания; снижения тяжести заболевания, стабилизации заболевания; замедления прогрессирования заболевания; ремиссии; увеличения продолжительности жизни; или увеличения продолжительности жизни на статистически значимом уровне). Фактически вводимое количество, скорость и время введения зависят от природы и тяжести заболевания, подвергаемого лечению. В случае инъекции, фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть получена, например, в предварительно заполненном шприце.

Описанные здесь фармацевтические композиции могут быть также введены перорально в любой

перорально приемлемой лекарственной форме, включая, но не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения обычно используются такие носители, как лактоза и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют замасливатели, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсул, подходящими разбавителями являются лактоза и высушенный кукурузный крахмал. Если для перорального введения требуются водные суспензии, то активный ингредиент, то есть, молекулу-конъюгат, включающую агент для переноса и полезную нагрузку, как определено выше, объединяют с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При желании, могут быть также добавлены некоторые подсластители, ароматизаторы или красители.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть также введены местно, а особенно, если целью лечения являются участки или органы, легко доступные для местного применения, включая например, пораженную кожу или любые другие доступные эпителиальные ткани. Подходящие композиции для местного применения могут быть легко приготовлены для каждого из этих участков или органов. Для местного применения, фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде подходящей мази, содержащей фармацевтическую композицию согласно изобретению, а в частности, компоненты, которые были указаны выше, и которые были суспендированы или растворены в одном или более носителях. Носители для местного введения включают, но не ограничиваются ими, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, полиоксипропиленовое соединение, эмульгирующий воск и воду. Альтернативно, фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде подходящего лосьона или крема. В контексте настоящего описания, подходящие носители включают, но не ограничиваются ими, минеральное масло, моностеарат сорбитана, полисорбат 60, воск на основе цетиловых сложных эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

Дозы могут быть составлены по отношению к массе тела. Таким образом, доза, которая выражена как [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и т.п.), обычно означает [г, мг или другая единица] на кг (или г, мг и т.п.) массы тела, даже если слова "масса тела" не упоминаются конкретно.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, в одной дозе, например в суточной, еженедельной или ежемесячной дозе, количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтической композиции не превышает 1 г. В некоторых таких вариантах, разовая доза не превышает дозу, выбранную из 500 мг, 250 мг, 100 мг и 50 мг.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь композиция или набор дополнительно включают (i) ингибитор полимеразы, где ингибитор полимеразы включает, но необязательно, ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (ii) интерферон, где интерферон включает, но необязательно, IFN-бета и/или IFN-альфа; (iii) ингибитор контрольной точки, где ингибитор контрольной точки включает, но необязательно, анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; (iv) агонист стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки; или (v) любую комбинацию (i)-(iv). В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор включает описанную здесь композицию или комбинацию, и дополнительно включает инструкции по применению композиции для профилактики, лечения, ослабления и/или диагностики инфекции, вызываемой вирусом гепатита В и/или гепатита D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению (например, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, клетка-хозяин, нуклеиновая кислота, вектор или фармацевтическая композиция) используется в комбинации с ингибитором PD-1, например, PD-1-специфическим антителом или его связывающим фрагментом, таким как пидилизумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MEDI0680 (прежнее название AMP-514), AMP-224, BMS -936558 или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с PD-L1-специфическим антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом, такими как BMS-936559, дурвалумаб (MEDI4736), атезолизумаб (RG7446), авелумаб (MSB0010718C), MPDL3280A или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором LAG3, таким как LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016 или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция настоящего изобретения используется в комбинации с ингибитором CTLA4. В конкретных вариантах осуществления изобретения, композиция настоящего изобретения используется в комбинации с CTLA4-специфическим антителом или его связывающим фрагментом, таким как ипилимумаб, тремелиумаб, гибридные белки CTLA4-Ig (например, абатацепт, белатацепт) или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композицию согласно изобретению используют в комбинации с антителом, специфичным к В7-Н3, или его связывающим фрагментом, таким как эноблитузумаб (MGA271), 376.96, или то и другое. Связывающий фрагмент антитела против В7-Н3

может представлять собой scFv или гибридный белок, как описано, например, Dangaj et al., *Cancer Res.* 73: 4820, 2013, а также как описано в патенте США No. 9574000 и в публикациях патентных заявок PCT WO 2016/40724A1 и WO 2013/025779A1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором CD244.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором BLTA, HVEM, CD160 или с любой их комбинацией. Антитела против CD-160 описаны, например, в публикации PCT WO 2010/084158.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором TIM3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором Gal9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором передачи сигнала аденозина, таким как аденозиновый рецептор-ловушка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором A2aR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором KIR, таким как лирилумаб (BMS-986015).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором ингибирующего цитокина (обычно цитокина, не являющегося TGF β) или ингибитором продуцирования или активности Treg.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибиторомIDO, таким как лево-1-метилтриптофан, эпакадостат (INB024360; Liu et al. *Blood* 775: 3520-30, 2010), эбселен (Terentis et al. *Biochem.* 9: 591-600, 2010), индоксимод, NLG919 (Mautino et al. *American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013*), 1-метил-триптофан-(1-MT)-тира-пазамин, или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором аргиназы, таким как метиловый эфир N(омега)-нитро-l-аргинина (L-NAME), N-омега-гидрокси-нор-l-аргинин (нор-NOHA), L-NOHA, 2(S)-амино-6-бороногексановая кислота (ABH), S-(2-бороноэтил)-L-цистеин (BEC) или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором VISTA, таким как CA-170 (Curis, Lexington, Mass).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором TIGIT, таким как, например, COM902 (Compugen, Toronto, Ontario Canada), ингибитором CD155, таким как, например, COM701 (Compugen), или с тем и другим.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором PVRIG, PVRL2 или с тем и другим. Антитела против PVRIG описаны, например, в публикации PCT WO 2016/134333. Антитела против PVRL2 описаны, например, в публикации PCT WO 2017/021526.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором LAIR1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с ингибитором CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5 или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению используется в комбинации с агентом, который повышает активность (то есть, является агонистом) стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки. Так, например, композиция согласно изобретению может использоваться в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB) (таким как, например, урелумаб), агонистом CD134 (OX-40) (таким как, например, MEDI6469, MEDI6383 или MEDI0562), леналидомидом, помалидомидом, агонистом CD27 (таким как, например, CDX-1127), агонистом CD28 (таким как, например, TGN1412, CD80 или CD86), агонистом CD40 (таким как, например, CP-870893, rhuCD40L или SGN-40), агонистом CD122 (таким как, например, IL-2), агонистом GITR (таким как, например, гуманизованные моноклональные антитела, описанные в патентной публикации PCT WO 2016/054638), агонистом ICOS (CD278) (таким как, например, GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8 или любая их комбинация). В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения, способ может включать введение композиции согласно изобретению вместе с одним или более агонистами стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки, включая любые из указанных выше соединений, взятых отдельно или в любой комбинации.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению могут присутствовать либо в той же самой фармацевтической композиции, как и дополнительный активный компонент, либо антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению

могут быть включены в первую фармацевтическую композицию, а дополнительный активный компонент может быть включен во вторую фармацевтическую композицию, отличающуюся от первой фармацевтической композиции.

Применение.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способам применения антитела, антигенсвязывающего фрагмента, гибридного белка, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции или набора согласно изобретению в целях (i) профилактики, лечения или ослабления гепатита В и/или гепатита D; или (ii) диагностики гепатита В и/или гепатита D (например, у человека).

Способы диагностики (например, *in vitro*, *ex vivo*) могут включать контактирование антитела, фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) или гибридного белка с образцом. Такие образцы могут быть взяты у индивидуума, например, образец ткани может быть взят, например, из носовых ходов, полостей пазух, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, головного мозга, кожи или крови. Способы диагностики также могут включать обнаружение комплекса антиген/антитело или антиген/гибридный белок, в частности, после контактирования антитела, фрагмента антитела или гибридного белка с образцом. Такую стадию детектирования обычно проводят на стенде, то есть, без какого-либо контакта с телом человека или животного. Примеры способов детектирования хорошо известны специалисту в данной области и включают, например, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Настоящее изобретение также относится к применению (i) антитела, фрагмента антитела, гибридного белка или его вариантов и производных согласно изобретению, (ii) клетки-хозяина (которая может представлять собой иммортализованную В-клетку) согласно изобретению, (iii) нуклеиновой кислоты или вектора согласно изобретению или (iv) фармацевтической композиции согласно изобретению в целях (a) приготовления лекарственного средства для профилактики, лечения или ослабления гепатита В и/или гепатита D или в целях (b) диагностики гепатита В и/или гепатита D.

Настоящее изобретение также относится к антителу, антигенсвязывающему фрагменту или гибриднему белку согласно изобретению, к нуклеиновой кислоте согласно изобретению, вектору согласно изобретению, к клетке согласно изобретению или к фармацевтической композиции согласно изобретению для их применения в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения гепатита В и/или гепатита D. Настоящее изобретение также относится к применению антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для лечения индивидуума и/или диагностики заболевания у индивидуума. Настоящее изобретение также относится к способу лечения индивидуума (например, человека), включающему введение индивидууму эффективного количества композиции, описанной в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом может быть человек. Один из способов оценки эффективности терапевтического лечения включает мониторинг симптомов заболевания после введения композиции. Лечение может быть осуществлено по схеме введения однократных доз или дробных доз.

В одном варианте осуществления изобретения, индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, вводят антитело, фрагмент антитела, гибридный белок, клетку-хозяина (например, иммортализованный клон В-клеток, или Т-клетку, НК-Т-клетку или НК-клетку, которая экспрессирует гибридный белок), или фармацевтическую композицию согласно изобретению. Таким индивидуумом является, но не ограничивается им, индивидуум, у которого имеется высокий риск развития гепатита В и/или гепатита D, или который является восприимчивым к этим заболеваниям.

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты, гибридные белки, полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, фармацевтические композиции и их комбинации согласно изобретению также могут быть использованы в наборе для профилактики, лечения, ослабления и/или диагностики гепатита В и/или гепатита D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор дополнительно включает инструкции по применению компонента для профилактики, лечения, ослабления и/или диагностики инфекции, вызываемой вирусом гепатита В и/или гепатита D. Кроме того, эпитоп в области антигенной петли HBsAg, который способен связываться с описанными здесь антителом, антигенсвязывающим фрагментом или гибридным белком согласно изобретению, может быть использован в наборе для мониторинга эффективности применения посредством детектирования присутствия защитных антител против HBV или определения их титра.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция или набор согласно изобретению дополнительно включает: (i) ингибитор полимеразы, где ингибитор полимеразы включает, но необязательно, ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (ii) интерферон, где интерферон включает, но необязательно, IFN-бета и/или IFN-альфа; (iii) ингибитор контрольной точки, где ингибитор контрольной точки включает, но необязательно, анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; (iv) агонист стимулирующей

молекулы иммунной контрольной точки; или (v) любую комбинацию (viii)-(xii).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению, нуклеиновая кислота согласно изобретению, вектор согласно изобретению, клетка согласно изобретению или фармацевтическая композиция согласно изобретению используются для лечения или ослабления хронического гепатита В.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению (i) нейтрализуют HBV-инфекцию, (ii) связываются с L-HBsAg (с крупным оболочечным белком HBV, который присутствует в инфекционных частицах HBV), и тем самым предотвращают распространение HBV, (iii) связываются с S-HBsAg, и тем самым стимулируют клиренс субвирусных частиц (SVP) и/или (iv) могут индуцировать сероконверсию, то есть, активный иммунный ответ на вирус.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению, нуклеиновая кислота согласно изобретению, вектор согласно изобретению, клетка согласно изобретению или фармацевтическая композиция согласно изобретению могут быть использованы для профилактики инфицирования (повторного инфицирования) вирусом гепатита В после трансплантации печени, в частности, для лечения печеночной недостаточности, вызванной гепатитом В.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению, нуклеиновая кислота согласно изобретению, вектор согласно изобретению, клетка согласно изобретению или фармацевтическая композиция согласно изобретению могут быть использованы для предупреждения/профилактики гепатита В у неиммунизованных индивидуумов. Это происходит, например, в случае (предположительно) случайного воздействия HBV (после принятия профилактических мер). Термин "неиммунизованные индивидуумы" включает индивидуумов, которые никогда не вакцинировались, и которые, таким образом, не были иммунизованы, и индивидуумы, у которых не вырабатывался иммунный ответ (например, не вырабатывались антитела против гепатита В на нужном уровне) после вакцинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению, нуклеиновая кислота согласно изобретению, вектор согласно изобретению, клетка согласно изобретению или фармацевтическая композиция согласно изобретению используются для профилактики гепатита В у пациентов с гемодиализом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или гибридный белок согласно изобретению, нуклеиновая кислота согласно изобретению, вектор согласно изобретению, клетка согласно изобретению или фармацевтическая композиция согласно изобретению используются для профилактики гепатита В у новорожденных. В таких вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, нуклеиновая кислота согласно изобретению, вектор согласно изобретению, клетка согласно изобретению или фармацевтическая композиция согласно изобретению могут быть введены при рождении или как можно быстрее после рождения. Введение можно повторять до сероконверсии после вакцинации.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к применению антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка согласно изобретению, нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, клетки согласно изобретению или фармацевтической композиции согласно изобретению в диагностике (например, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) гепатита В и/или гепатита D.

Кроме того, применение антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка согласно изобретению, нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, клетки согласно изобретению или фармацевтической композиции согласно изобретению для определения наличия в выделенной пробе крови вируса гепатита В и/или вируса гепатита дельта, входит в объем настоящего изобретения.

Как описано выше, способы диагностики могут включать контактирование антитела, фрагмента антитела или гибридного белка с образцом. Такие образцы могут быть взяты у индивидуума, например, образец ткани может быть взят, например, из носовых ходов, полостей пазух, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, головного мозга, кожи или крови. Способы диагностики могут также включать обнаружение комплекса антиген/антитело в частности, после контактирования антитела или его фрагмента с образцом. Такую стадию детектирования обычно проводят на стенде, то есть, без какого-либо контакта с телом человека или животного. Примеры способов детектирования хорошо известны специалисту в данной области и включают, например, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Настоящее изобретение также относится к способу лечения, профилактики и/или ослабления гепатита В и/или гепатита D у индивидуума, где указанный способ включает введение индивидууму антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка согласно изобретению, нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, клетки согласно изобретению или

фармацевтической композиции согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает введение индивидууму одного или более из: (vii) ингибитора полимеразы, где ингибитор полимеразы включает, но необязательно, ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (viii) интерферона, где интерферон включает, но необязательно, IFN-бета и/или IFN-альфа; (ix) ингибитора контрольной точки, где ингибитор контрольной точки включает, но необязательно, анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; (x) агониста стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки; или (xi) любой комбинации (vii)-(x).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, инфицирование вирусом гепатита В представляет собой хронический гепатит В. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациенту была проведена трансплантация печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум не был иммунизован против гепатита В. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является новорожденный. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум проходит гемодиализ или был подвергнут гемодиализу.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения индивидуума, которому была проведена трансплантация печени, где указанный способ включает введение индивидууму, которому была проведена трансплантация печени, эффективного количества антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка согласно изобретению, нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, клетки согласно изобретению или фармацевтической композиции согласно изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способам обнаружения присутствия или отсутствия эпитопа в правильной конформации в вакцине против гепатита В и/или против гепатита D, где указанные способы включают: (i) контактирование вакцины с антителом, антигенсвязывающим фрагментом или гибридным белком согласно изобретению; и (ii) определение того, был ли образован комплекс, содержащий антиген и антитело, или содержащий антиген и антигенсвязывающий фрагмент, или содержащий антиген и гибридный белок.

Используемый здесь термин "вакцина" обычно означает профилактический или терапевтический материал, содержащий по меньшей мере один антиген, такой как иммуноген. Антиген или иммуноген могут происходить от любого вещества, подходящего для вакцинации. Так, например, антиген или иммуноген могут происходить от патогена, такого как частицы бактерий, вирусные частицы, опухоль (включая солидную или жидкую опухоль) или другую раковую ткань. Антиген или иммуноген стимулирует адаптивную иммунную систему организма на выработку адаптивного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, "антиген" или "иммуноген" означают вещество, которое может распознаваться иммунной системой, например, адаптивной иммунной системой, и которое способно инициировать антиген-специфический иммунный ответ, например, посредством образования антител и/или антиген-специфических Т-клеток как часть адаптивного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антиген может представлять собой или может содержать пептид или белок, который может презентировать Т-клеткам комплекс МНС (например, МНС класса I; МНС класса II). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антиген содержит антиген HBV и/или HBД, например, антиген HBsAg.

В некоторых случаях, представленные здесь элементы антител, фрагментов антител, гибридных белков, нуклеиновых кислот, клеток, композиций, применений и способов описаны или перечислены со ссылкой на варианты осуществления изобретения, или примеры. Однако, следует отметить, что описанные здесь примеры и варианты осуществления изобретения могут быть объединены различными способами для создания дополнительных вариантов осуществления изобретения.

Примеры

Ниже представлены конкретные примеры, иллюстрирующие различные варианты осуществления изобретения, и аспекты настоящего изобретения. Однако, настоящее раскрытие не должно ограничиваться каким-либо конкретным вариантом его осуществления, описанным в настоящей заявке.

Пример 1. Получение и тестирование сконструированных антител.

Анализ некоторых вариантов антитела HBC34, описанных в публикации PCT WO 2017/060504, выявил аминокислоту цистеин в положении 40 (в соответствии с нумерацией IMGT) в вариабельной области легкой цепи, который является неспаренным и представляет потенциальную опасность. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что неспаренные цистеиновые остатки являются потенциально реакционноспособными и могут инициировать агрегацию посредством внутримолекулярного скремблирования или образования межмолекулярных дисульфидных связей. Были сконструированы варианты HBC34-V7 (WO 2017/060504), в которых аминокислота цистеин в положении 40 вариабельной области легкой цепи была заменена серином (с образованием "HBC34-V34") или аланином (с образованием "HBC34-V35"). Нуклеотидные последовательности, кодирующие эти дополнительные варианты антител, были оптимизированы по кодонам, и антитела экспрессировались в виде IgG1 (g1m17, 1 аллотип) в клетках ExpiCHO™ (ThermoFisher). Нуклеотидные последовательности,

оптимизированные по кодонам и кодирующие домены VH и VL HBC34-V35, представлены в SEQ ID NO: 103 и 104, соответственно.

Способность HBC34-V34 и HBC34-V35 связываться с антигеном исследовали посредством прямого ELISA на связывание с антигеном. В качестве сравнительного агента использовали HBC34-V7. Как показано на фиг. 1, HBC34-V34 и HBC34-V35 эффективно связываются с двумя рекомбинантными антигенами HBsAg ("adw", верхняя панель; "adr", нижняя панель), а HBC34-V35 связывается на уровне, очень похожем на связывание родительского HBC34-V7.

Варианты антител исследовали на связывание со всеми известными генотипами HBsAg ((A)-(J)). Вкратце, эпителиальные клетки человека (клетки Hep2) трансфецировали плазмидами, экспрессирующими HBsAg каждого из 10 генотипов HBV A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. Все антитела тестировали при множественных концентрациях на окрашивание временно трансфецированных пермеабилizованных клеток. Через два дня после трансфекции, клетки Hep2 собирали, фиксировали и делали проницаемыми с использованием сапонина для иммуноокрашивания с помощью HBC34 и пяти выбранных вариантов. В качестве сравнительного агента использовали HBC34-V7. Связывание антител с трансфецированными клетками анализировали с использованием Becton Dickinson FACSCanto2™ (BD Biosciences) с программным обеспечением FlowJo (TreeStar). Как показано на фиг. 2A-2J, HBC34-V34 и HBC34-V35 распознавали все 10 генотипов HBV HBsAg. HBC34-V35 показало несколько более сильное окрашивание, чем HBC34-V34.

Эти данные показали, что варианты антител HBC34-V34 и HBC34-V35 распознают HBsAG широкого ряда и связываются с ними на уровнях, сравнимых с HBC34-V7.

Пример 2. Антитела против HBsAg с модифицированными Fc-областями эффективно связываются с антигеном.

Модификации в Fc-области могут обеспечивать преимущества для терапевтического антитела. HBC34-V35 экспрессировали как IgG1 с Fc дикого типа или с Fc, содержащим мутацию "MLNS" (M428L/N434S), или с Fc, содержащим MLNS в комбинации с мутацией "GAALIE" (G239A/A330L/I332E). Каждую конструкцию тестировали на связывание с рекомбинантным HBsAg (adw) в двух отдельных ELISA-экспериментах на связывание с антигеном. Было протестировано три (3) партии HBC34-v35 (Fc дикого типа). Было протестировано две (2) партии HBC34-v35-MLNS и две (2) партии HBC34-V35-MLNS-GAALIE. HBC34v7 (одна партия) была протестирована для сравнения.

Как показано на фиг. 3A и 3B, введенные Fc-мутации не влияли на антигенсвязывающую активность HBC34-V35. Значения EC_{50} несколько изменялись для различных конструкций и двух экспериментов и были обычно низкими.

Было оценено связывание HBC34-V35, имеющего мутации MLNS или MLNS и GAALIE, с клетками EXP1293, экспрессирующими генотипы HBsAg (A)-(J), или варианты HBsAg. Для сравнения использовали HBC34-V35 с Fc IgG1 дикого типа. Данные, показывающие связывание с генотипами HBsAg, представлены на фиг. 3C-3H. Данные, показывающие связывание с вариантами HBsAg, представлены на фиг. 3I-3R.

Пример 3. Нейтрализующая активность антител *in vitro*.

Нейтрализующую способность HBC34, HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE сравнивали путем определения уровней HBsAg (A) и HBeAg (B) в супернатанте культуры HBV-инфицированных клеток HepG2, экспрессирующих NTCP. Данные показаны на фиг. 3S-3V и представляют средние значения \pm ср. кв. ош. для одного из двух независимых экспериментов.

Пример 4. Способность HBC34-V35 MLNS-GAALIE к нейтрализации всех генотипов, оцениваемая в псевдосистеме HDV.

Для подтверждения охвата нейтрализации HBC34-V35-MLNS-GAALIE против вируса HBV проводили анализы на нейтрализацию с использованием HBC34-V35-MLNS-GAALIE против восьми преобладающих генотипов HBV человека. Была использована система *in vitro*, где вирус гепатита D (HDV) был сконструирован для экспрессии HBsAg HBV, представляющего различные генотипы. Вкратце, поскольку HBV и HDV имеют одни и те же оболочечные белки, то пути проникновения вируса посредством гепарансульфата протеогликана и NTCP являются идентичными, и HDV может быть использован в качестве системы-модели для исследования HBsAg-опосредуемого проникновения вируса (Tu 2018; Lempp 2016). Кроме того, HDV может иметь оболочку/может быть псевдотипирован HBsAg различных генотипов HBV и впоследствии может быть использован в исследованиях на инфицирование (Freitas 2014).

HBC34-V35-MLNS-GAALIE показало нейтрализующую способность для всех тестируемых генотипов с аналогичными значениями EC_{50} в интервале от 0,92 нг/мл (генотип C) до 2,34 нг/мл (генотип A). Эти результаты показали, что HBC34-V35-MLNS-GAALIE способен нейтрализовать инфекционный вирус, несущий HBsAg всех восьми протестированных генотипов HBV, и тем самым поддерживать *in vivo* нейтрализующую активность HBC34-V35-MLNS-GAALIE для всех генотипов (фиг. 4).

Пример 5. Клиренс антигенов HB и ингибирование проникновения вируса у модели *in vivo*.

Для оценки эффективности анти-HBV антител согласно изобретению в отношении клиренса HBsAg были использованы иммунодефицитные мыши, имеющие трансплантированные человеческие

гепатоциты. Вкратце, первичные человеческие гепатоциты трансплантировали мышам SCID, у которых мышинные гепатоциты были предварительно расщеплены ферментативно. Мыши не имели Т- и В-клеток. Эта модель является подходящей для исследования HBV-инфекции, включая проникновение, распространение, регуляцию сссДНК, иммунные ответы собственных гепатоцитов и интеграцию вируса в геном хозяина.

Мышей инокулировали путем инъекции в хвостовую вену HBV генотипа С и при $1,0 \times 10^7$ вирусных геномов на мышь на день -28. Обработку на день 0 проводили после первой оценки HBV. Мышам, инфицированным HBV (n=4 на группу обработки), вводили PBS (контроль) или HBC34-V35 (1, 5 или 15 мг/кг внутривенно, 2×/неделю). Антитела были муринизированы за исключением антигенсвязывающих Fab-областей.

Пробы плазмы и сыворотки периодически собирали в течение всего исследования, и оценивали вирусную нагрузку, ДНК HBV (с помощью ПЦР) и HBAg (HBsAg, HBeAg, HBcAg). Мышей умерщвляли на неделю 6.

Как показано на фиг. 5-8, обработка самой высокой тестируемой дозой HBC34-V35 приводила к снижению вирусной нагрузки и проникновения вируса в гепатоциты.

Пример 6. Исследование эффекторных функций *in vitro*.

Исследования *in vitro* проводили для оценки способности антител HBC34 с модифицированным Fc: (1) связываться с человеческими FcR и с комплементом; (2) активировать FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa; и (3) стимулировать ADCC и активировать человеческие природные клетки-киллеры (NK). Используемые тестируемые изделия, клеточные линии и реагенты описаны ниже в Таблицах 5-7. В этом примере использовали следующие сокращения: GLP=Международная лабораторная практика; ADCC=антитело-зависимая клеточная цитотоксичность; ADCP=антитело-зависимый клеточный фагоцитоз; Fc=кристаллизующийся фрагмент; HBsAg=поверхностный антиген гепатита В; mAb=моноклональное антитело; PBS=забуференный фосфатом физиологический раствор; UHPL-SEC=очень высокоэффективная жидкостная хроматография и эксклюзионная хроматография; ATCC=Американская Коллекция Типовых Культур; FcγR=Fc-гамма-рецептор(ы); клетки CHO=клетки яичника китайского хомячка; RLU=относительные единицы люминесценции; BLI=биослойная интерферометрия.

Таблица 5

Тестируемые препараты

Тестируемый препарат	HBC34-V35-MLNS
Изотип	IgG1λ
Относительная молекулярная масса	≈150 кДа
Концентрация	3,47 мг/мл
Источник	Лабораторный
Условия транспортировки и хранения	Короткий период хранения при 4°C, и длинный период хранения при -80°C
Буфер для получения композиции	PBS, pH 7,2
Тестируемый препарат	HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Изотип	IgG1λ
Относительная молекулярная масса	≈150 кДа
Концентрация	2,1 мг/мл/0,86 мг/мл
Источник	Лабораторный
Условия транспортировки и хранения	Короткий период хранения при 4°C, и длинный период хранения при -80°C
Буфер для получения композиции	PBS, pH 7,2
Тестируемый препарат	HBC34-V35-LALA
Изотип	IgG1λ
Относительная молекулярная масса	≈150 кДа
Концентрация	1,2 мг/мл
Источник	Лабораторный
Условия транспортировки и хранения	Короткий период хранения при 4°C, и длинный период хранения при -80°C
Буфер для получения композиции	PBS, pH 7,2
Тестируемый препарат	mAb 17.1.41
Изотип	IgG1κ
Относительная молекулярная масса	≈150 кДа
Концентрация	4,4 мг/мл
Источник	Лабораторный
Условия транспортировки и хранения	Короткий период хранения при 4°C, и длинный период хранения при -80°C

Буфер для получения композиции	PBS, pH 7,2
Таблица 6	
Клеточные линии	
Клеточная линия	PLC/PRF/5
Номер по каталогу	#4325-FC-050
Концентрация	100 мкг/мл
Источник	R&D Systems, мышинная миеломная клеточная линия, происходящая от NS0 с С-концевой меткой 6-His
Стабильность	Стабильная при температуре от -20°C до 80°C
Условия транспортировки и хранения	Хранение при -80°C до использования, 1 месяц, 2-8°C в стерильных условиях после разведения
Буфер для получения композиции	PBS
Клеточная линия	Jurkat-FcγRIIIA (F158)
Происхождение ткани	Иммortalизованная линия человеческих Т-лимфоцитов; клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIA, вариант F158 (низкоаффинный), и элемент ответа NFAT, инициирующий экспрессию люциферазы светляка, в качестве эффекторных клеток
Источник	Promega (Номер по каталогу: G9798)
Аналитическая среда	RPMI1640 с добавлением 4% сыворотки с низким содержанием IgG
Клеточная линия	Jurkat-FcγRIIIA (V158)
Источник ткани	Иммortalизованная линия человеческих Т-лимфоцитов; клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIA, вариант V158 (высокоаффинный), и элемент ответа NFAT, инициирующий экспрессию люциферазы светляка, в качестве эффекторных клеток
Источник	Promega (Номер по каталогу: G7018)
Аналитическая среда	RPMI1640 с добавлением 4% сыворотки с низким содержанием IgG
Клеточная линия	Jurkat-FcγRIIIA (H131)
Источник ткани	Иммortalизованная линия человеческих Т-лимфоцитов; клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIA, вариант H131 (высокоаффинный), и элемент ответа NFAT, инициирующий экспрессию люциферазы светляка, в качестве эффекторных клеток
Источник	Promega (Номер по каталогу: G9995)
Аналитическая среда	RPMI1640 с добавлением 4% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG
Клеточная линия	Jurkat-FcγRIIb
Источник ткани	Иммortalизованная линия человеческих Т-лимфоцитов; клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIb, и элемент ответа NFAT, инициирующий экспрессию люциферазы светляка, в качестве эффекторных клеток
Источник	Promega (Номер по каталогу: CS1781E02)
Аналитическая среда	RPMI1640 с добавлением 4% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG
Клеточная линия	Свежевыделенные человеческие НК-клетки
Источник ткани	Цельная кровь (EDTA), взятая у донора НМ_WB019 (генотипированная по FcγRIIIa F/V), и очищенная с использованием набора для выделения НК-клеток MACSxpress® от Miltenyi Biotec (#130-098-185)
Источник	Лабораторный

Аналитическая среда	AIM-V
Среда для культивирования	RPMI1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG, Glutamax
Условия культивирования	37°C, 5% CO ₂
Клеточная линия	Свежевыделенные человеческие NK-клетки
Источник ткани	Цельная кровь (EDTA), взятая у донора HM_WB002 (генотипированная по FcγRIIIa V/V), и очищенная с использованием набора для выделения NK-клеток MACSxpress® от Miltenyi Biotec (#130-098-185)
Источник	Лабораторный
Аналитическая среда	AIM-V
Среда для культивирования	RPMI1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG, Glutamax
Условия культивирования	37°C, 5% CO ₂
Клеточная линия	Свежевыделенные человеческие NK-клетки
Источник ткани	Цельная кровь (EDTA), взятая у донора HM_WB018 (генотипированная по FcγRIIIa F/F), и очищенная с использованием набора для выделения NK-клеток MACSxpress® от Miltenyi Biotec (#130-098-185)
Источник	Лабораторный
Аналитическая среда	AIM-V
Среда для культивирования	RPMI1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG, Glutamax
Условия культивирования	37°C, 5% CO ₂

Таблица 7

Другие реагенты

Реагент	Рекомбинантный человеческий FcγRIIIa (V158)
Номер по каталогу	#4325-FC-050
Концентрация	100 мкг/мл
Источник	R&D Systems, мышинная миеломная клеточная линия, происходящая от NS0 с С-концевой меткой 6-His
Стабильность	Стабильная при температуре от -20°C до 80°C
Условия транспортировки и хранения	Хранение при -80°C до использования, 1 месяц, 2-8°C в стерильных условиях после разведения
Буфер для получения композиции	PBS
Реагент	Рекомбинантный человеческий FcγRIIIa (F158)
Номер по каталогу	10389-H08H
Концентрация	200 мкг/мл (при разведении)
Источник	Sino Biological, происходящий от HEK293 с С-концевой меткой 6-His
Стабильность	Стабильный при температуре от -20 до 80°C
Условия транспортировки и хранения	Хранение при -80°C до применения
Буфер для получения композиции	PBS
Реагент	Рекомбинантный человеческий FcγRIIIa (H131)
Номер по каталогу	10374-H08C1
Концентрация	200 мкг/мл (при разведении)
Источник	Sino Biological, происходящий от CHO с С-концевой меткой 6-His
Стабильность	Стабильный при температуре от -20 до 80°C
Условия транспортировки и хранения	Хранение при -80°C до применения
Буфер для получения композиции	PBS
Реагент	Рекомбинантный человеческий FcγRIIIa (H131)
Номер по каталогу	10374-H08B
Концентрация	200 мкг/мл (при разведении)
Источник	Sino Biological, происходящий от клеток насекомых с С-концевой меткой 6-His
Стабильность	Стабильный при температуре от -20 до 80°C

Условия транспортировки и хранения	Хранение при -80°C до применения
Буфер для получения композиции	PBS
Реагент	Рекомбинантный человеческий FcγRIIb
Номер по каталогу	10259-H08C
Концентрация	200 мкг/мл (при разведении)
Источник	Sino Biological, происходящий от CHO с C-концевой меткой 6-His
Стабильность	Стабильный при температуре от -20 до 80°C
Условия транспортировки и хранения	Хранение при -80°C до применения
Реагент	Компонент человеческого комплемента C1q
Номер по каталогу	204873
Концентрация	1,17 мг/мл
Источник	Sigma-Aldrich, выделенный из человеческой сыворотки
Стабильность	Стабильный при -80°C
Условия транспортировки и хранения	Хранение при -80°C до применения
Буфер для получения композиции	10 mM HEPES с 0,3 M NaCl, pH 7,2
Реагент	Источник
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland
Среда AIM-V	Gibco
Среда Хэмса F-12K	Gibco
Набор для выделения NK MACSxpress®	Miltenyi Biotec GmbH, Germany
Набор для детектирования цитотоксичности (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Switzerland
96-луночные круглодонные планшеты	Corning
Белый плоскодонный 96-луночный планшет	PerkinElmer
384-луночные круглодонные планшеты	Corning
384-луночные плоскодонные планшеты	Corning
Спектрофотометр	Bio-Tek
Среда RPMI	Gibco
DMEM с высоким содержанием глюкозы и стабильным глутамином	Bioconcept
FBS	GE Healthcare
Glutamax	Gibco
Трипсин-EDTA (0,05%), феноловый красный	Gibco
Программа Prism7 Graph	Pad Software, Inc., La Jolla, CA
Тригон X-100	Sigma
Буфер для анализа на ADCC	Promega
Люциферазный реагент для анализа Bio-Glo-TM	Promega
Биоанализ на ADCC	Promega
Промывочный буфер	PBS, 1% FBS
Раствор формальдегида, конц. 37%	Sigma (No. по каталогу: F1635-500ML)
Сапонин	Sigma (No. по каталогу: S7900-100G)
Буфер для сообщения проницаемости	0,5% сапонин, PBS, 1% FBS
Второе Ab Alexa Fluor® 647	F(ab') ₂ -фрагмент козьего антитела против человеческих IgG, специфичного к фрагменту Fcγ AffiniPure (Jackson ImmunoResearch, No. по каталогу: 109-606-098)
ФЭ-конъюгированное второе Ab против CD107	ФЭ-конъюгированное анти-CD107 антитело (BioLegend, No. по каталогу: 328608, Клон H4A3 против мышиного IgG1, каппа)

Экспериментальные методы.

Оценка связывания с человеческими Fc-рецепторами.

Связывание HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с человеческими FcγR оценивали на приборе Octet® (BLI, биослойная интерферометрия; ForteBio). Вкратце, His-меченные человеческие FcγR (аллель FcγRIIa H131, аллель FcγRIIa R131, аллель FcγRIIaA F158, аллель FcγRIIa V158 и FcγRIIb) в концентрации 2 мкг/мл захватывали на датчиках с антителом против пента-His в течение 6 минут. Затем, в течение 4 мин, FcγR-нагруженные датчики обрабатывали раствором кинетического буфера (pH 7,1), содержащего 2 мкг/мл каждого mAb в присутствии 1 мкг/мл F(ab')₂-фрагмента козьего антитела против

человеческих IgG, специфичного к фрагменту F(ab')₂ AffiniPure (для перекрестного связывания человеческих mAb посредством Fab-фрагмента) с последующим проведением стадии диссоциации в том же буфере в течение еще 4 мин (правая часть графика). Профили ассоциации и диссоциации оценивали в реальном времени по изменению картины интерференции с использованием прибора Octet® RED96 (ForteBio). Связывание HBC34-V35-MLNS-GAALIE, HBC34-V35-MLNS или HBC34-V35 в растворе с иммобилизованным человеческим FcRn оценивали на приборе Octet® в реальном времени при pH=6,0 или pH=7,4.

Оценка связывания с белком человеческого компонента Clq.

Связывание HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с человеческим компонентом оценивали на приборе Octet® (BLI, биослойная интерферометрия; ForteBio). Вкратце, датчики с антителом против человеческого Fab (CH1-специфическим) использовали для захвата, посредством Fab-фрагмента, полноразмерного IgG1 HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE mAb при 10 мкг/мл в течение 10 мин. Затем IgG-нагруженные датчики обрабатывали в течение 4 мин раствором кинетического буфера (pH 7,1), содержащего 3 мкг/мл очищенного человеческого Clq (левая часть графика) с последующим проведением стадии диссоциации в том же буфере в течение еще 4 мин (правая часть графика). Профили ассоциации и диссоциации оценивали в реальном времени по изменению картины интерференции с использованием прибора Octet® RED96 (ForteBio).

Получение человеческих NK-клеток из цельной крови.

NK-клетки были выделены в свежем виде из цельной EDTA-крови с использованием набора для выделения NK-клеток MACSxpress®, в соответствии с инструкциям производителя. Вкратце, антикоагулированную кровь смешивали в 50 мл-пробирке с 15 мл коктейля для выделения NK и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре с использованием ротора приблизительно при 12 раундах в минуту. Затем пробирку помещали в магнитное поле сепаратора MACSxpress® на 15 мин. Магнитно-меченные клетки прилипали к стенке пробирки, в то время как агрегированные эритроциты оседали на дно. Затем клетки-мишени NK собирали из супернатанта, тогда как пробирка все еще находилась внутри сепаратора MACSxpress®. NK-клетки центрифугировали, обрабатывали дистиллированной водой для удаления остаточных эритроцитов, снова центрифугировали и окончательно ресуспендировали в среде AIM-V.

Определение антитело-зависимой гибели NK-клеток.

mAb подвергали 10-кратному серийному разведению в среде AIM-V от 100 мкг/мл до 0,001 мкг/мл. Клетки-мишени (PLC/PRF/5; MacNab, et al. British Journal of Cancer, 34 (5), 1976) добавляли в круглодонный 384-луночный планшет при плотности $7,5 \times 10^3$ клеток/лунку в 23 мкл, а затем серийно разведенные антитела добавляли в каждую лунку (23 мкл на лунку), и смесь антитело/клетка инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. После инкубирования, человеческие NK-клетки добавляли при плотности клеток $7,5 \times 10^4$ клеток/лунку в 23 мкл, и получали отношение эффектор/мишень=10:1. Также были включены контрольные лунки, которые использовали для определения максимального лизиса (и эти лунки содержали клетки-мишени с 23 мкл 3% тритона X-100) и спонтанного лизиса (и эти лунки содержали клетки-мишени и эффекторные клетки без антитела). Планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C с 5% CO₂. Гибель клеток определяли путем оценки уровня высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) с использованием набора для детектирования LDH в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, планшеты центрифугировали в течение 4 мин при 400× g и 35 мкл супернатанта переносили в плоский 384-луночный планшет. Затем получали реагент LDH и в каждую лунку добавляли 35 мкл этого реагента. В соответствии с кинетическим протоколом измеряли поглощение на 490 нм и 650 нм один раз через каждые 2 минуты в течение 8 минут. Процент специфического лизиса определяли по следующей формуле: (специфическое высвобождение - спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение)×100.

Определение антителозависимой активации NK-клеток.

Активацию первичных NK-клеток тестировали с использованием свежесыведенных клеток от двух доноров, которые ранее были генотипированы по экспрессии гомозиготного FcγRIIIa с высокой аффинностью (аллель V158) или с низкой аффинностью (аллель F158). Серийные разведения mAb (10-кратно серийно разведенные в среде AIM-V от 100 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл) инкубировали с NK-клетками в течение 4 ч. Активацию NK-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии по окрашиванию NK-клеток анти-CD 107a mAb (ФЭ-конъюгированным анти-CD107 антителом, BioLegend®, разведенным 1/35), используемым в качестве функционального маркера активности NK-клеток.

Определение антителозависимой активации человеческого FcγRIIIa.

HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE подвергали 4-кратному серийному разведению в буфере для анализа на ADCC от 5 мкг/мл до 0,076 мкг/мл. Антиген-мишень (HBsAg от Engerix B, Glaxo SmithKline) добавляли в белый плоскодонный 96-луночный планшет в количестве 0,6 мкг/мл в 25 мкл, а затем серийно разведенные антитела добавляли в каждую лунку (25 мкл на лунку), и смесь антитело/клетка инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Эффекторные клетки для биоанализа на ADCC оттаивали и добавляли при плотности клеток $7,5 \times 10^4$ /лунку в 25 мкл (конечная концентрация HBsAg составляла 0,2 мкг/мл). Также были включены контрольные лунки, которые

использовали для определения независимой от антител активации (эти лунки содержали HBsAg и эффекторные клетки, но без антитела) и спонтанной люминесценции планшета (эти лунки содержали только буфер для анализа на ADCC). Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37°C с 5% CO₂. Активация человеческого FcγRIIIa (вариантов V158 или F158) в этом биоанализе приводила к NFAT-опосредуемой экспрессии репортерного гена люциферазы. Люминесценцию измеряли с помощью люминометра с использованием реагента для анализа на люциферазу Bio-Glo-TM в соответствии с инструкциями производителя. Данные (то есть, специфическую активацию FcγRIIIa) выражали как среднее значение относительных единиц люминесценции (RLU) по сравнению с фоном по следующей формуле: RLU при концентрации x mAb - RLU фона.

Определение антителозависимой активации человеческого FcγRIIa.

HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE подвергали 5-кратному серийному разведению в буфере для анализа на ADCP от 50 мкг/мл до 0,00013 мкг/мл. Антиген-мишень (HBsAg от Enderix B) добавляли в белый плоскодонный 96-луночный планшет в количестве 0,6 или 6 мкг/мл в 25 мкл, а затем серийно разведенные антитела добавляли в каждую лунку (25 мкл на лунку), и смесь антиген/антитело инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре. Эффекторные клетки для биоанализа на активацию FcγRIIa оттаивали и добавляли при плотности клеток 50,0×10⁴/лунку в 25 мкл (конечная концентрация HBsAg составляла 0,2 или 2 мкг/мл, соответственно). Также были включены контрольные лунки, которые использовали для определения независимой от антитела активации (эти лунки содержали HBsAg и эффекторные клетки, но без антитела) и спонтанной люминесценции планшета (эти лунки содержали только буфер для анализа на ADCP). Планшеты инкубировали в течение 23 ч при 37°C с 5% CO₂. Активация человеческого FcγRIIa (варианта H131) в этом биоанализе приводила к NFAT-опосредуемой экспрессии репортерного гена люциферазы. Люминесценцию измеряли с помощью люминометра с использованием реагента для анализа на люциферазу Bio-Glo-TM в соответствии с инструкциями производителя. Данные (то есть, специфическую активацию FcγRIIa) выражали как среднее значение относительных единиц люминесценции (RLU) по сравнению с фоном по следующей формуле: RLU при концентрации [x] mAb - RLU фона.

Определение антителозависимой активации человеческого FcγRIIb.

HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE подвергали 5-кратному серийному разведению в буфере для анализа на ADCP от 100 мкг/мл до 0,00026 мкг/мл. Антиген-мишень (HBsAg от Enderix B) добавляли в белый плоскодонный 96-луночный планшет в количестве 3 мкг/мл в 25 мкл, а затем серийно разведенные антитела добавляли в каждую лунку (25 мкл на лунку), и смесь антиген/антитело инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Эффекторные клетки для биоанализа на активацию FcγRIIb оттаивали и добавляли при плотности клеток 75,0×10⁴/лунку в 25 мкл (конечная концентрация HBsAg составляла 1 мкг/мл). Также были включены контрольные лунки, которые использовали для определения независимой от антитела активации (эти лунки содержали HBsAg и эффекторные клетки, но без антитела) и спонтанной люминесценции планшета (эти лунки содержали только буфер для анализа на ADCP). Планшеты инкубировали в течение 20 ч при 37°C с 5% CO₂. Активация человеческого FcγRIIb в этом биоанализе приводила к NFAT-опосредуемой экспрессии репортерного гена люциферазы. Люминесценцию измеряли с помощью люминометра с использованием реагента для анализа на люциферазу Bio-Glo-TM в соответствии с инструкциями производителя. Данные (то есть, специфическую активацию FcγRIIb) выражали как среднее значение относительных единиц люминесценции (RLU) по сравнению с фоном по следующей формуле: RLU при концентрации [x] mAb - RLU фона.

Определение связывания антитела с человеческой клеточной линией гепатомы PLC/PRF/5.

Клетки PLC/PRF/5 обрабатывали трипсином в течение 5 мин при 37°C, переносили в 7 мл среды для культивирования, центрифугировали при 400× g, в течение 4 мин при 4°C и интенсивно промывали при 4°C в PBS. Некоторые клетки фиксировали 4% формальдегидом (20 мин при 4°C), а другие клетки фиксировали, а затем делали проницаемыми с помощью буфера для сообщения проницаемости (20 мин при 4°C). Клеточный осадок ресуспендировали в 2,64 мл промывочного буфера (для фиксированных клеток) или буфера для сообщения проницаемости (для фиксированных клеток и клеток, которым была сообщена проницаемость) (табл. 7) и распределяли по 200 мкл/лунку в 96-луночные круглодонные планшеты (что соответствовало 100000 клеткам/лунку). Планшет центрифугировали при 400× g, в течение 4 мин при 4°C. Серийные разведения 1:5 в 5 точках для тестируемых антител, начиная с концентрации 10 мкг/мл, добавляли в лунки, содержащие клетки, и инкубировали в течение 30 мин на льду. После 2 промывок при 4°C, 400× g, в течение 4 мин в промывочном буфере (фиксированные клетки) или в буфере для сообщения проницаемости (для фиксированных клеток и клеток, которым была сообщена проницаемость), 50 мкл/лунку Alexa Fluor® 647-меченного второго антитела (Таблица 7) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 20 мин на льду. Клетки промывали еще 2 раза буфером для промывки (фиксированные клетки) или буфером для сообщения проницаемости (для фиксированных клеток и клеток, которым была сообщена проницаемость), ресуспендировали в 200 мкл/лунку буфера для промывки (фиксированные клетки) или буфером для сообщения проницаемости (для фиксированных клеток и клеток,

которым была сообщена проницаемость) и сигнал (MFI, средняя интенсивность флуоресценции) количественно оценивали на цитофлуориметре (BD FACSCanto™ II).

Результаты.

Прямые антивирусные механизмы играют важную роль в нейтрализации HBV *in vivo*. Непрямые, Fc-зависимые механизмы действия, опосредованные взаимодействием Fc-области с Fc-гамма-рецепторами (FcγR) на иммунных клетках, также могут вносить важный вклад в эффективность *in vivo* и опосредовать эндогенные иммунные ответы. FcγR-зависимые механизмы могут быть определены *in vitro* путем оценки связывания с FcγR, а также антителозависимой активации человеческих FcγR (Hsieh, Y-T, et al., *Journal of Immunological Methods*, 441(C), 56-66. doi.org/10.1016/j.jim.2016.12.002). Другими представляющими интерес факторами является способность антитела связываться с FcRn и с комплектом.

В одной серии экспериментов, HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE сравнивали друг с другом по их способности связываться с полным набором человеческих FcγR (аллелей FcγRIIIa V158 и F158, аллелей FcγRIIIa H131 и R131 и FcγRIIb) с использованием биослойной интерферометрии (BLI Octet® System, ForteBio). Как показано на фиг. 9A-9E, Fc, несущий мутации MLNS-GAALIE, обладает модифицированным взаимодействием с FcγR, а в частности, Fc, несущий обе эти мутации, в противоположность Fc, несущему только MLNS, имеет повышенный уровень связывания с FcγRIIIa и FcγRIIa, и пониженный уровень связывания с FcγRIIb.

Как показано на фиг. 9F, антитела, несущие мутацию Fc MLNS, имеют повышенный уровень связывания с FcRn при pH 6,0 по сравнению с антителом, имеющим Fc дикого типа, но невысокий или недетектируемый уровень связывания с FcRn при pH 7,4, что сравнимо с антителом, содержащим Fc дикого типа.

Кроме того, связывание HBC34-V35-MLNS-GAALIE с Clq было элиминировано, как было определено с помощью биослойной интерферометрии (фиг. 10).

HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE также тестировали на их способность активировать человеческие FcγRIIIa и FcγRIIa с помощью биоанализов на репортер с использованием клеток. В этих анализах используют клетки Jurkat, сконструированные с использованием NFAT-опосредуемого люциферазного репортера, для выявления активации человеческих FcγR. Хотя HBC34-V35-MLNS слабо активируют или вообще не активирует человеческие FcγRIIIa и FcγRIIa в присутствии HBsAg, однако, HBC34-V35-MLNS-GAALIE показало дозозависимую активацию всех протестированных FcγR (фигуры 11A, 11B, 12A-12B). HBC34-V35-MLNS-GAALIE не активирует FcγRIIb даже при тестировании при 100 мкг/мл (фиг. 13A -13B).

ADCC-активность также оценивали с использованием природных клеток-киллеров (NK), выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови человека, взятых у одного донора, который был ранее генотипирован по экспрессии гетерозиготного FcγRIIIa с высокой аффинностью (V158) и с низкой аффинностью (F158) (F/V). Выделенные NK-клетки использовали для оценки цитолиза клеточной линии гепатомы PLC/PR/5 при воздействии на нее антител HBC34-V35; HBC34-V35-MLNS; HBC34-V35-MLNS-GAALIE; или другим mAb (17.1.41, нацеленным на другой эпитоп антигенной петли HBsAg; см. Egen, R, et al. *Hepatology*, doi.org/10.1053/jhep.2000.9632; Galun, E, et al. *Hepatology*, doi.org/10.1053/jhep.2002.31867). Цитолиз в присутствии HBsAg-специфических mAb HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS, HBC34-V35-MLNS-GAALIE и 17.1.41 не наблюдался (фиг. 14A). Наблюдаемое отсутствие антителозависимого цитолиза клеток PLC/PR/5 может быть связано с низкой экспрессией HBsAg на поверхности этих клеток (фиг. 14B), и авторы, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, лишь отмечают, что такая экспрессия может оказаться недостаточной для запуска цитолиза NK-клетками. И наоборот, высокие уровни HBsAg были обнаружены с использованием HBC34v35 и 17.1.41, если клетки PLC/PR/5 были фиксированными и проницаемыми, что указывает на то, что большая часть HBsAg находится либо внутри клеток, либо в секретируемых формах (то есть, в виде субвирусных частиц) (фиг. 14B).

Активация первичных человеческих NK-клеток (V/F) в присутствии HBC34v35-MLNS или HBC34-V35-MLNS-GAALIE и HBsAg также была оценена с использованием анти-CD107a mAb. Данные представлены на фиг. 15A и 15B.

Эти данные *in vitro* показали, что HBV-специфические связывающие белки согласно изобретению, несущие мутацию GAALIE в Fc, связываются с низкоаффинными FcγRIIa и FcγRIIIa и активируют их более эффективно, чем родительское антитело с Fc, не имеющим GAALIE. Связывающие белки, несущие GAALIE, также не связываются с низкоаффинным ингибирующим FcγRIIb и не активируют его. Связывающие белки, несущие GAALIE, также не связываются с Clq. Кроме того, связывающие белки, несущие GAALIE, не стимулируют ADCC на клетках гепатомы, но активируют человеческие NK-клетки в присутствии растворимого HBsAg. Введение мутации MLNS повышает уровень связывания с FcRn при pH 6,0.

Пример 7. Исследование *in vitro* взаимодействия лекарственного средства с другим лекарственным средством, а именно HBC34-V35-MLNS-GAALIE и ингибитора Pol/RT.

Исследование *in vitro* было проведено для идентификации возможных комбинированных эффектов

HBC34-V35-MLNS-GAALIE вместе с ингибитором Pol/RT HBV, энтекавиром (ETV). Комбинированные эффекты *in vitro* определяли с использованием HBC34-V35-MLNS-GAALIE и ETV в клетках HepG2.2.15 в шахматном порядке. Уровни ДНК HBsAg и HBV использовали в качестве данных анализа и эти данные оценивали на комбинированное действие с использованием MacSynergy II (uab.edu/medicine/peds/macsync). Для нормализации, значения, полученные для необработанных клеток HepG2.2.15, использовали в качестве позитивного контроля, а в качестве негативного контроля использовали среду для культивирования тканей. Графики синергии при 99% доверительном интервале были использованы для получения данных. Эти данные представлены на фиг. 16. Графики синергии, построенные по этим данным, указывают на аддитивное действие HBC34-V35-MLNS-GAALIE вместе с ETV *in vitro*. Примечательно то, что в этом случае, антагонизм не наблюдался. Эти данные подтверждают возможность применения нуклеозидных аналогов в комбинации с HBC34-V35-MLNS-GAALIE в клинических условиях.

Пример 8. Идентификация и характеристика человеческого моноклонального антитела HBC24.

Человеческое моноклональное антитело против HBV выделяли у человека аналогичным образом, как описано в Traggiai E. et al., 2004, Nat. Med. 10(8):871-5. Антитело было охарактеризовано путем определения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей переменных областей и комплементарность-определяющих областей (CDR), и было обозначено "HBC24". В соответствии с этим, HBC24 представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1, имеющее последовательности CDR, V_H и V_L, как показано выше в табл. 3. Примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих V_H и V_L HBC24, представлены в табл. 4.

Пример 9. Получение вариантов HBC24 зародышевой линии и их тестирование на функциональные свойства.

HBC24 анализировали на наличие соматических мутаций в переменных областях по сравнению с последовательностью зародышевой линии. Идентифицированные соматические мутации были превращены в последовательность зародышевой линии с получением вариантов HBC24. HBC24 и варианты тестировали на связывание (*in vitro*) и нейтрализацию (*in vitro*; *in vivo*) серотипов HBV и HBD с помощью анализов, описанных в настоящей заявке.

Пример 10. Введение Fc-модификаций в HBC24 и в его варианты.

Кроме того, получали варианты HBC24, которые содержат мутации MLNS и GAALIE в обоих мономерах Fc. Аминокислотные последовательности HC выбранных вариантов представлены в SEQ ID NO: 121 и 122. Варианты оценивали на: (1) связывание *in vitro* с антигеном; (2) нейтрализацию *in vitro* серотипов HBV с помощью анализов, описанных в настоящей заявке.

Таблица последовательностей и номера SEQ ID NO (список последовательностей).

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
1	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G где X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄ , X ₅ , X ₆ и X ₇ могут представлять собой любую аминокислоту	эпитоп
2	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G где X ₁ представляет собой P, T или S, X ₂ представляет собой C или S, X ₃ представляет собой R, K, D или I, X ₄ представляет собой M или T, X ₅ представляет собой T, A или I, X ₆ представляет собой T, P или L, и X ₇ представляет собой Q, H или L.	
3	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGT TVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLIFILLLCLL FLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMPYPS CCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFV QWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWV YI	S-домен HBsAg (GenBank, номер доступа J02203)
4	MENVTSGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGT TVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLIFILLLCLL FLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMPYPS CCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQ WVFGVLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCLWV YI	S-домен HBsAg (GenBank, номер доступа FJ899792)
5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMPYPS GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	J02203 (D, ayw3)
6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMPYPS CCTKPSDG	FJ899792 (D, adw2)

	NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	
7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFKYLWEWASVRFWSW	AM282986 (A)
8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMPFSCCCTKPTDG NCTCIPISSWAFKYLWEWASVRFWSW	D23678 (B1)
9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMPFSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFWSW	AB117758 (C1)
10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMPFSCCCSKPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	AB205192 (E)
11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMPFSCCCSKPSD GNCTCIPISSWALGKYLWEWASARFSW	X69798 (F4)
12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFKYLWEWASVRFWSW	AF160501 (G)
13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMPFSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKYLWEWASARFSW	AY090454 (H)
14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFKYLWEWASARFSW	AF241409 (I)
15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCTITAQGTSMPFSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFKFLWEWASVRFWSW	AB486012 (J)
16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Y100C/P120T
17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T
18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPLD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T/S143L
19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg C121S
20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122D
21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122I
22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg T123N
23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSMYPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129H
24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSMYPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129L
25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSHPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133H
26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSLYPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133L
27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGSTYPSCCCTKPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133T
28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTEPSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg K141E
29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKSSDG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P142S
30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPKD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg S143K
31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSAG NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg D144A
32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDR NCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg G145R
33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDG ACTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg N146A
34	GRIFRSFY	a.k. HBC34 CDRH1
35	NQDGSEK	a.k.HBC34 CDRH2
36	AAWSGNSGGMDV	a.k.HBC34 CDRH3
37	KLGNKN	a.k.HBC34 CDRL1

38	EVK	а.к. HBC34 CDRL2
39	VIYEVKYRP	а.к. длинной цепи HBC34 CDRL2
40	QTWDSTTVV	а.к. HBC34 CDRL3
41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGK GLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNL RVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSS	а.к. HBC34, HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 VH
42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQT WDSTTVVFGGGTRLTVL	а.к. HBC34 VL
43	GGACGCATCTTTAGAAGTTTTTAC	Нукл. HBC34 CDRH1
44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA	Нукл. HBC34 CDRH2
45	GCGGCTTGGAGCGCAATAGTGGGGGTATGGACGTC	Нукл. HBC34 CDRH3
46	AAATTGGGGAATAAAAAAT	Нукл. HBC34 CDRL1
47	GAGGTAA	Нукл. HBC34 CDRL2
48	gtcatctatGAGGTAAAtaccgccc	Нукл. длинной цепи HBC34 CDRL2
49	CAGACGTGGGACAGCACCCTGTGGTG	Нукл. HBC34 CDRL3
50	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCC GGGGGGTCCCAGAGACTGTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCAT CTTTAGAAGTTTTTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCAGG GAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCACTATAAACCAAGATGGAA GTGAGAAATTATATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCA TCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTATTTCTGCAAATGA ACAACCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCGG CTTGAGCGGCAATAGTGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAG GGGACCACGGTCTCCGTCTCCTCA	Нукл. HBC34 VH
51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCTCAGTGTCCGTGTCCCA GGACAGACAGTCAGCATCCCCTGCTCTGGAGATAAATTGGGG AATAAAAATGTTTGTGGTTTTCAGCATAAGCCAGGCCAGTCC CCTGTGTTGGTCATCTATGAGGTAAATACCGCCCCTCGGGG ATTCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACAGCC ACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGCC TATTTCTGTGACAGCTGGGACAGCACCCTGTGGTGTTCGGC GGAGGGACCAGGCTGACCGTCCTA	Нукл. HBC34 VL
52	XGSSTTSTGPCRTEMTXPSDGNATAIPISSWX где остатки, обозначенные как X, были заменены цистеинами	Пептид
53	TSTGPCRTEMTAQG	Пептид
54	GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTEMTT	Пептид
55	XSMYPSASATKPSDGNXTGPCRTEMTAQGTSX где остатки, обозначенные как X, были заменены цистеинами	Пептид
56	PCRTEMTAQG	Аминокислоты 120-130 S-домена HBsAg (HBV-D J02203
57	PCX ₁ TCX ₂ X ₃ X ₄ AQG, где X ₁ представляет собой R или K, X ₂ представляет собой M или T, X ₃ представляет собой T или I, и X ₄ представляет собой T, P или L	Эпитоп
58	QTFDSTTVV	HBC34-V7 CDRL3 и HBC34-V23 CDRL3 (а.к.)
59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQT FDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-V7 VL
60	AAGCTGGGGAACAAAAAT	HBC34-V7 CDRL1 и HBC-V23 CDRL1 (нукл.)
61	GAGGTGAAA	HBC34-V7 CDRL2 и HBC34v23 CDRL2 (нукл.)
62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT	Длинная цепь HBC34-V7

		CDRL2 и длинная цепь CDRL2 HBC34-V23
63	CAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTC	CDRL3 HBC34-V7 и CDRL3 HBC34-V23 (нукл.)
64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTGTCCGTCTCTCCA GGACAGACCGTGTCCATCCCTTGTCTGGCGACAAGCTGGGG AACAAAAATGTCTGTTGGTTCAGCACAAAGCCAGGGCAGAGT CCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCTTCAGGA ATTCCAGAACGGTTCAGCGGATCAAACAGCGGCAATACTGCA ACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCATGGACGAAGCCGC TTATTTCTGCCAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTCTTTGGC GGGGAACTAGGCTGACCGTGCTG	HBC34-V7, HBC34-V34, и HBC34-V35 VL нукл.
65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNACWYQQKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQT FDSTTVVFGGGTKLTVL	а.к. HBC34-V23 VL
66	INQDGSEK	а.к. HBC34wt CDRH2
67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGK GLEWVANINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNL RVEDTAVYYCAAWSGNSGMDVWGQTTVTVSS	HBC34-V31, HBC34-V32 и HBC34-V33 VH
68	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGGGGACTGGTGCAGCC TGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGTGCAGCTTCTGGAAGAAT CTTCAGATCTTTTACATGAGTTGGGTGAGACAGGCTCCTGG GAAGGGACTGGAGTGGGTCGCAACATCAATCAGGACGGAT CAGAAAAGCTGTATGTGGATAGCGTCAAAGGCAGGTTCACTA TTTCCCGCGACAACGCCAAAAATTCTCTGTTTCTGCAGATGA ACAATCTGCGGGTGGAGGATACCGCTGTCTACTATTGTGCAG CCTGGTCTGGCAACAGTGGAGGCATGGACGTGTGGGGACAG GGAACCACAGTGACAGTCAGCTCC	HBC34-V31, HBC34-V32 и HBC34-V33 VH (нукл.)
69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTGTCCGTCTCTCCA GGCCAGACAGCATCCATCACTTGTCTGGCGACAAGCTGGGG AACAAAAATGCCTGTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGCAGAG TCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCTTCAGG AATCCAGAAAGATTCAGTGGATCAAACAGCGGCAATACTGC TACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCATGGACGAAGCTG ATTACTATTGCCAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTCTTTGG CGGGGAACTAAGCTGACCGTGCTG	HBC34-V23 VL (нукл.)
70	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCAGGAGGAGGGTGGGTCCAGCC CGGAGGGAGCCAGAGACTGTCTTGTGCCGCATCAGGGAGGA TCTTCAGGAGCTTCTACATGTCCTGGGTGCGCCAGGCACCAG GCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCCACCATCAACCAGGACGGA TCTGAAAAGCTGTATGTGGATAGTGTCAAAGGCCGGTTCACA ATTAGCAGAGACAACGCTAAAAATTCTCTGTTTCTGCAGATG AACAACTGCGAGTGGAGGATACCGCGTCTACTATTGCGCC GCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATGTCTGGGGGCA GGGCACAACAGTGAGCGTCTCTTCC	Оптимизированная по кодонам VH HBC34 дикого типа
71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTCTCCGTCTCACCTG GACAGACCGTCTCAATCCCCTGCTCCGGCGATAAACTGGGCA ACAAGAACGTGTGCTGGTTCAGCACAAACCCGGACAGAGT CCTGTGCTGGTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCAAGCGGC ATTCCCGAAAGATTAGCGGCTCCAACTCTGGGAATACCGCA ACACTGACTATCTCTGGAACCCAGGCAATGGACGAGGCAGCT TACTTTTGCCAGACTTGGGATTCAACTACTGTCTGTTCGGCG GCGGAACTAGACTGACTGTCTCTG	Оптимизированная по кодонам VL HBC34 дикого типа
72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC	Оптимизированная по кодонам CDRH1 HBC34 дикого типа optimized
73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG	Оптимизированная по кодонам CDRH2 HBC34 дикого типа

74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATGTC	Оптимизированная по кодонам CDRH3 HBC34 дикого типа
75	AAACTGGGCAACAAGAAC	Оптимизированная по кодонам CDRL1 HBC34 дикого типа
76	GAGGTCAAG	Оптимизированная по кодонам CDRL2 HBC34 дикого типа
77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA	Оптимизированная по кодонам длинная CDRL2 HBC34 дикого типа
78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTG	Оптимизированная по кодонам CDRL3 HBC34 дикого типа
79	GGSGG	Линкер
80	TGPCRTC	Эпитоп
81	GNCTCIP	Эпитоп
82	CCIPSSWAFGCSTTSTGPCRTCC где, в частности, цистеины в положениях 2, 21 и 24 связаны с ацетамидометилом.	Дискретный эпитопный симметик
83	CGNCTCIPSSWAFSTTSTGPCRTCC где, в частности, цистеины в положениях 4, 6, 24 и 27 связаны с ацетамидометилом.	Дискретный эпитопный симметик
84	CGGGCSTTSTGPCRTCC где, в частности, цистеины в положениях 13 и 16 связаны с ацетамидометилом	Петлевой эпитопный симметик
85	STTSTGPCRTC	Эпитоп
86	GNCTCIPSSWAF	Эпитоп
87	GNCTCIPSSWAF	Эпитоп
88	PCRXC	Эпитоп
89	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQT FDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-V35 VL
90	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVSWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQT FDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-V34 VL
91	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGK GLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNL RVEDTAVYYCAAWSGNSGMDVWGQTTVSVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVLHEAL HSHYTKQKLSLSPGK	HC HBC34-V35-MLNS-GAALIE и HBC34-V34-MLNS-GAALIE (g1M17, 1)
92	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGK GLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNL RVEDTAVYYCAAWSGNSGMDVWGQTTVSVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVLHEALHS HYTKQKLSLSPGK	HC HBC34-V35-MLNS и HBC34-V34-MLNS (g1M17, 1)
93	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPV	LC HBC34-V35

	LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
94	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	LC HBC34-V34
95	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKYAMSWVRQAPGKGLEWVASISGSPVPGFIDITYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDVGVIGSYYYYYAMDVWGQGTAVTVSS	HBC24 VH
96	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGLSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYAYSPRWTFGQGTKVEIK	HBC24 VL
97	GSTFTKYA	CDRH1 HBC24
98	ISGSVPGF	CDRH2 HBC24
99	LYYCAKDVGVIGSYYYYYAMDV	CDRH3 HBC24
100	QGLSSSY	CDRL1 HBC24
101	SAS	CDRL2 HBC24
102	QQYAYSPRWT	CDRL3 HBC24
103	gagctgcagctggtggagctccggcggcggctgggtgcagcctggcggctcccagaggctgagctgtccgctctggcaggatctccggctctttacatgctctgggtgcggcaggctccaggcaaggcctggagtggtggtctaccatcaaccaggacggctccgagaagctgtatgtggatagcgtgaaggcagattcacaatctctcgcgacaacccaagaactccctgttctgcagatgaacaatctgagggtggaggataccgccgtgactattgcgccgctggtctggcaatagcggcggcatggacgtgtggggacaggccaccacctgtccgtgtccagc	VH HBC34-V7, HBC34-V35, и HBC34-V34 (оптимизированная по кодонам)
104	agctacgagctgacacagccccctccgtgtccgtgtccctggacagaccgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgtgtctggttcagcataagcctggccagctccccgtgctgtcatctacgaggtgaagtataggcccagcggcatccctgagcggttctctggtccaacagcggcaatacagccacctgacaatctctggcacacaggetatggacgagccgcttatttctgccagaccttgattccaccacagtggtgttcggcggcggcaccagactgacagtgtctg	HBC34-V34 VL (оптимизированная по кодонам)
105	agctacgagctgacacagccccctccgtgtccgtgtccctggacagaccgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgtggcctggttcagcataagcctggccagctccccgtgctgggtcatctacgaggtgaagtataggcccagcggcatccctgagcggttctctggtccaacagcggcaatacagccacctgacaatctctggcacacaggetatggacgagccgcttatttctgccagaccttgattccaccacagtggtgttcggcggcggcaccagactgacagtgtctg	HBC34-V35 VL (оптимизированная по кодонам)
106	gaggtgcagttgttgagctctggggaggctgtgtacagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctctGGATCCACTTTTACCAAATATGCCatgagctgggtccgtcaggtccagggaagggtgagtggtggtcgaagtATTAGTGGAAGTgttctgtgtttGGTATTGACACA tactacgcagactccgtaaggcgggtcaccatccagagacactccaagaacacctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagacacggccttatattactgtGCGAAAGATGTCGGGGTTATCGGGTCATACTATTACTACGCTATGGACGTctggggtcaa	HBC24 VH (дикого типа)
107	aaattgtgtgacgcagctccaggcacctgtctttgtctccagggaaagaccacctctctgcaaggccagtCAGGGTCTTAGCAGCAGTTACTtagcctggtaccagcagaacctggccagctcccagctctctatAGTGCGTCCaccaggccactggcatcccagacaggttcagtgagctgggtctgggacagacttcaactcaccatcagcagactggagcctgaagatttgcagtgtattactgtCAACAGTATGCTTACTCACCTCGGTGGACGttcgccaagggaccaaggtggagatcaaac	HBC24 VL (дикого типа)
108	GAGGTGCAGCTGCTGGAAGCGGCGGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTCTGGCAGCACCTTCACAAAGTATGCAATGTCTTGGGTGCGCCAGGCACCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCTCCATCTCTGGCAGCGTGCC TGGCTTCGGCATCGACACCTACTATGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTTACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACAACACTGTATCTGCAGATGAATTCTCTGCGGGCCGAGGACACCGCCCTGTACTATTGTGCCAAGGATGTGGGCGTGATCGGCAGCTACTATTA CTATGCAATGGACGTGTGGGGACAGGGAACAGCAGTGACAGTGAGCTCC	HBC24 VH (оптимизированная по кодонам)

109	GAGATCGTGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCACACTGTCCCTGTCC CCTGGAGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCTCAGGGC CTGAGCTCCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGA CAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACTCTGCCTCCACCAGAGCA ACAGGCATTCTGACCGCTTCTCCGGATCTGGAAGCGGCACA GACTTACCCCTGACAATCAGCCGGCTGGAGCCTGAGGACTTC GCCGTGTAATATTGTCAGCAGTACGCCTATCCCCAAGGTGG ACTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAG	HBC24 (оптимизированная кодонам)	VL по
110	agctacgagctgacacagccccctccgtgtccgtgtccctggacagaccgtgtccatcccatgcag cggcgacaagctgggcaacaagaacgtgtcctggttcagcataagcctggcagtcctccctgtcgtg gtcatctacgaggtgaagtataggcccagcggcatcctctgagcgggtctctggtccaacagcggca atacagccaccctgacaatctctggcacacaggetatggacgagggcgttatttctccagacctttg attcaccacagtggtgttcggcggcgaccagactgacagtgtg	HBC34-V7 (оптимизированная кодонам)	VL по
111	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNASWYQQKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQT FDSTTVVFGGGTKLTVL	HBC34-V23-L_C40S	
112	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNAAWYQQKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQT FDSTTVVFGGGTKLTVL	HBC34-V23-L_C40A	
113	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVSWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQT WDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-V31-L_C40S	
114	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQT WDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-V31-L_C40A	
115	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVSWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQT FDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-V32-L_C40S	
116	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQT WDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-V32-L_C40A	
117	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNASWYQQKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQT FDSTTVVFGGGTKLTVL	HBC34-V33-L_C40S	
118	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNAAWYQQKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQT FDSTTVVFGGGTKLTVL	HBC34-V33-L_C40A	
119	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVSWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQT WDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-L_C40S	
120	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPV LVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQT WDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-L_C40A	
121	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTKYAMSWVRQAPGK GLEWVASISGSVPGFIDTYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQM NSLRAEDTALYYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWGQGTAVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	HBC24-MLNS	
122	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTKYAMSWVRQAPGK GLEWVASISGSVPGFIDTYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQM NSLRAEDTALYYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWGQGTAVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTL	HBC24-MLNS-GAALIE	

	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	
123	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDQSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	HBC34-V7-мю (IgG2a) HC
124	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCITITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	HBC34-V7-мю (IgG2a) LC
125	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDQSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	HBC34-V35-мю (IgG2a) HC
126	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCITITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	HBC34-V35-мю (IgG2a) LC
127	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTKYAMSWVRQAPGKGLEWVASISGSPVPGFIDITYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWGQGTAVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	HBC24-мю (IgG2a) HC
128	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGLSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAYSPTWTFGQGTKEIKADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNRFYPKIDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTITKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC	HBC24-мю (IgG2a) LC
129	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDQSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPAPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP	HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 HC (дикого типа)

	QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
130	GCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTCCTACTGGCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGATGTCTGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAATCCCAGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCATACATTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTGGTGACCTGTGCCCTCTTCCAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCAACAAGCCAAGCAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCTTGTGATAAGACCCATACATGCCCTCCATGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGCCCAAGCGTGTTCCTGTTCCACCCAAGCCTAAGGATACCCTGATGATCTCCAGAACCCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCGATAATGCTAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCACTACAACCTACCTATCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGTGACCCAGGATTTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCTAATAAGGCCCTGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCACAGGTGTACACACTGCCTCCATCTCGCGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTTCCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCTCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTTCTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTATACACA GAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAG	HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 CH1-шарнирная область-CH2-CH3 (оптимизированная по кодонам)
131	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGCGGCTGGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCAGAGGCTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCAGGATCTCCGGTCTTTTACATGTCTTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTACCATCAACCAGGACGGCTCCGAGAAGCTGTATGTGGATAGCGTGAAGGGCAGATTACAATCTCTCGCGACAACGCCAAGAACTCCCTGTTTCTGCAGATGAA CAATCTGAGGGTGGAGGATACCGCCGTGTAATTTGCGCCGCTTGCTGCGCAATAGCGGCGGCATGGACGTGTGGGGACAGGGCACCACCGTGTCCGTGTCCAGCGCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTCCTACTGGCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCCGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGACATATTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTGGCCTGTACTCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCTTCCAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGCAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCTTGTGATAAGACCCATACATGCCCTCCATGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGCGGCCCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAGGATACCCTGATGATCTCCAGAACCCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACCTACCTATCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGTGACCCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGAAGGTGTCTAATAAGGCCCTGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCACAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTTCCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCTCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTTCTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTATACACA GAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAG	HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 (оптимизированная по кодонам)

132	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCC TCTTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGC CTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGG AAGGCTGATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCGTGGAGACAAC AACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAG CTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGCTC TTATTCTGCCAGGTGACCCATGAGGGCAGCACCCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCCACCAGTGTCT	HBC34-V7 CL (оптимизированная по кодонам)
133	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCCGTGTCCCCT GGACAGACCCTGTCCATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGG CAACAAGAACGTGTGCTGGTTTCAGCATAAGCCTGGCCAGTC CCCCGTGCTGGTCACTACGAGGTGAAGTATAGGCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAACAGCGGCAATACAGC CACCCCTGACAATCTCTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG TTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGC GGCGGCACCAGACTGACAGTGTGGGACAGCCAAAGGCTGC TCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCCTTCCGAGGAGCTGCAG GCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTAC CCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAAGGCTGATAGCTCTCC GTGAAGGCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCAGTC TAACAATAAGTACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGACACC AGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGCTTTATTCTGCCAGGTGAC CCATGAGGGCAGCACCCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCACC AGTGTCT	HBC34-V7 LC (VL-CL) (оптимизированная по кодонам)
134	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCC TCTTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGC CTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGG AAGGCTGATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCGTGGAGACAAC AACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAG CTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGCTC TTATTCTGCCAGGTGACCCATGAGGGCAGCACCCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCCACCAGTGTCT	HBC34-V34, HBC34-V35 CL (оптимизированная по кодонам)
135	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCCGTGTCCCCT GGACAGACCCTGTCCATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGG CAACAAGAACGTGTCCCTGGTTTCAGCATAAGCCTGGCCAGTC CCCCGTGCTGGTCACTACGAGGTGAAGTATAGGCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAACAGCGGCAATACAGC CACCCCTGACAATCTCTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG TTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGC GGCGGCACCAGACTGACAGTGTGGGACAGCCAAAGGCTGC TCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCCTTCCGAGGAGCTGCAG GCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTAC CCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAAGGCTGATAGCTCTCC GTGAAGGCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCAGTC TAACAATAAGTACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGACACC AGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGCTTTATTCTGCCAGGTGAC CCATGAGGGCAGCACCCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCACC AGTGTCT	HBC34-V34 LC (VL-CL) (оптимизированная по кодонам)
136	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCCGTGTCCCCT GGACAGACCCTGTCCATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGG CAACAAGAACGTGGCCTGGTTTCAGCATAAGCCTGGCCAGTC CCCCGTGCTGGTCACTACGAGGTGAAGTATAGGCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAACAGCGGCAATACAGC CACCCCTGACAATCTCTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG TTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGC GGCGGCACCAGACTGACAGTGTGGGACAGCCAAAGGCTGC TCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCCTTCCGAGGAGCTGCAG GCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTAC CCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAAGGCTGATAGCTCTCC GTGAAGGCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCAGTC TAACAATAAGTACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGACACC	HBC34-V35 LC (VL-CL) (оптимизированная по кодонам)

	AGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGAC CCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCACCG AGTGTCT	
137	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc hIgG1 дикого типа
138	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSAAASGRIFRSFYMSWVRQAPGK GLEWVATINQDGESEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNL RVEDTAVYYCAAWSGNSGMDVWGQTTVSVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NRYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	HBC34, HBC34-V7, HBC34-V23, HBC34-V34, HBC34-V35, HBC34_C40S, HBC34_C40A, HBC34-V23_C40S, HBC34-V23_C40A HC с мутацией GAALIE в Fc hIgG1
139	ESKYGPPCPPCPAPPVAGP	Химерная шарнирная последовательность

Различные варианты осуществления изобретения, описанные выше, могут быть скомбинированы для получения дополнительных вариантов осуществления изобретения. Все патенты США, публикации заявок на патент США, заявки на патент США, иностранные патенты, иностранные патентные заявки и непатентные публикации, упоминаемые в данном описании и/или перечисленные в списке патентных заявок в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. Аспекты вариантов осуществления изобретения могут быть изменены, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций для получения дополнительных вариантов осуществления изобретения.

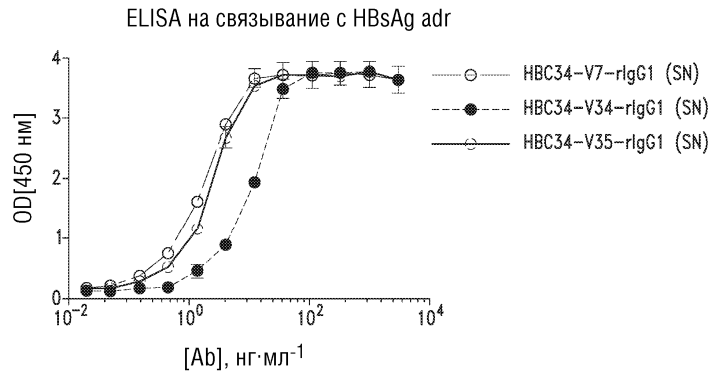
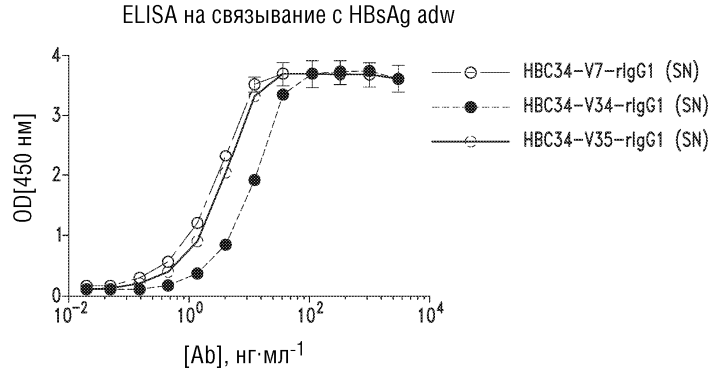
Предварительная заявка на патент США 62/782274, поданная 19 декабря 2018, и предварительная заявка на патент США 62/860085, поданная 1 июня 2019, в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Эти и другие изменения могут быть сделаны в вариантах осуществления изобретения, исходя из приведенного выше подробного описания. В общих чертах, в нижеследующей формуле изобретения, используемые термины не должны рассматриваться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления изобретения, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но они должны включать все возможные варианты осуществления изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, к которым относятся такие пункты формулы изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничена таким раскрытием.

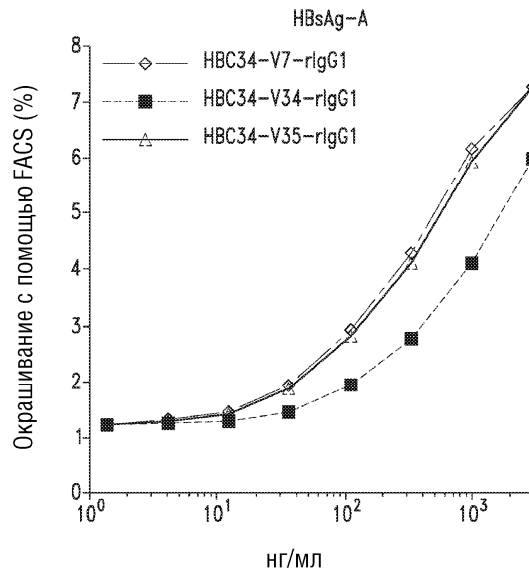
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Выделенное антитело, содержащее:
 - тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и
 - легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93,
 где антитело связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию, вызываемую вирусом гепатита В и/или вирусом гепатита D (дельта).
- Антитело по п.1, где антитело способно связываться с HBsAg с генотипом, выбранным из генотипов HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J или любой их комбинации.
- Антитело по п.1 или 2, где антитело способно снижать концентрацию ДНК HBV в сыворотке у млекопитающего, имеющего HBV-инфекцию.
- Антитело по любому из пп.1-3, где антитело способно снижать концентрацию HBsAg в сыворотке у млекопитающего с инфекцией HBV.
- Антитело по любому из пп.1-4, где антитело способно снижать концентрацию HBeAg в сыворотке у млекопитающего с инфекцией HBV.
- Антитело по любому из пп.1-5, где антитело способно снижать концентрацию HBcAg в сыворотке у млекопитающего с инфекцией HBV.
- Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по любому из пп.1-6.
- Полинуклеотид по п.7, где нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетке-хозяине.
- Полинуклеотид по п.7 или 8, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 105.

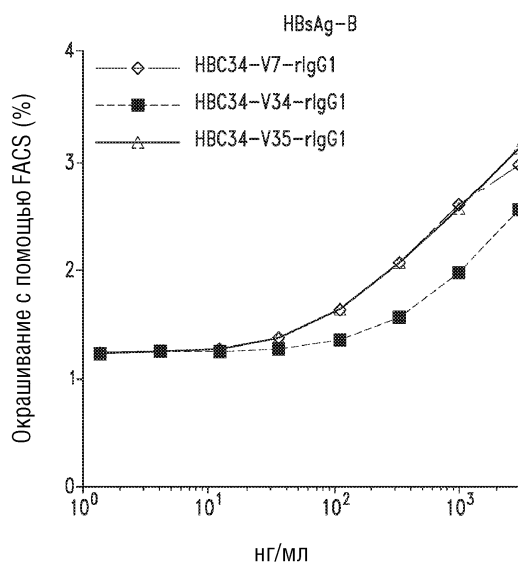
10. Полинуклеотид по п.9, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 103, кодирующую V_H , и нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 105, кодирующую V_L .
11. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.7-10.
12. Вектор по п.11, где вектор включает лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.
13. Клетка-хозяин, содержащая гетерологичный полинуклеотид по любому из пп.7-10.
14. Фармацевтическая композиция, содержащая:
 - (i) антитело по любому из пп.1-6;
 - (ii) полинуклеотид по любому из пп.7-10;
 - (iii) вектор по п.11 или 12; или
 - (iv) любую комбинацию из (i)-(iii); и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.
15. Композиция по п.14, дополнительно содержащая:
 - (i) ингибитор полимеразы;
 - (ii) интерферон;
 - (iii) ингибитор контрольной точки;
 - (iv) агонист, стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки; или
 - (v) любую комбинацию из (i)-(iv).
16. Композиция по п.15, где ингибитор полимеразы включает ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию.
17. Композиция по п.15 или 16, где ингибитор полимеразы включает ламивудин.
18. Композиция по п.15, где интерферон включает IFN-бета и/или IFN-альфа.
19. Композиция по п.15, где ингибитор контрольной точки включает анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
20. Способ получения антитела по любому из пп.1-6, включающий культивирование клетки-хозяина по п.13 в условиях и в течение периода времени, достаточных для получения антитела.
21. Способ лечения, профилактики или ослабления гепатита В и/или гепатита D у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества:
 - (i) антитела по любому из пп.1-6;
 - (ii) полинуклеотида по любому из пп.7-10;
 - (iii) вектора по п.11 или 12; и/или
 - (vi) фармацевтической композиции по п.14.
22. Способ по п.21, дополнительно включающий введение индивидууму по меньшей мере одного из:
 - (v) ингибитора полимеразы;
 - (vi) интерферона;
 - (vii) ингибитора контрольной точки;
 - (viii) агониста стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки; или
 - (ix) любой комбинации из (v)-(viii).
23. Способ по п.22, где ингибитор полимеразы включает ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию.
24. Способ по п.22, где интерферон включает IFN-бета и/или IFN-альфа.
25. Способ по п.22, где ингибитор контрольной точки включает анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или анти-CTLA4-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
26. Способ по любому из пп.21-25, где индивид страдает хроническим гепатитом В; индивидууму проводят трансплантацию печени; индивидуум не иммунизирован от гепатита В; индивидуумом является новорожденный; индивидууму проводят или проводили гемодиализ; или любое сочетание из вышеуказанного.
27. Способ диагностики гепатита В *in vitro*, где способ включает:
 - (i) контактирование образца, взятого у индивидуума, с антителом по любому из пп.1-6; и
 - (ii) детектирование комплекса, содержащего антиген и антитело.
28. Способ по п.27, где образец содержит кровь, выделенную у индивидуума.
29. Способ детектирования присутствия или отсутствия эпитопа в правильной конформации в вакцине против вируса гепатита В и/или в вакцине против вируса гепатита D, где указанный способ включает:
 - (i) контактирование вакцины с антителом по любому из пп.1-6; и
 - (ii) определение образования комплекса, содержащего антиген и антитело.



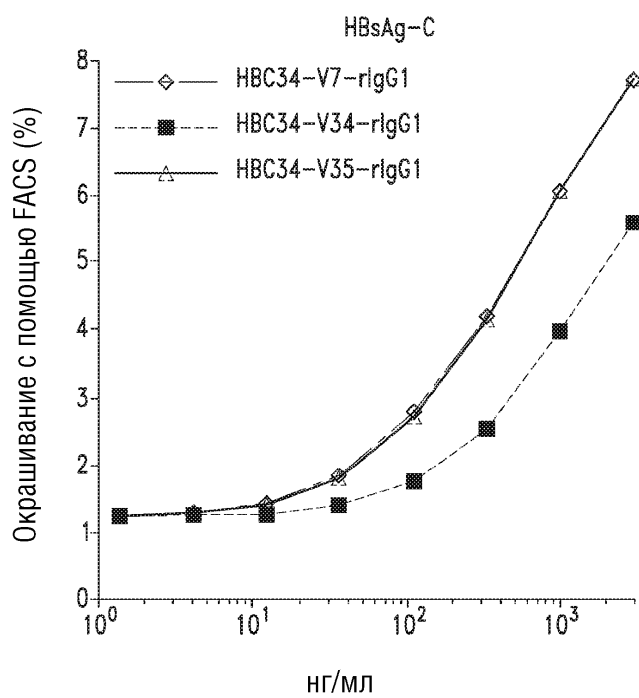
Фиг. 1



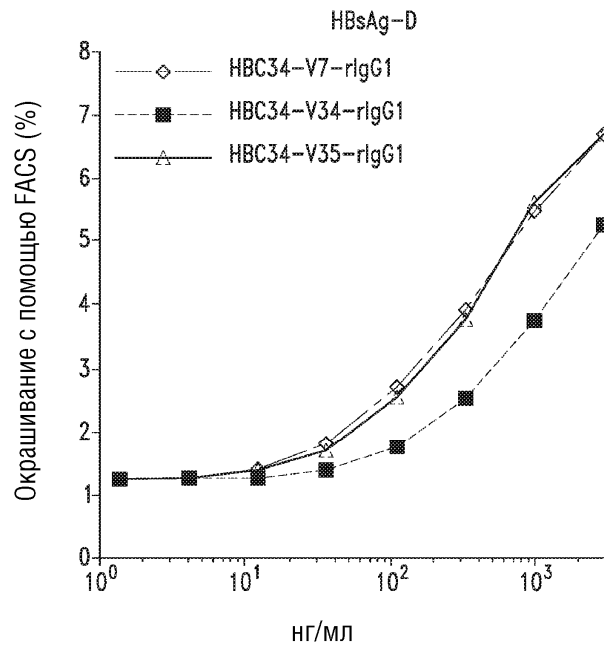
Фиг. 2А



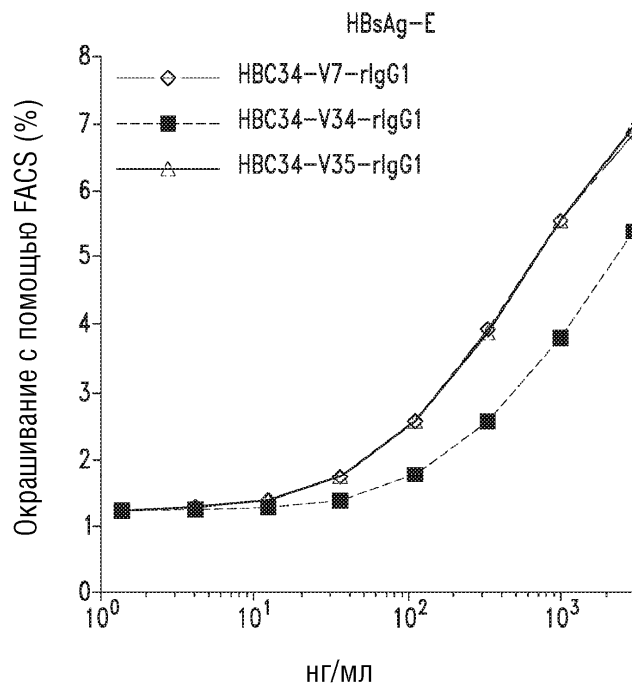
Фиг. 2В



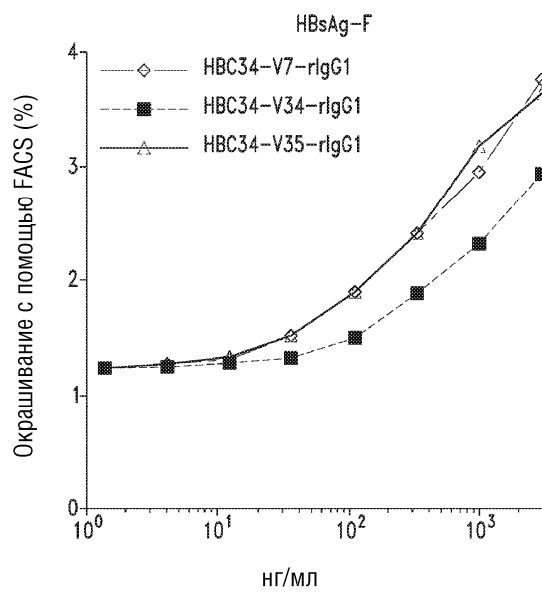
Фиг. 2С



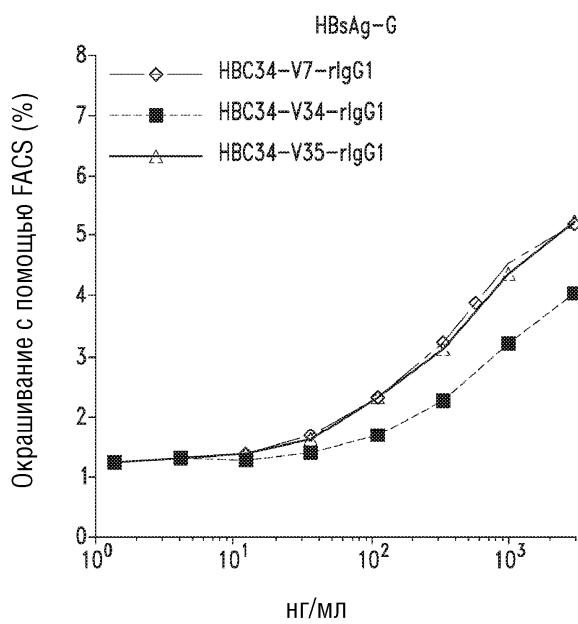
Фиг. 2D



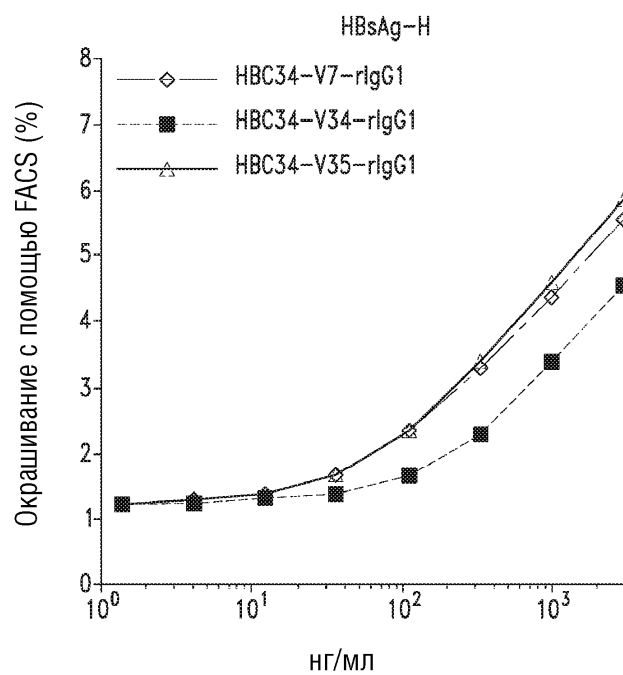
Фиг. 2E



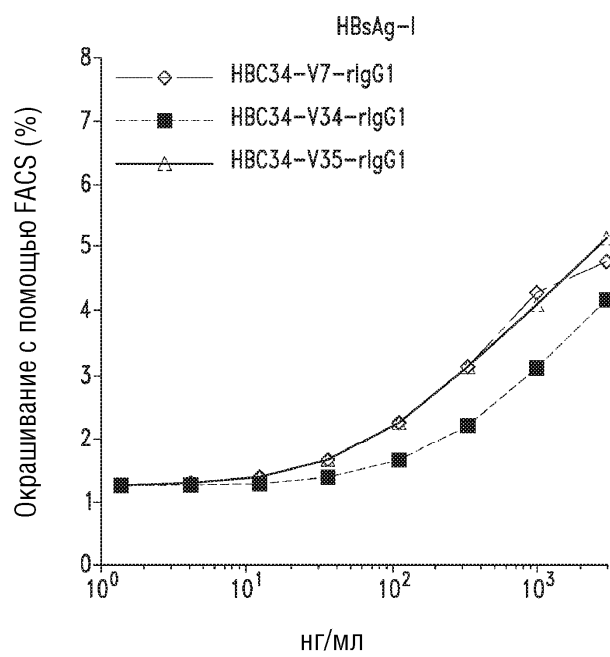
Фиг. 2F



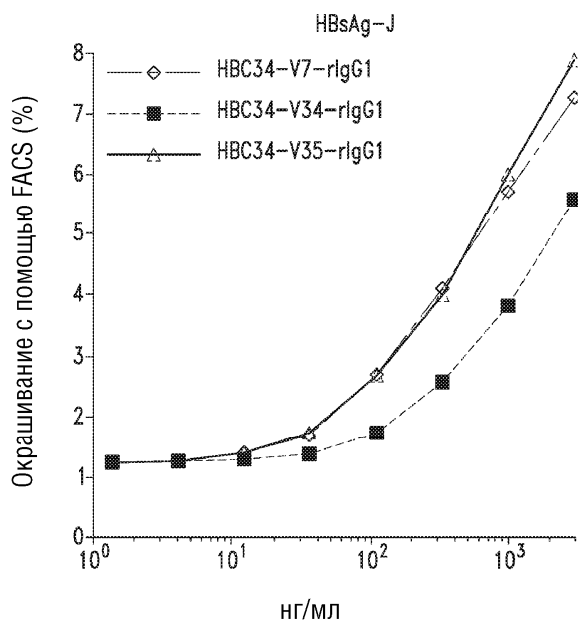
Фиг. 2G



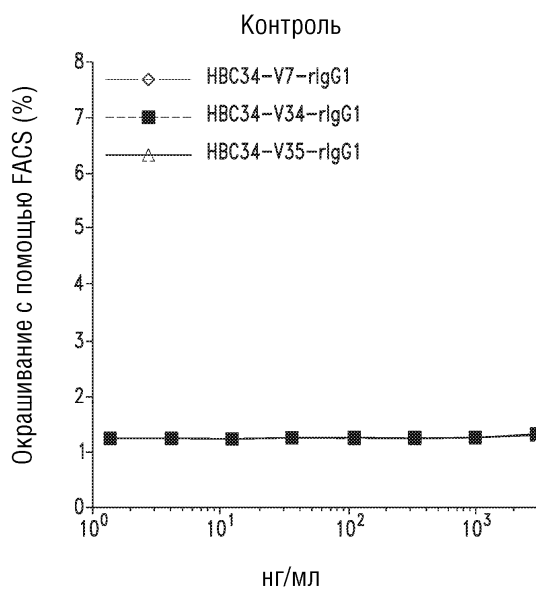
Фиг. 2H



Фиг. 2I

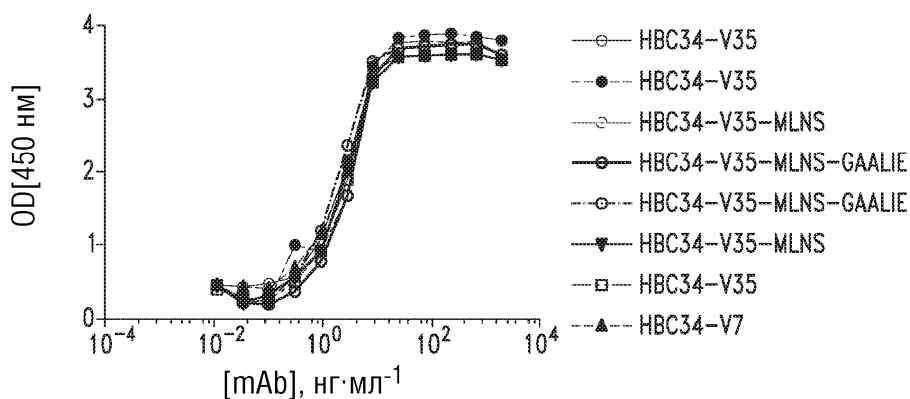


Фиг. 2J



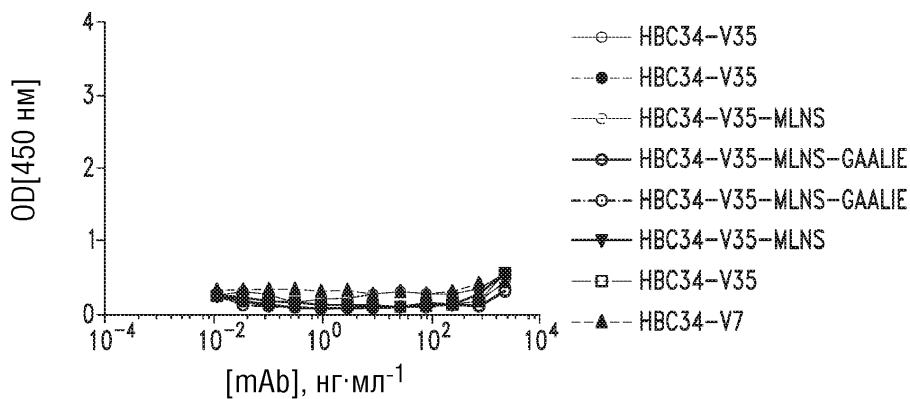
Фиг. 2К

Связывание с HBsAg (adw), Эксперимент 1



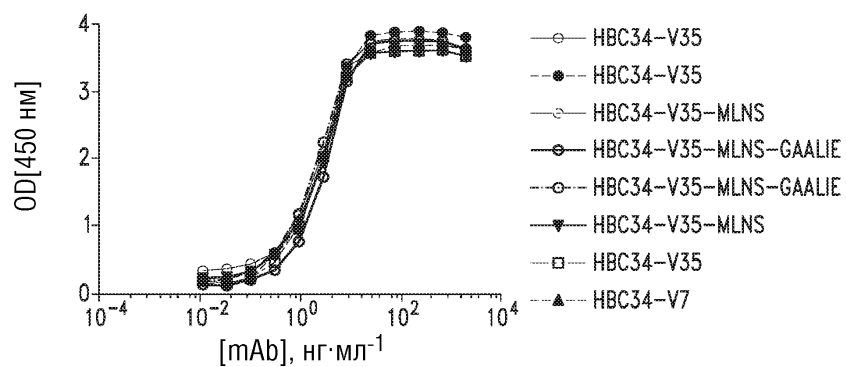
	EC50
HBC34-V35	2.43
HBC34-V35	2.799
HBC34-V35-MLNS	2.565
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	3.186
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	1.982
HBC34-V35-MLNS	2.309
HBC34-V35	2.662

Связывание с планшетами без покрытия, Эксперимент 1



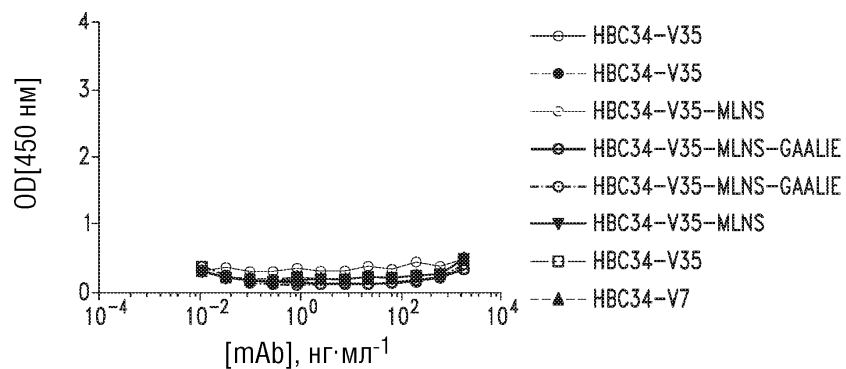
Фиг. 3А

Связывание с HBsAg (adw), Эксперимент 2

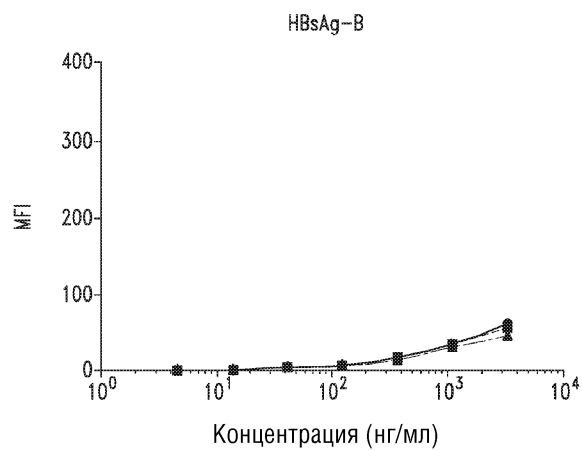
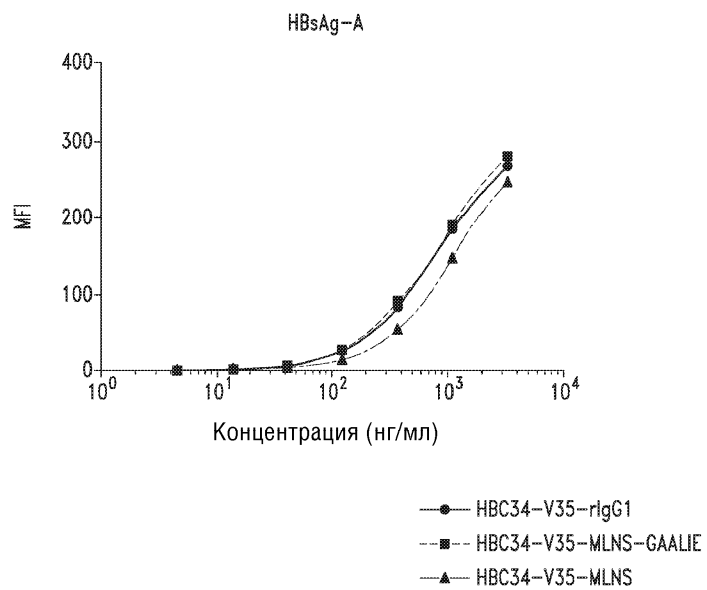


	EC50
HBC34-V35	2.278
HBC34-V35	2.651
HBC34-V35-MLNS	2.484
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	3.018
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	1.958
HBC34-V35-MLNS	2.174
HBC34-V35	2.358

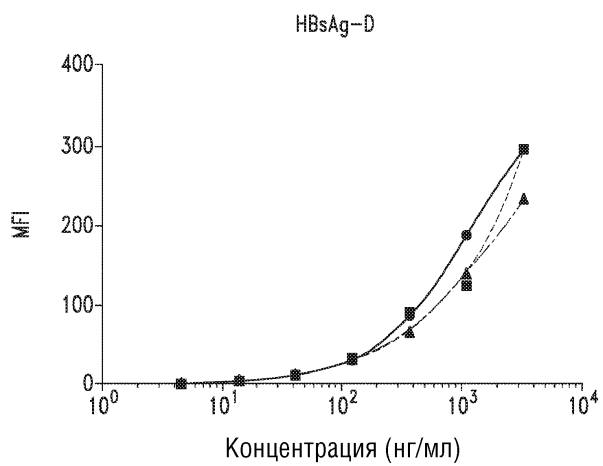
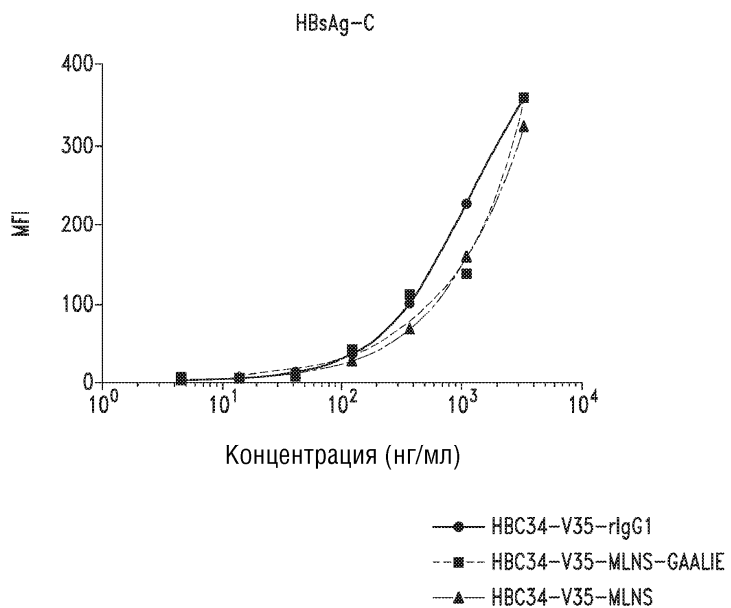
Связывание с планшетами без покрытия, Эксперимент 2



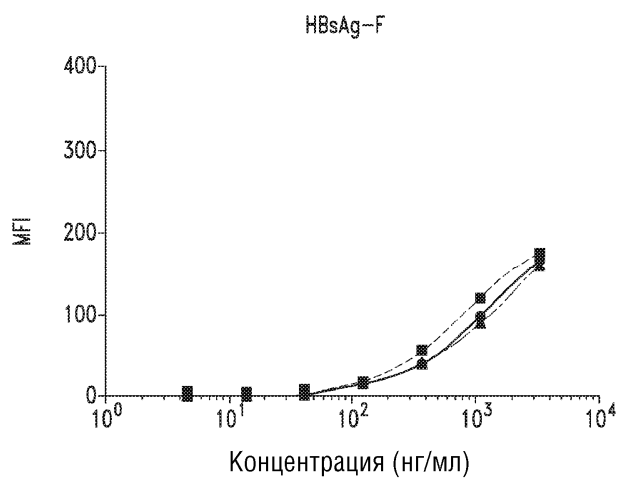
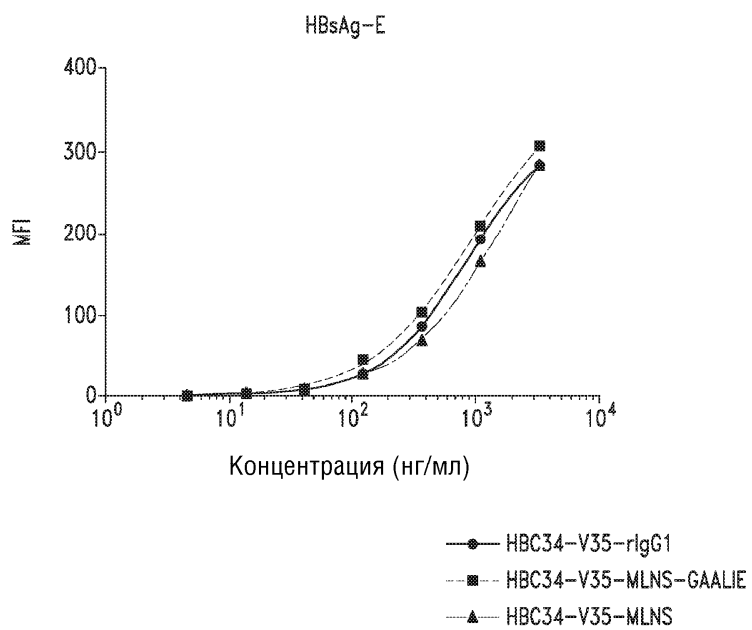
Фиг. 3В



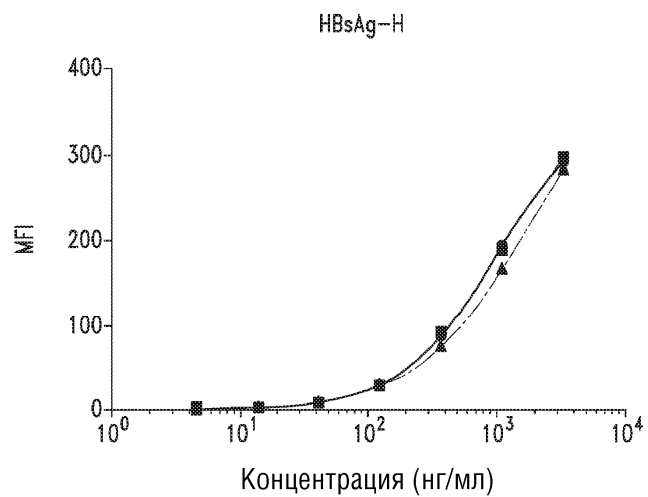
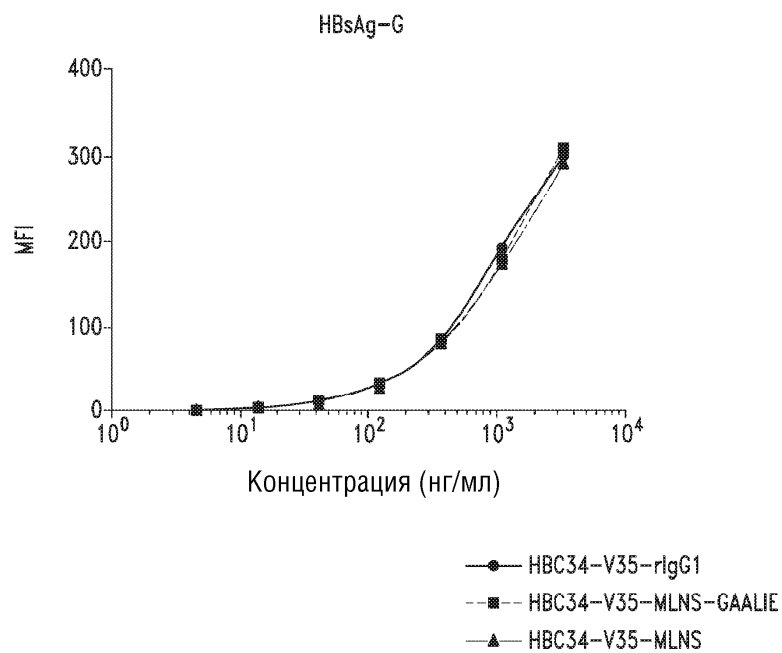
Фиг. 3С



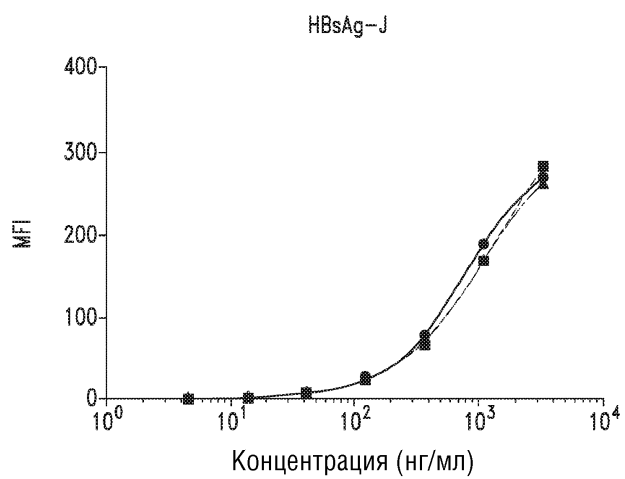
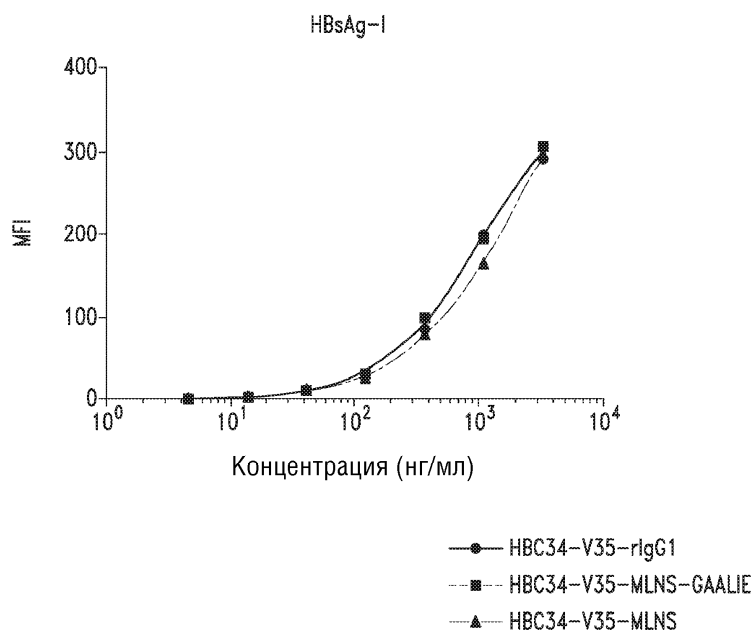
Фиг. 3D



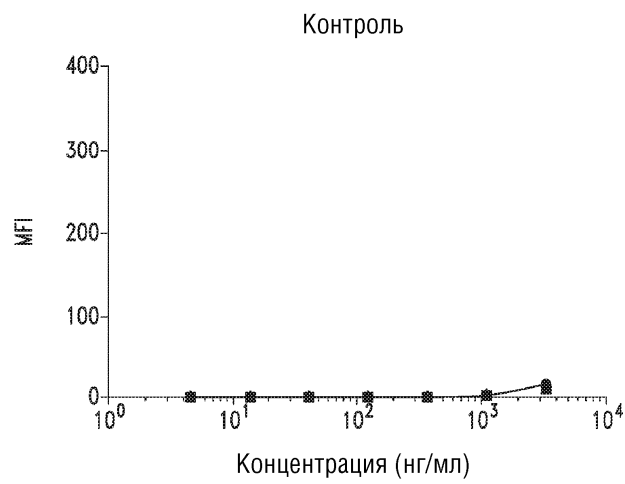
Фиг. 3Е



Фиг. 3F

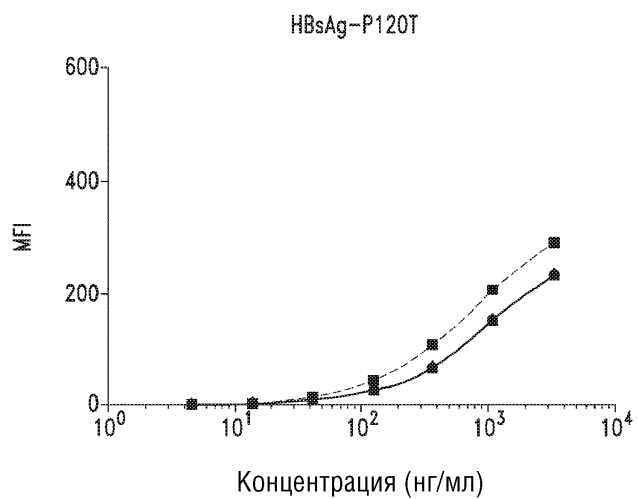
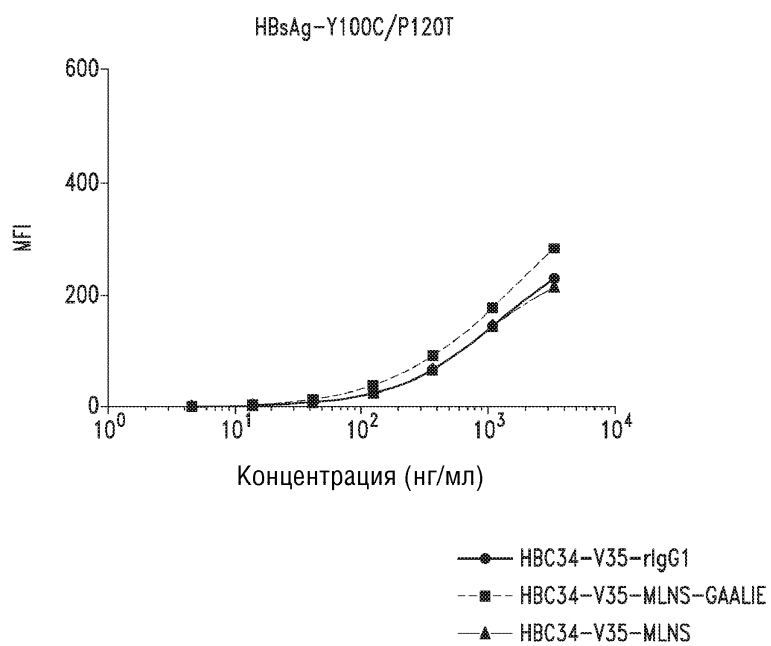


Фиг. 3G

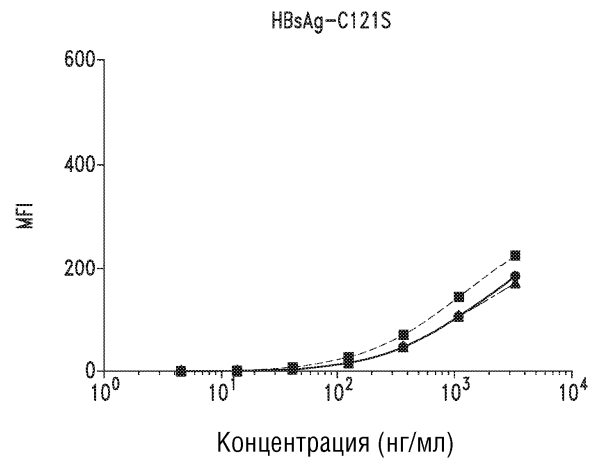
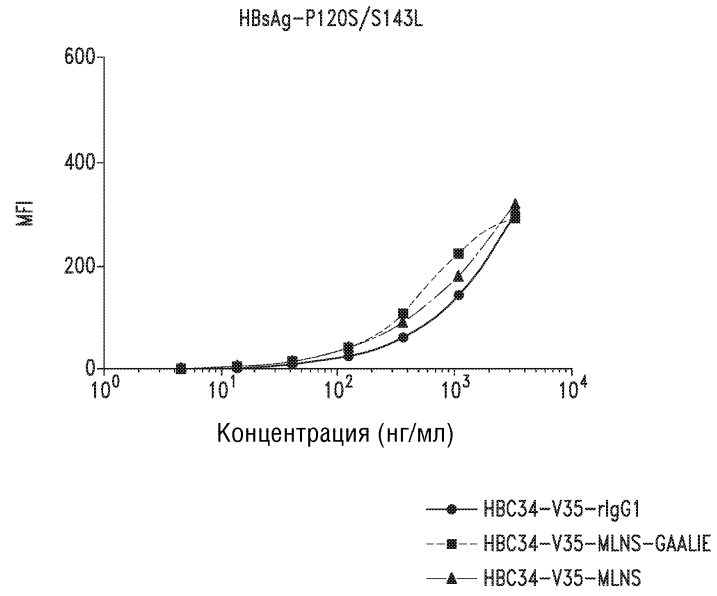


- HBC34-V35-rlgG1
- HBC34-V35-MLNS-GAALIE
- ▲ HBC34-V35-MLNS

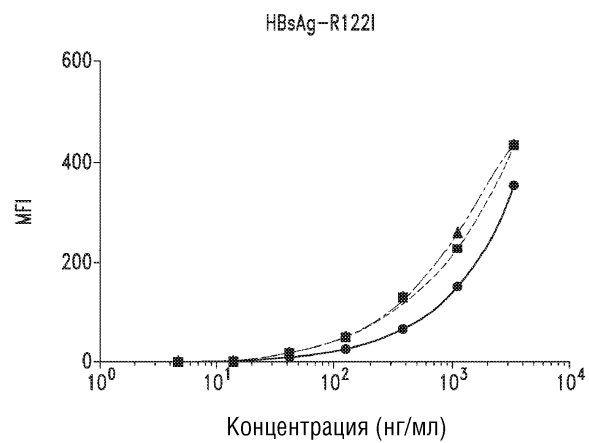
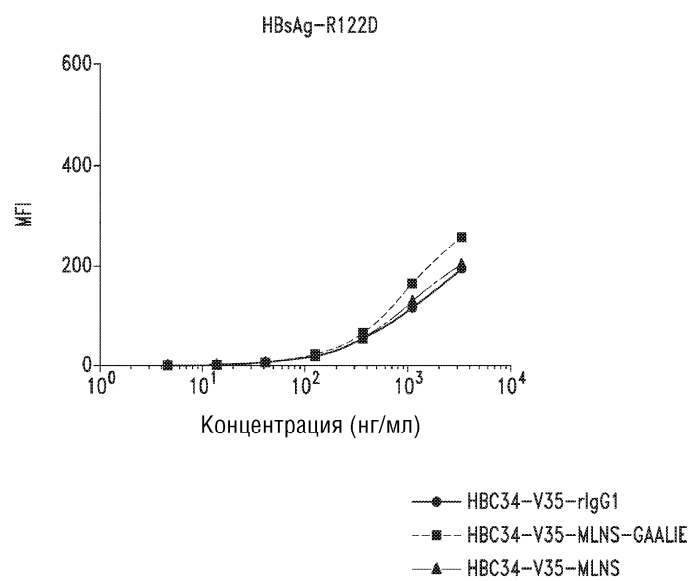
Фиг. 3Н



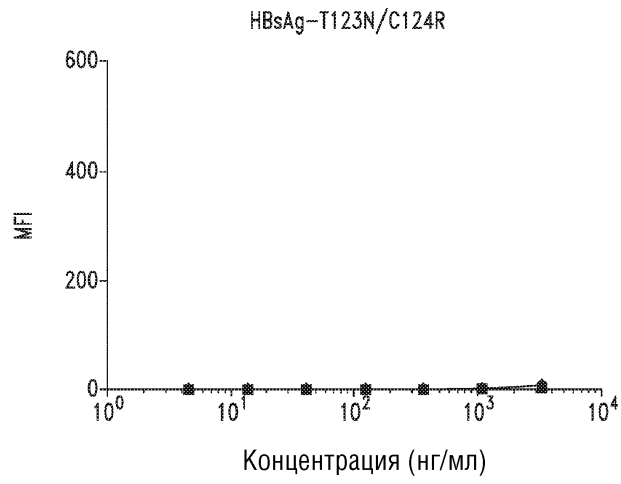
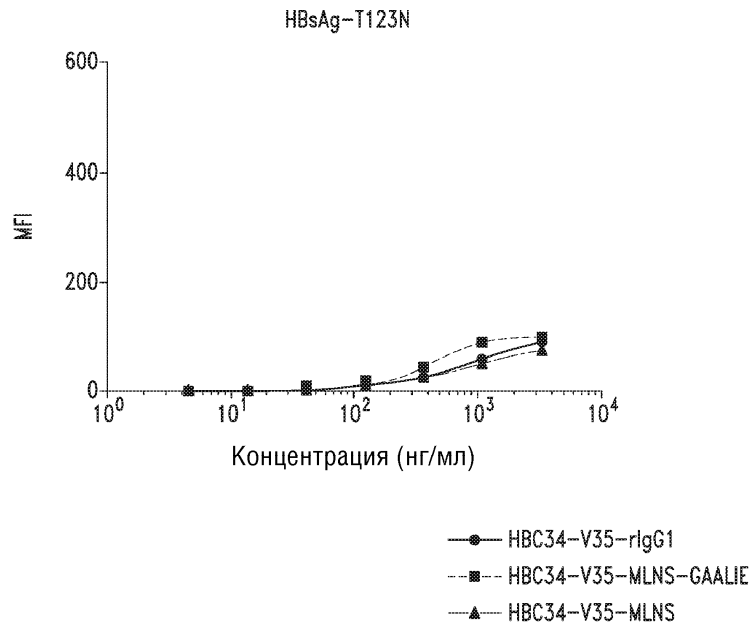
Фиг. 3I



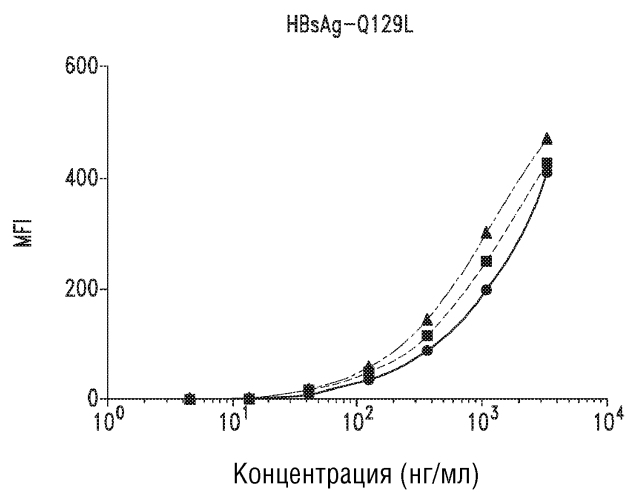
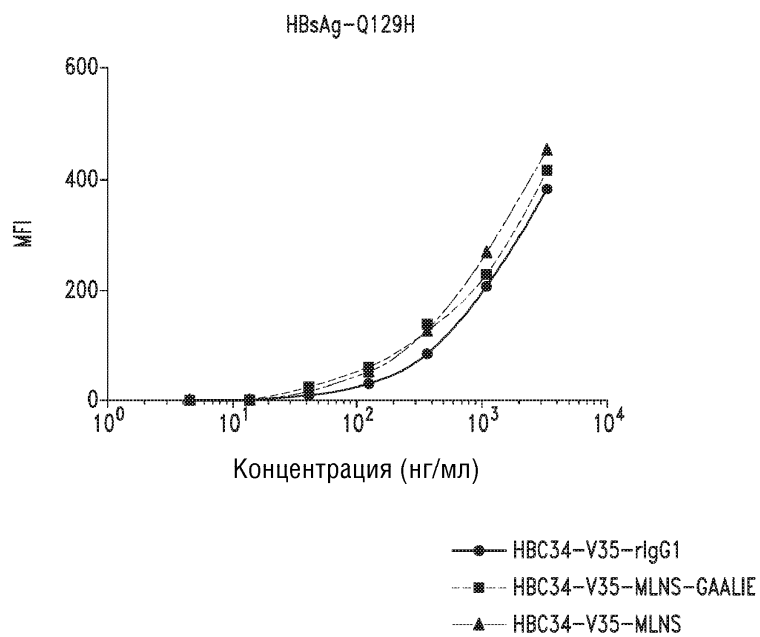
Фиг. 3J



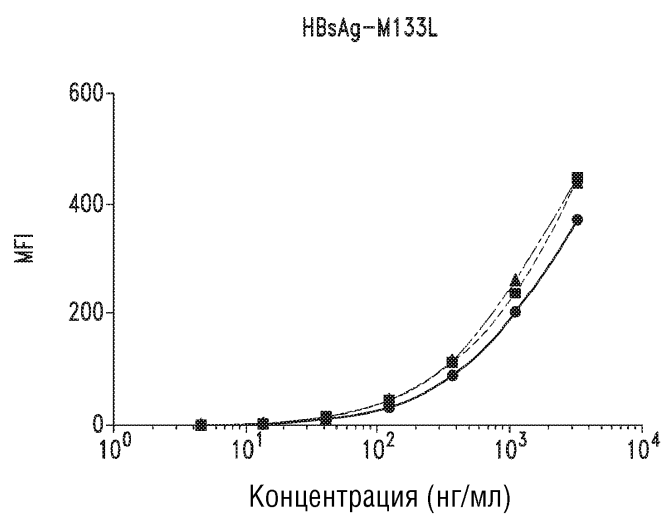
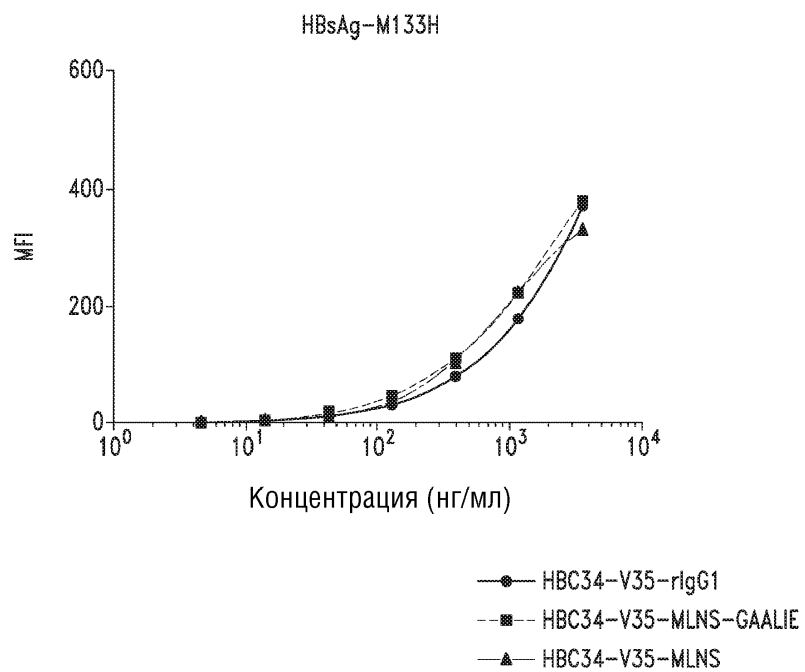
Фиг. 3К



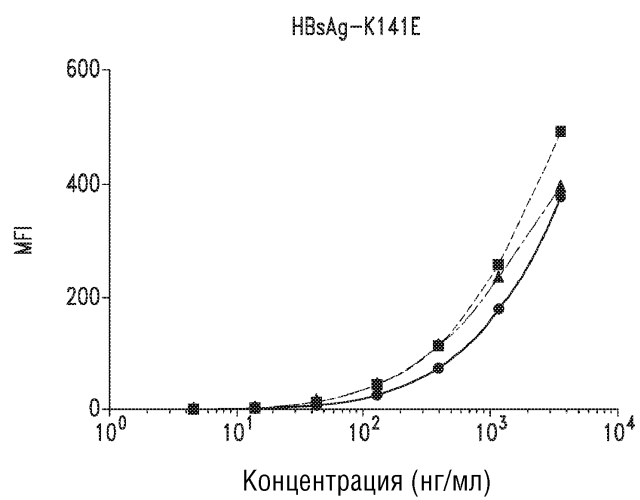
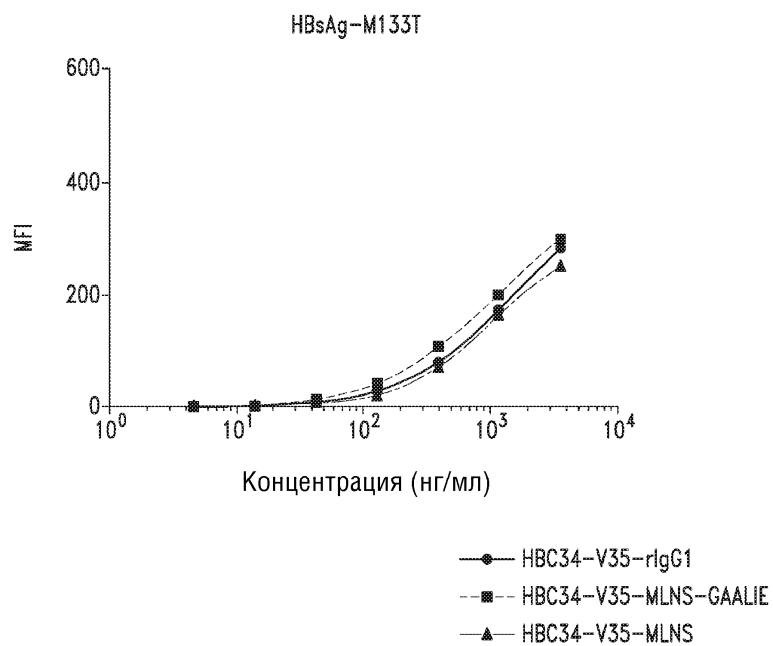
Фиг. 3L



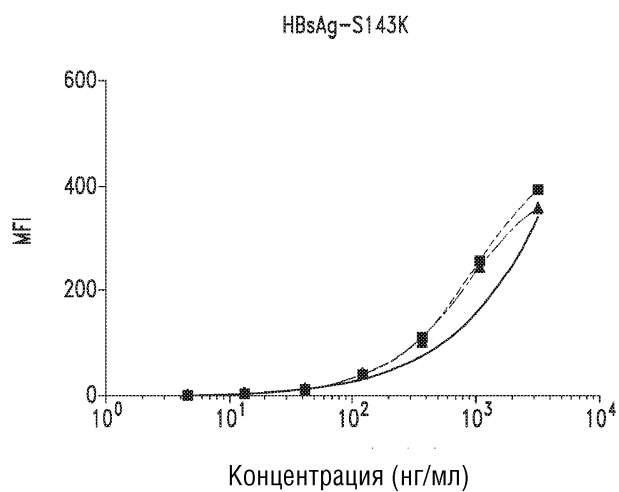
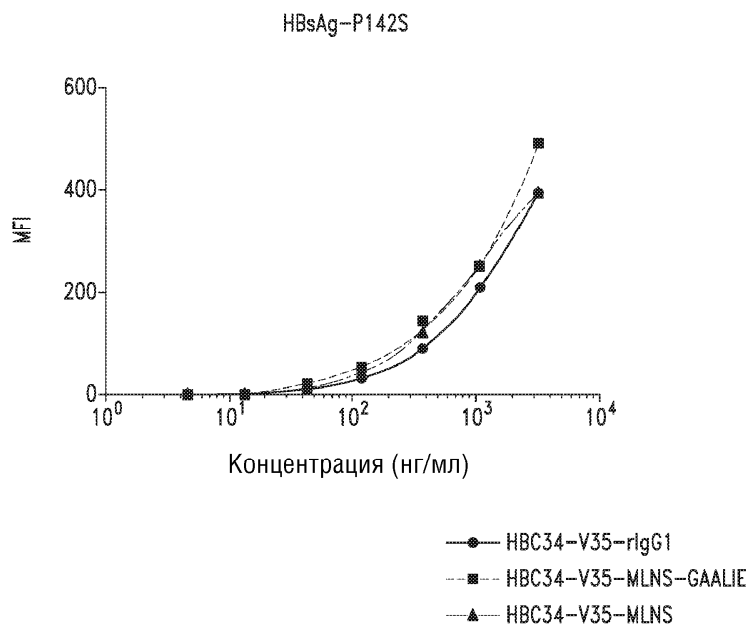
Фиг. 3М



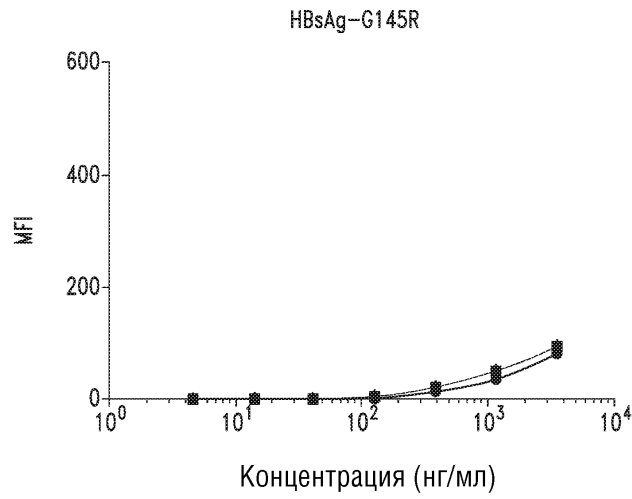
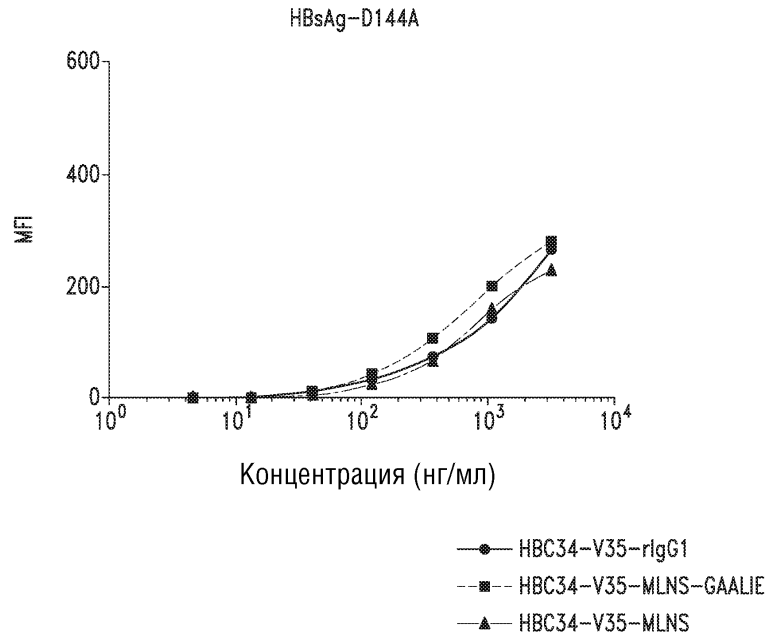
Фиг. 3N



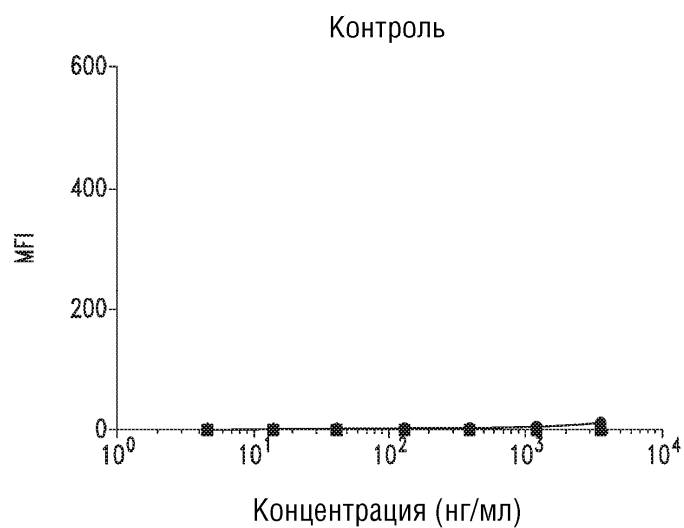
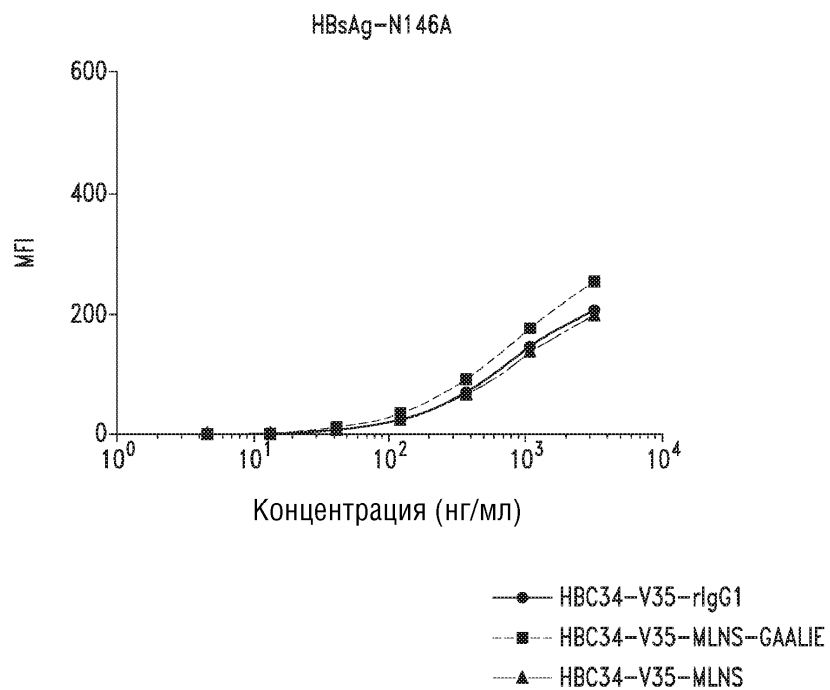
Фиг. 30



Фиг. 3Р

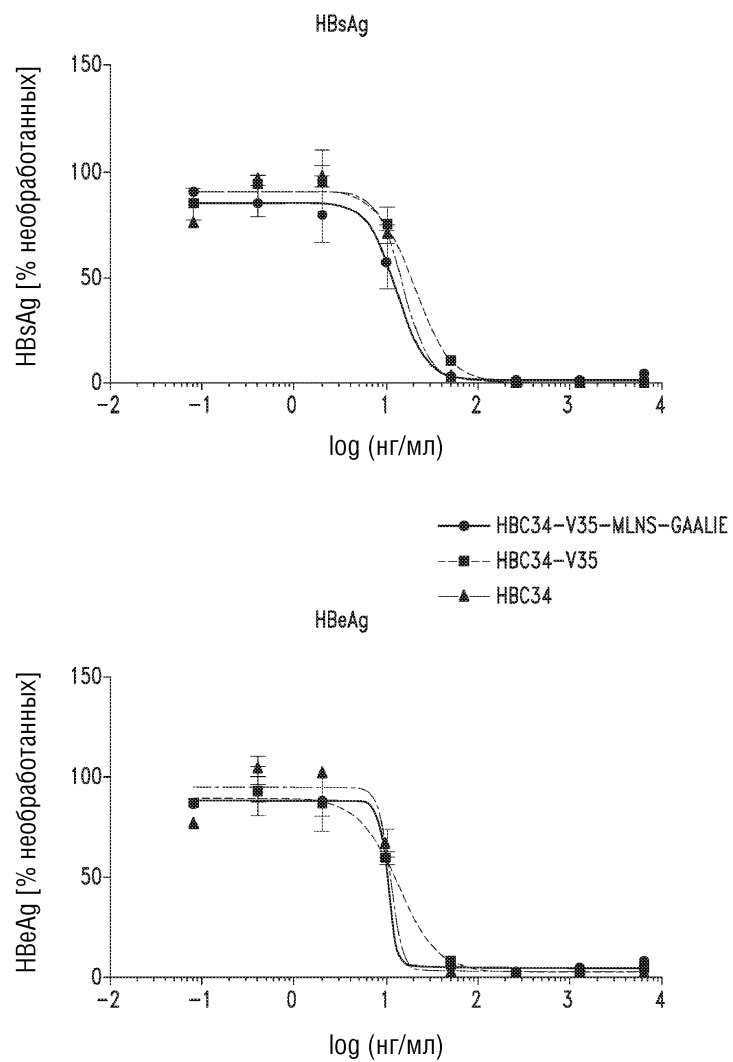


Фиг. 3Q



Фиг. 3R

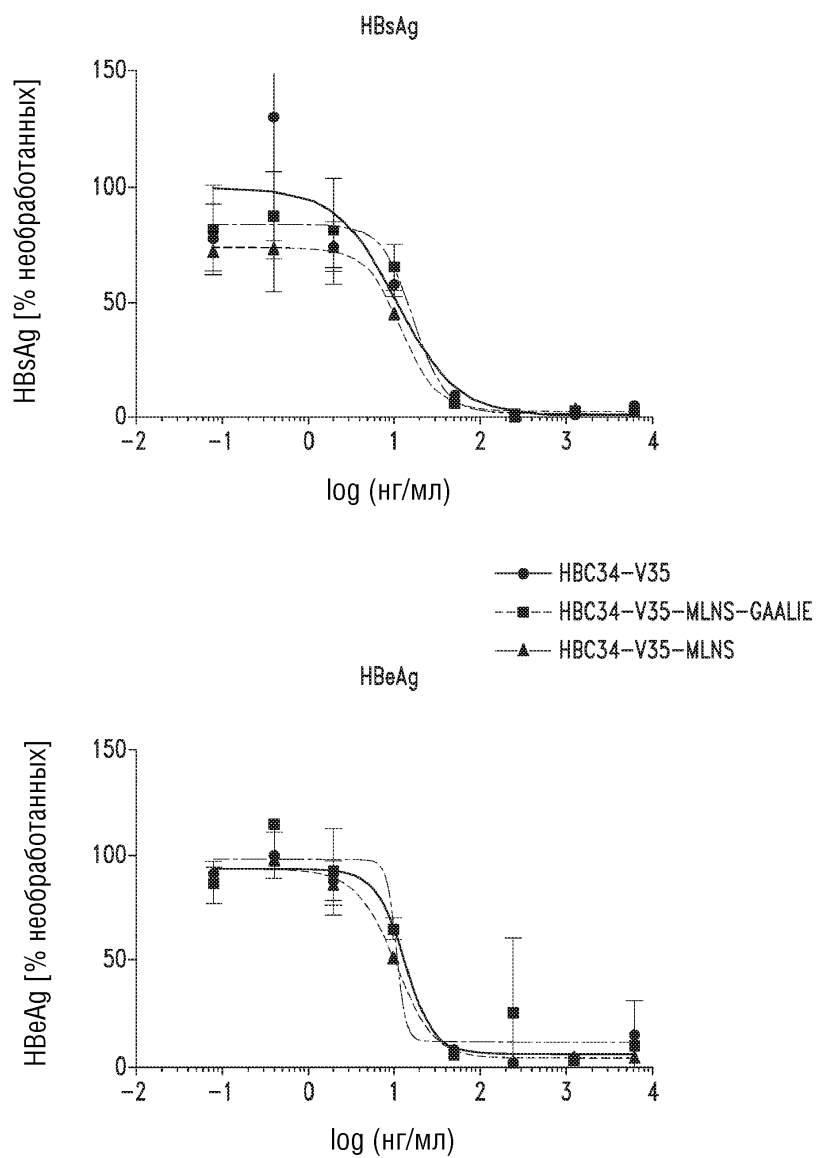
046709



Фиг. 3S

Антитело	HBsAg	HBeAg
	EC ₅₀ (нг/мл)	EC ₅₀ (нг/мл)
HBC34	13.64 (12.28-15.15)	11.67 (11.3-12.05)
HBC34-V35	17.97 (16.22-19.9)	12.61 (11.59-13.72)
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	12.79 (12.75-12.84)	10.85 (10.78-10.93)

Фиг. 3T



Фиг. 3U

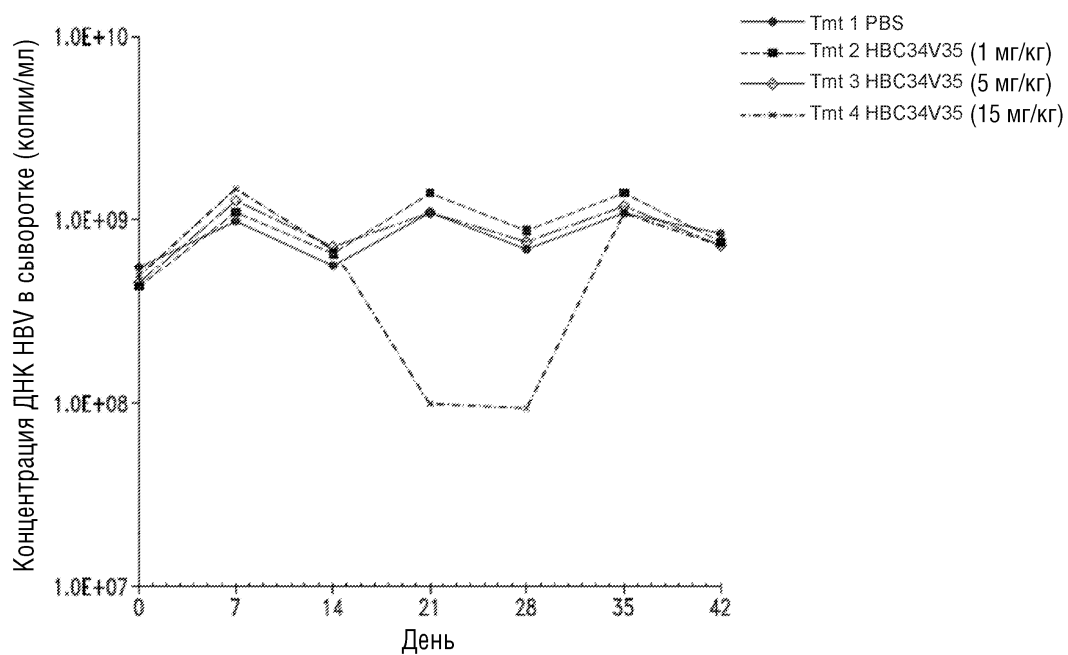
Антитело	HBsAg	HBeAg
	EC ₅₀ (нг/мл)	EC ₅₀ (нг/мл)
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	15.12 (13.81-16.56)	10.64 (10.63-10.66)
HBC34-V35-MLNS	16.56 (12.24-22.41)	10.49 (10.39-10.60)
HBC34-V35	14.47 (10.43-20.08)	13.61 (13.25-13.99)

Геометрическое среднее и интервалы (в скобках) величин EC₅₀, определенные в двух независимых экспериментах

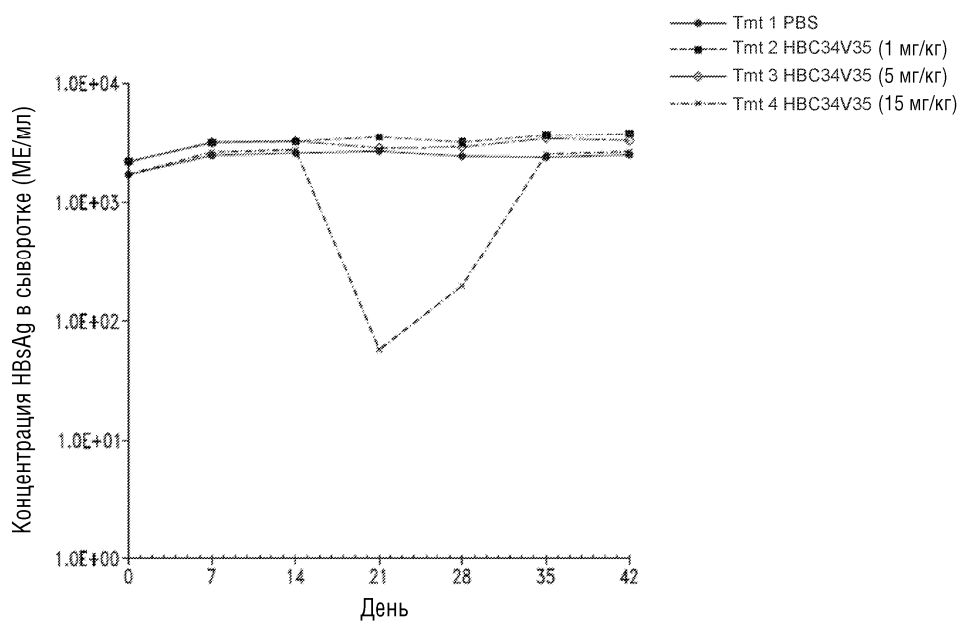
Фиг. 3V

Генотип	EC ₅₀ (нг/мл)
A	2.34
B	2.22
C	0.92
D	1.10
E	1.12
F	1.93
G	1.43
H	1.93

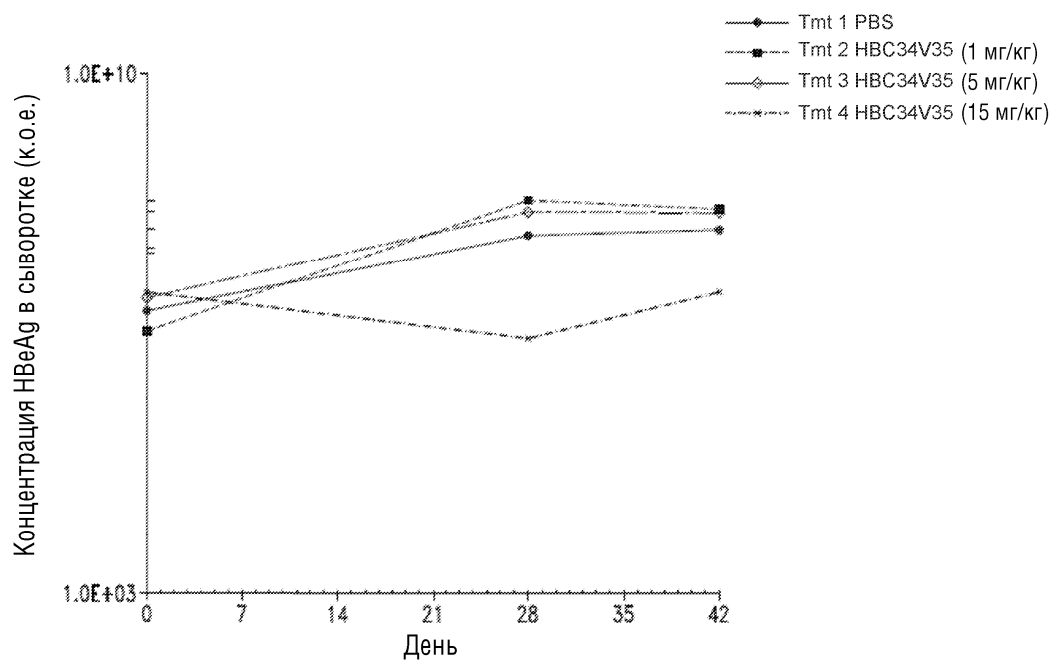
Фиг. 4



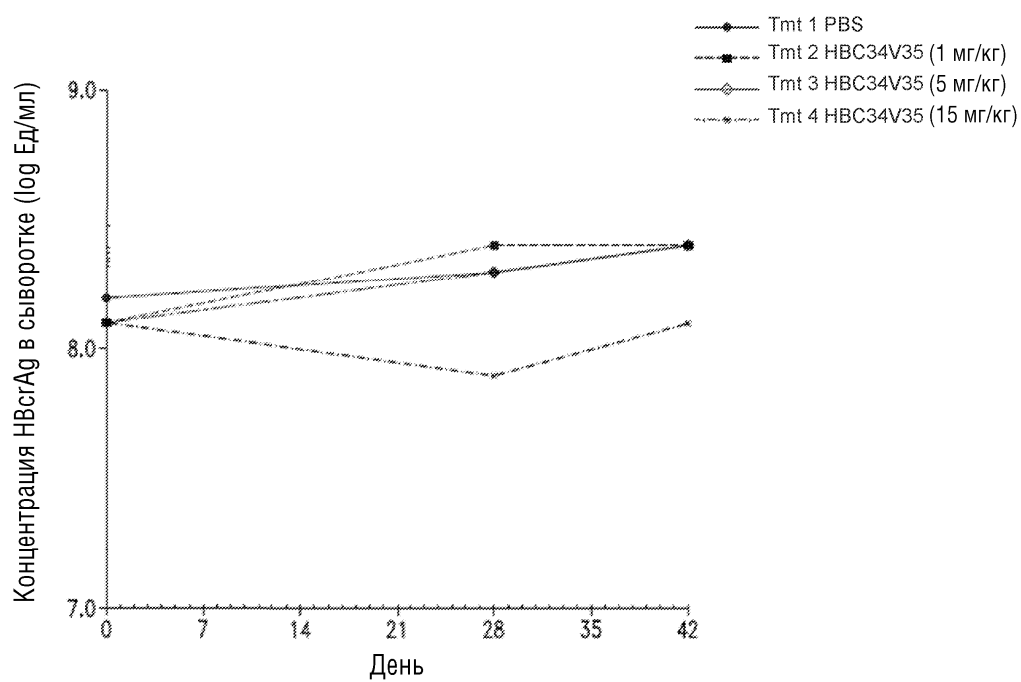
Фиг. 5



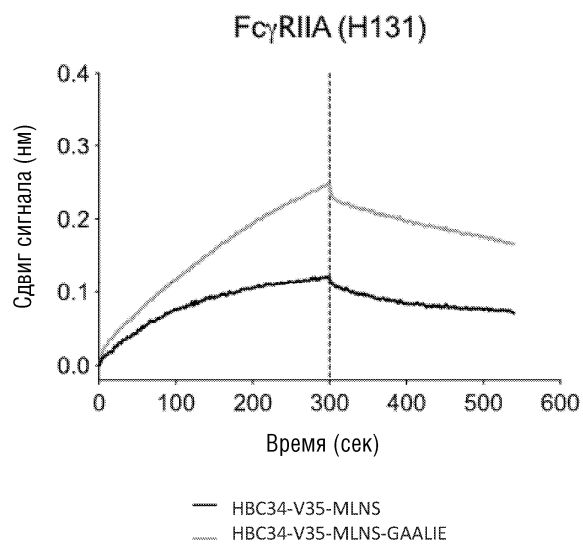
Фиг. 6



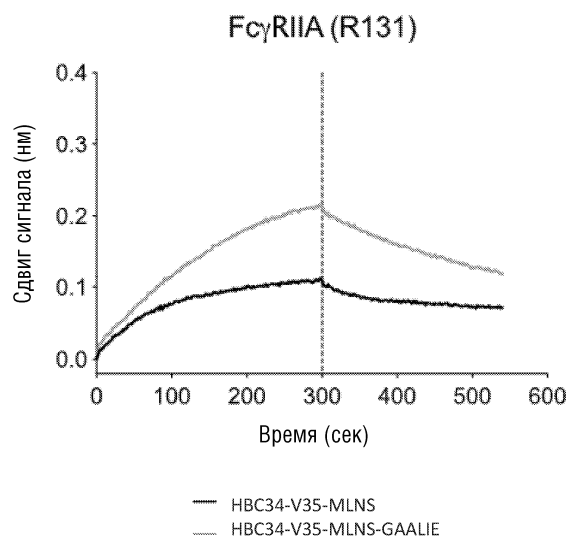
Фиг. 7



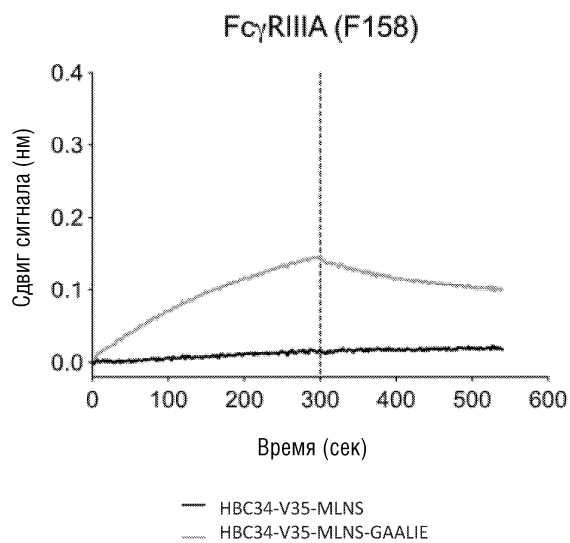
Фиг. 8



Фиг. 9А

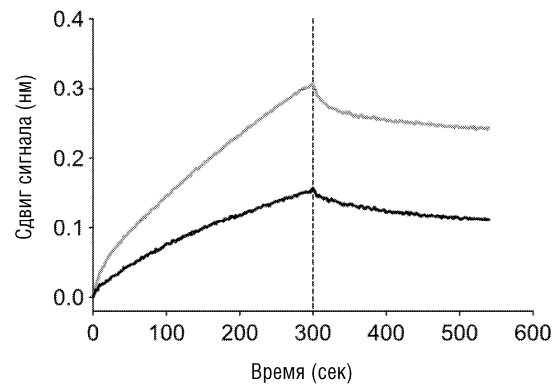


Фиг. 9В



Фиг. 9С

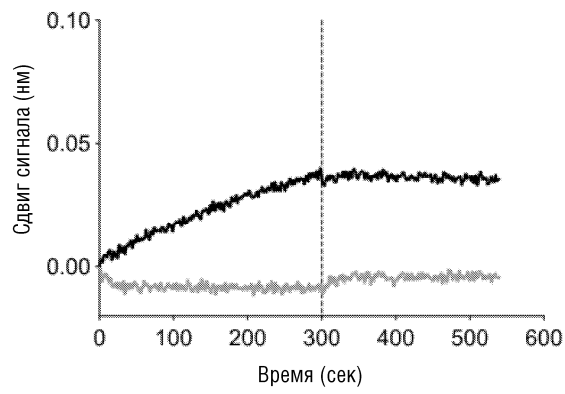
FcγRIIIA (V158)



— HVC34-V35-MLNS
— HVC34-V35-MLNS-GAALIE

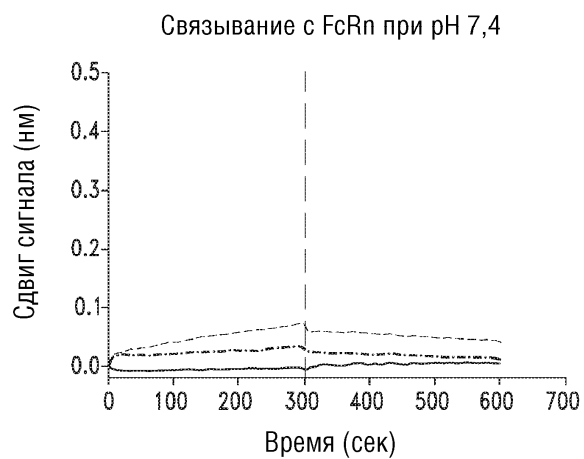
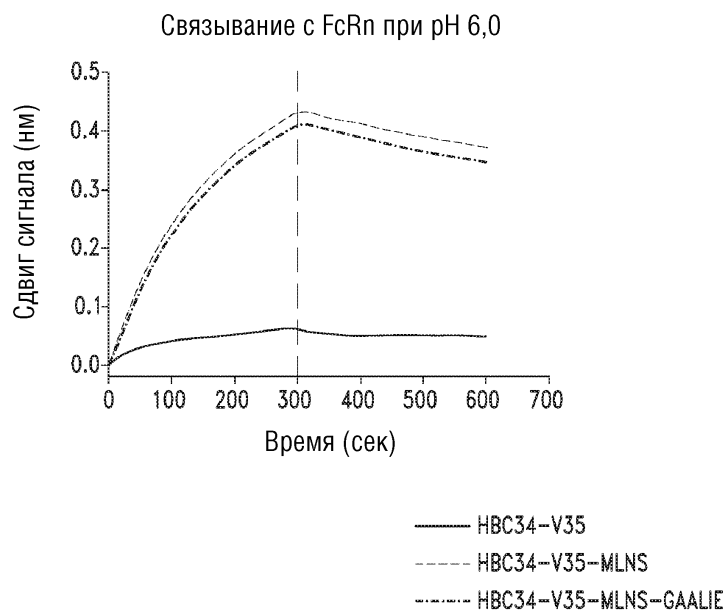
Фиг. 9D

FcγRIIB

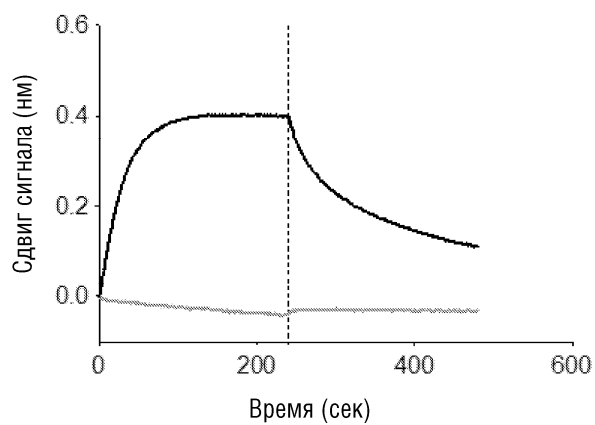


— HVC34-V35-MLNS
— HVC34-V35-MLNS-GAALIE

Фиг. 9E

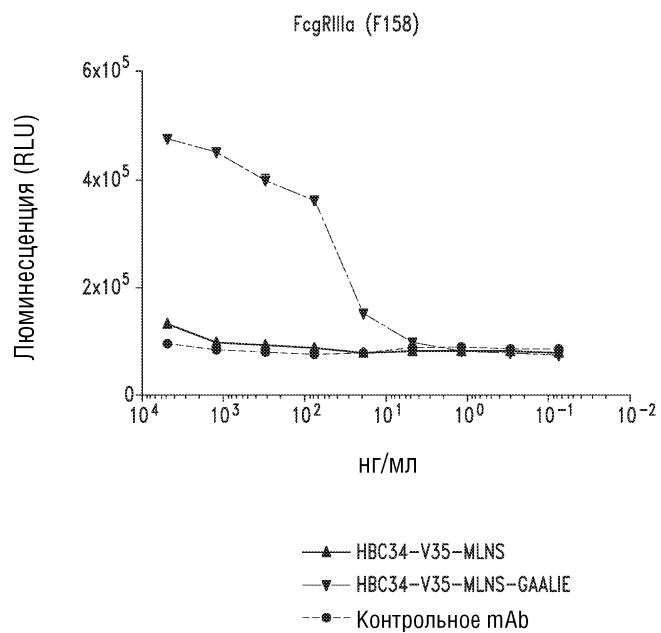


Фиг. 9F

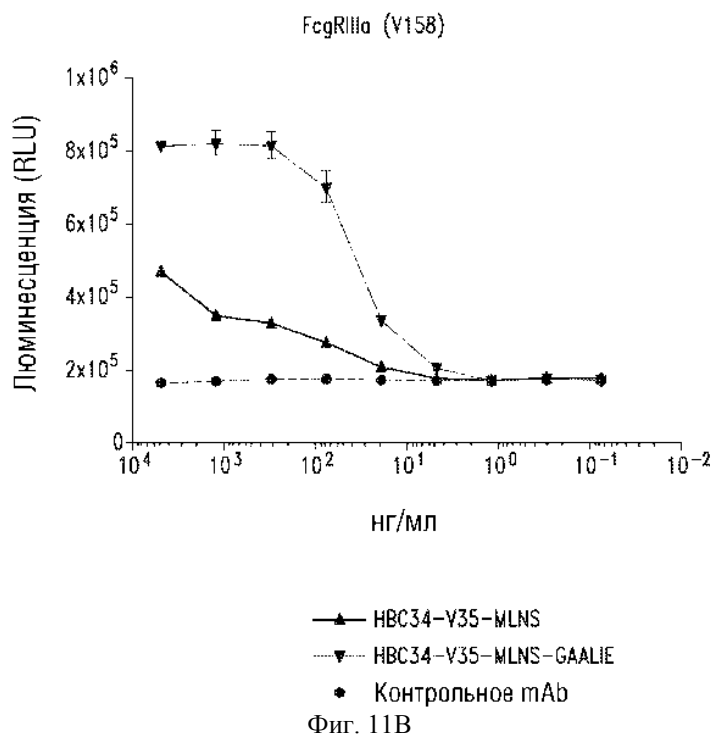


— HBC34-V35-MLNS
 - - - HBC34-V35-MLNS-GAALIE

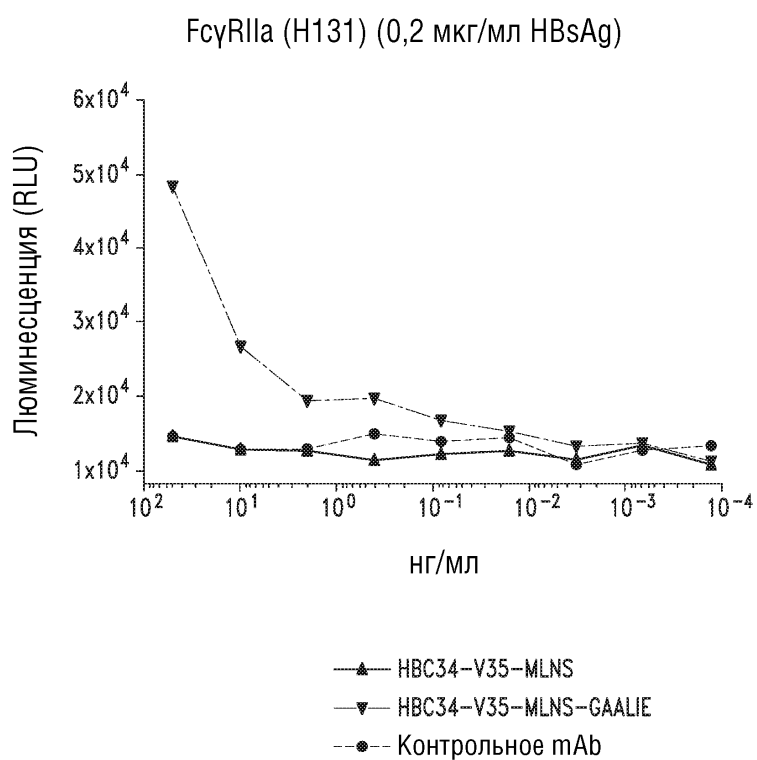
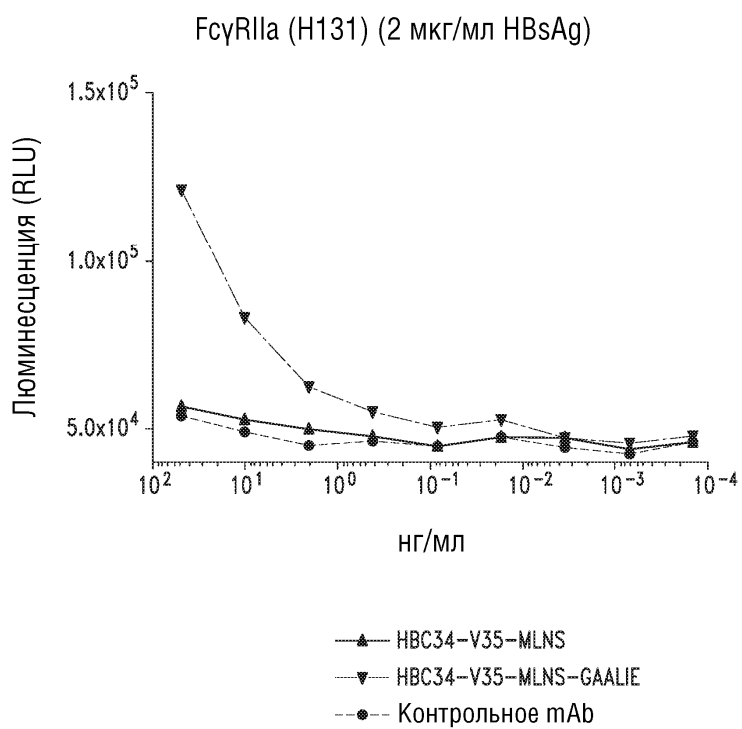
Фиг. 10

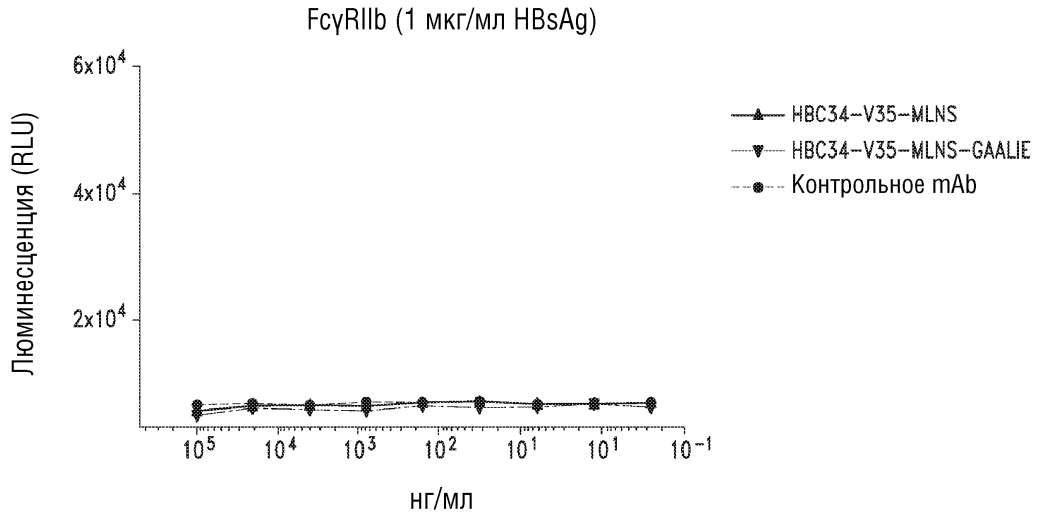


Фиг. 11А

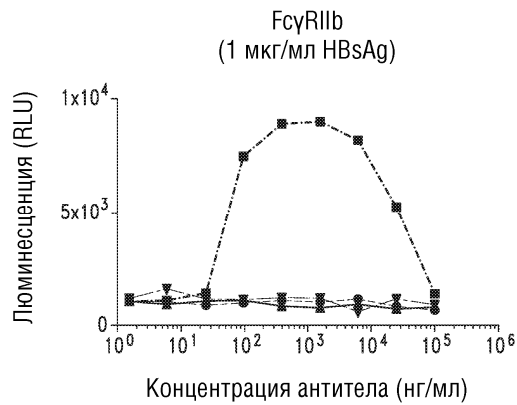
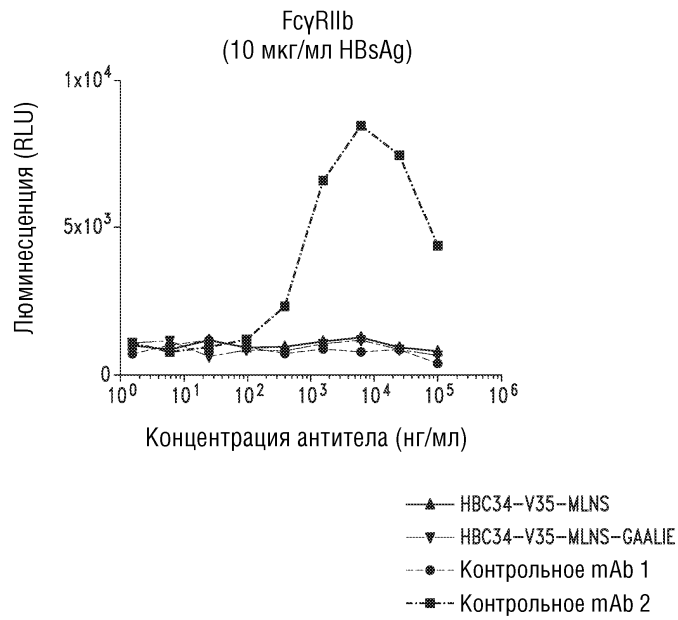


Фиг. 11В

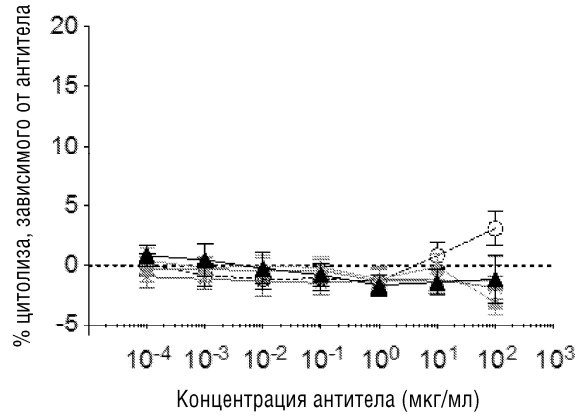




Фиг. 13А

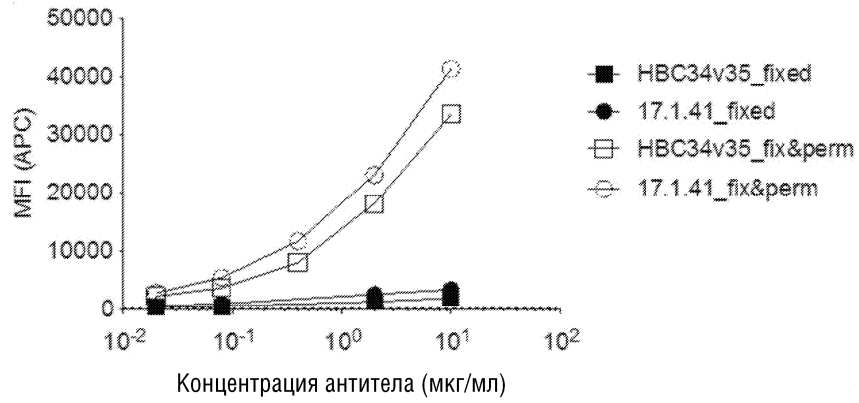


Фиг. 13В



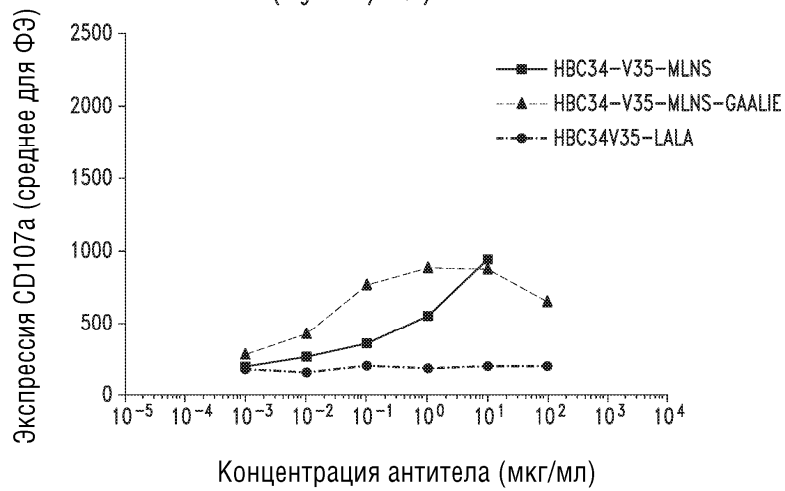
- ▲ HBC34V35-WT
- △ HBC34-V35-MLNS
- ▲ HBC34-V35-MLNS-GAALIE
- * 17.1.41
- Контрольное mAb

Фиг. 14А

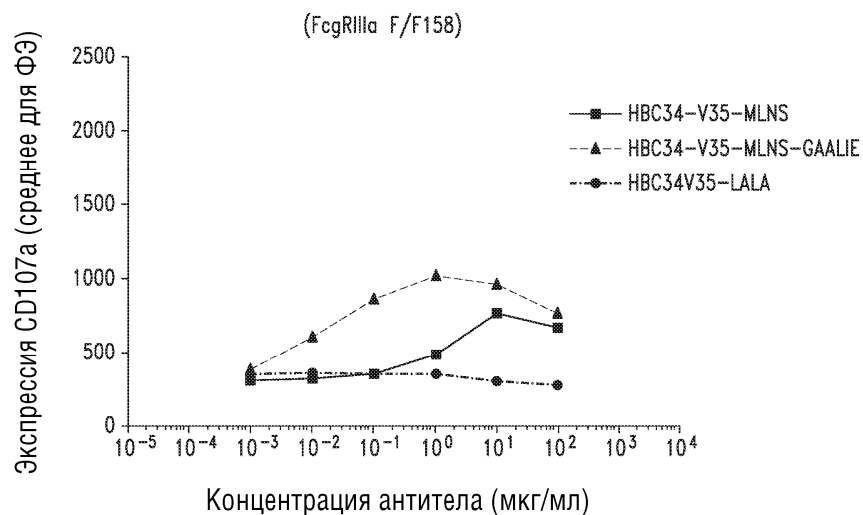


Фиг. 14В

(FcγRIIIa V/V158)



Фиг. 15А



Фиг. 15В

Анализ на синергию/антагонизм в случае HBC34-V35-MLNS-GAALIE в комбинации с ETV

Маркер	Синергия [мкМ 20/0] ^a	Антагонизм [мкМ 20/0] ^a	Смещение
HBsAg	4.22	-12.04	Аддитивный эффект
ДНК HBV	0.19	-20.28	Аддитивный эффект

^a Результаты представлены как среднее для терапевтических средств независимых экспериментов, в каждом из которых использовали n=3 планшета

Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2