



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.06

(21) Номер заявки
201890874

(22) Дата подачи заявки
2016.10.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/08** (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ ЭФФЕКТИВНО НЕЙТРАЛИЗУЮТ ВИРУС ГЕПАТИТА В, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PCT/EP2015/001970

(32) 2015.10.07

(33) EP

(43) 2018.11.30

(86) PCT/EP2016/074114

(87) WO 2017/060504 2017.04.13

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

(72) Изобретатель:
Корти Давиде (CH)

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) WO-A1-2006076640
WO-A1-9829442
WO-A1-9740164
WO-A1-2009069917

FOROUGH GOLSAZ SHIRAZI ET AL.: "Monoclonal antibodies to various epitopes of hepatitis B surface antigen inhibit hepatitis B virus infection", JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, vol. 29, no. 5, 21 April 2014 (2014-04-21), pages 1083-1091, XP055231723, AU, ISSN: 0815-9319, DOI: 10.1111/jgh.12483, abstract, page 1086, right-hand column, paragraph 3 - page 1087, left-hand column, paragraph 1; table 2

QIU X. ET AL.: "IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A C(K/R)TC MOTIF AS A COMMON EPITOPE PRESENT IN ALL SUBTYPES OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION

OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 156, no. 9, 1 May 1996 (1996-05-01), pages 3350-3356, XP002041204, ISSN: 0022-1767, abstract, page 3350, left-hand column, paragraph 1, page 3351, right-hand column, paragraph 1 - page 3353, right-hand column, paragraph 1; figures 4,5,6; table I, page 3353, right-hand column, paragraph 2 - page 3355, right-hand column, paragraph 1

C. SUREAU ET AL.: "Production of infectious hepatitis delta virus in vitro and neutralization with antibodies directed against hepatitis B virus pre-S antigens", Journal of Virology, 1 February 1992 (1992-02-01), pages 1241-1245, XP055229681, UNITED STATES, Retrieved from the Internet: URL: <http://jvi.asm.org/content/66/2/1241.full.pdf#page=1&view=FitH> [retrieved on 2015-11-19], abstract, page 1243, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2

HEINER WEDEMEYER ET AL.: "Update on the Management of HBV-HDV Coinfection", CURRENT HEPATITIS REPORTS, CURRENT SCIENCE INC, NEW YORK, vol. 11, no. 2, 25 March 2012 (2012-03-25), pages 95-101, XP035063834, ISSN: 1541-0706, DOI:10.1007/S11901-012-0129-3, the whole document

TRAGGIAI E. ET AL.: "An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 10, no. 8, 11 July 2004 (2004-07-11), pages 871-875, XP002385893, ISSN: 1078-8956, cited in the application, the whole document

WO-A1-2014032176

WO-A1-2015107126

ZUBKIN M. ET AL.: "76 Strategy of vaccination against HBV-infection in hemodialysis patients with "isolated" HBcAb", INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES, HAMILTON, CA, vol. 10, 1 January 2006 (2006-01-01), pages S42-S43, XP028032646, ISSN: 1201-9712, DOI: 10.1016/S1201-9712(06)80073-1 [retrieved on 2006-01-01], abstract

(57) В изобретении описаны антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с областью антигенной петли поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) и эффективно нейтрализуют инфицирование как вирусом гепатита В (HBV), так и вирусом гепатита дельта (HDV). Описаны также эпитопы, с которыми связываются антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также нуклеиновые кислоты, которые их кодируют, и клетки, которые продуцируют указанные антитела и фрагменты антител. Кроме того, в изобретении описано применение антител и фрагментов антител по настоящему изобретению для диагностики, профилактики и лечения гепатита В и гепатита D.

Настоящее изобретение относится к области антител против вируса гепатита В (HBV) и против вируса гепатита дельта (HDV), а также к их применению. В настоящем изобретении было установлено, что эффективные антитела против гепатита В по настоящему изобретению связываются с эпитопом, расположенным в антигенной петлевой области S домена поверхностных белков вируса гепатита В (HBsAg). Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют указанные антитела, а также к иммортализованным В-клеткам и культивированным плазматическим клеткам, которые продуцируют указанные антитела и их фрагменты. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению антител и фрагментов антител по настоящему изобретению в методах скрининга, а также при диагностике, профилактике и лечении заболеваний, прежде всего гепатита В и гепатита D.

Вирус гепатита В состоит из (i) поверхностной оболочки, содержащей три родственных поверхностных белка (поверхностный антиген гепатита В (HBsAg)) и липид, и (ii) икосаэдрического нуклеокапсида, включающего ДНК геном вируса и ДНК полимеразу. Капсид ВГВ образуется в цитозоле инфицированной клетки при упаковке репликационного комплекса РНК прегенома и приобретает способность развиваться в процессе синтеза ДНК генома вируса за счет обратной транскрипции прегенома в просвете частицы. Три белка поверхностной оболочки ВГВ: S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg, формируют комплексную трансмембранную складку, свернутую в области эндоплазматического ретикулума, и образуют связанные дисульфидными мостиками гомо- и гетеродимеры. В процессе развития у внутриклеточной мембраны короткий линейный домен в цитозольной пре-S области взаимодействует с участками связывания на поверхности капсида. Затем вирионы секретируются в кровь. Кроме того, поверхностные белки могут развиваться в отсутствие капсидов и образовывать субвирусные частицы (SVP), которые также секретируются в 3-4-кратном логарифмическом избытке по сравнению с вирионами. Высокий уровень HBsAg может ослаблять ответную реакцию HBsAg-специфичных Т-клеток и, как предполагают, является важным фактором для вирусной иммунологической толерантности у пациентов с хроническим гепатитом В (ХГВ) (Chisari F.V., Isogawa M., Wieland S.F., *Pathologie Biologie*, 58, p. 258-266 (2010)).

Вирус гепатита В вызывает потенциально опасные для жизни острые и хронические инфекции печени. Для острого гепатита В характерно наличие вирусемии, которая сопровождается или не сопровождается симптомами с риском развития скоротечного гепатита (Liang T.J., Block T.M., McMahon B.J., Ghany M.G., Urban S., Guo J.T., Locarnini S., Zoulim F., Chang K.M., Lok A.S., *Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure*, *Hepatology* (3 августа 2015), doi: 10.1002/hep.28025 (предварительная электронная публикация)). Несмотря на существование с 1982 г. эффективной вакцины против гепатита В, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 240 миллионов человек страдают от хронического инфекционного гепатита В и более 780000 человек умирает каждый год из-за осложнений гепатита В. Приблизительно у одной трети пациентов с диагнозом хронический гепатит В (ХГВ) развивается цирроз печени, печеночная недостаточность и гепатоклеточная карцинома, что является причиной 600000 летальных исходов в год (Liang T.J., Block T.M., McMahon B.J., Ghany M.G., Urban S., Guo J.T., Locarnini S., Zoulim F., Chang K.M., Lok A.S., *Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure*, *Hepatology* (3 августа 2015 г.), doi: 10.1002/hep.28025 (предварительная электронная публикация)).

Существующие в настоящее время способы лечения хронического гепатита В включают применение (пегилированного) интерферона-α (ИНФ-α или ПЭГ-ИНФ-α) и его нуклеозид(тид)ного аналога - Direct Acting Antiviral (DAA), который ингибирует ДНК полимеразу вируса гепатита В (ВГВ) ("ингибиторы полимеразы"). Ингибиторы полимеразы включают ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин и тенофовир. Ингибиторы полимеразы (ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир) подавляют функцию обратной транскриптазы ДНК полимеразы ВГВ и таким образом препятствуют синтезу вирусной ДНК из прегеномной РНК. Указанное лечение не предотвращает распространение вируса, образование ковалентнонепрерывной кольцевой ДНК (кнкДНК) и не влияет на высвобождение HBsAg. Более того, ингибиторы полимеразы ограничивают прогрессирование заболевания, но редко элиминируют вирус. В связи с этим после прекращения лечения в большинстве случаев наблюдается рецидив вирусного заболевания, и в связи с этим ингибиторы полимеразы необходимо принимать на протяжении всей жизни. Кроме того, после продолжительного лечения появляются резистентные к лекарственным средствам мутантные формы вируса. ПЭГ-ИНФ-α ингибирует ВГВ косвенным образом за счет иммуномодулирующих эффектов, а также ингибирует напрямую за счет снижения стабильных уровней транскриптов ВГВ (повышенное ацетилирование гистонов, связанных с кнкДНК). Однако эффективность ПЭГ-ИНФ-α ограничена, и он вызывает серьезные побочные эффекты.

В то время как ПЭГ-ИНФ-α является эффективным приблизительно для одной трети пациентов, проходящих лечение, ингибиторы полимеразы значительно снижают вирусную нагрузку у подавляющего большинства пациентов, проходящих лечение (Block T.M., Gish R., Guo H., Mehta A., Cuconati A., London W. Th., Guo J.T., *Chronic hepatitis B: What should be the goal for new therapies?* *Antiviral Research*, 98, p. 27-34 (2013)). Интерферон-α ассоциируют со многими отрицательными реакциями, и его не рекомендуется применять пациентам с прогрессирующим циррозом печени или с медицинскими/психиатрическими противопоказаниями (Liang T.J., Block T.M., McMahon B.J., Ghany M.G., Urban S., Guo J.T., Locarnini S., Zoulim F., Chang K.M., Lok A.S., *Present and future therapies of hepatitis B: From*

discovery to cure. *Hepatology* (3 августа 2015 г.), doi: 10.1002/hep.28025 (предварительная электронная публикация)). Хотя ингибиторы полимеразы, такие как энтекавир и тенофовир, по-видимому, характеризуются меньшим числом отрицательных побочных эффектов, эти лекарственные средства проявляют низкие скорости сероконверсии HBeAg и сниженный уровень HBsAg. Следовательно, большинству пациентов часто требуется лечение на протяжении всей жизни, что является дорогостоящим и связано с риском развития побочных реакций, резистентности к лекарственным средствам и нарушения назначенного курса лечения. В связи с этим существующее в настоящее время лечение хронического гепатита В все еще является недостаточно эффективным из-за различных ограничений, и его нельзя рассматривать в качестве средства для полного выздоровления. Следовательно, хотя лечение ВГВ в достаточной степени улучшено, пациентам с диагнозом ВГВ в большинстве случаев требуется лечение на протяжении всей жизни, а полное выздоровление все еще представляет собой сложную задачу (Liang T.J., Block T.M., McMahon B.J., Ghany M.G., Urban S., Guo J.T., Locarnini S., Zoulim F., Chang K.M., Lok A.S., Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure, *Hepatology* (3 августа 2015 г.), doi: 10.1002/hep.28025 (предварительная электронная публикация)). Максимально возможным конечным результатом лечения хронического гепатита В (ХГВ) и идеальным конечным параметром лечения может являться обеспечение снижения уровня поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), которое, однако, все еще не всегда эффективно обеспечивается существующими в настоящее время способами лечения хронического гепатита В (см. обзор Gish R.G. et al., *Antiviral Research*, 121, p. 47-58 (2015)).

Пациентам с диагнозом тяжелого декомпенсированного состояния ВГВ при наличии острого гепатита или гепатоклеточной карциномы показана ортотопическая трансплантация печени (ОТП). После ОТП при отсутствии профилактики частота рецидивов гепатита В составляет >80%, в то время как >90% реципиентов трансплантата можно клинически контролировать с использованием комбинированного лечения иммуноглобулином против гепатита В (HBIG) и его нуклозид(тид)ным аналогом. Иммуноглобулины против гепатита В (HBIG) представляют собой поликлональные очищенные иммуноглобулины, полученные у вакцинированных доноров. Однако продолжительное введение HBIG ассоциируют с некоторыми неразрешенными проблемами, включая ограниченную доступность и чрезвычайно высокую стоимость (Takaki A., Yasunaka T., Yagi T., Molecular mechanism to control post-transplantation hepatitis B recurrence, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 8, p. 17494-17513 (30 июля 2015 г.)). Кроме того, реципиенту требуется введение чрезвычайно высоких доз, а именно 10 г (содержащих 10000 МЕ на основе анализов связывания), внутривенным вливанием в ходе трансплантации. Затем 2 г вводят внутривенно ежедневно в течение 8 дней и затем каждые 1-3 месяца проводят вливания, чтобы поддерживать уровни анти-HBs в сыворотке выше 100 МЕ/мл. Как и в предыдущем случае, требуется лечение на протяжении всей жизни.

Еще более тяжелые осложнения наблюдаются, если происходит совместное инфицирование или супер инфицирование вирусом гепатита дельта (ВГ дельта). Согласно данным ВОЗ, во всем мире гепатитом D инфицировано приблизительно 15 миллионов человек. ВГ дельта рассматривается как субвирусный сателлит, так как он может распространяться только в присутствии ВГВ. ВГ дельта является одним из наиболее мелких вирусов животных (40 нм), при этом длина его гена составляет только 1,6 пар оснований, и он кодирует S и L HDAg. Все другие белки, необходимые для репликации генома ВГ дельта, включая РНК полимеразу, обеспечиваются клеткой хозяина, а поверхностная оболочка ВГ дельта обеспечивается ВГВ. Другими словами, ВГ дельта представляет собой дефектный вирус, для репликации которого требуется совместное инфицирование ВГВ, так как ВГ дельта использует белки поверхностной оболочки гепатита В (HBsAg) в качестве оболочки своего собственного вириона. При введении в пермиссивные клетки наблюдается репликация РНК генома ВГ дельта и ассоциация с множественными копиями белков, кодируемых ВГ дельта, и происходит сборка рибонуклеопротеидного (РНП) комплекса. РНП экспортируется из клетки белками поверхностной оболочки ВГВ, которые способны собирать липопротеиновые везикулы, которые разрастаются в просвете промежуточной полости Гольджи перед секрецией. Более того, белки поверхностной оболочки ВГВ также обеспечивают механизм направленного переноса ВГВ в неинфицированные клетки, таким образом, обеспечивая распространение ВГ дельта.

Осложнения, вызванные ВГ дельта, включают более высокую вероятность печеночной недостаточности при острых инфекциях и быстрое прогрессирование указанного состояния до цирроза печени с повышенным риском развития рака печени при хронических инфекциях. В сочетании с вирусом гепатита В гепатит D характеризуется наиболее высоким уровнем (около 20%) летальных исходов во всех случаях инфекций печени (Fattovich G., Giustina G., Christensen E., Pantalena M., Zagni E., Realdi G., Schalm S.W., Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B, *Gut*, 46, 3, p. 420-426 (март 2000)). Единственным одобренным методом лечения хронической инфекции ВГ дельта является применение интерферона-α. Однако лечение ВГ дельта интерфероном-α является относительно неэффективным, а также характеризуется низкой переносимостью. Лечение интерфероном-α вызывает устойчивый вирусологический ответ через шесть месяцев после лечения у одной четверти пациентов. Для лечения гепатита D также широко исследовали нуклеозид(тид)ные аналоги (НА), но они оказались неэффективными. Комбинированное лечение с использованием НА наряду с интерфероном также оказалось неэффективным, и в связи с этим существует необходимость в разработке новых терапевтиче-

ских вариантов лечения (Abbas Z., Abbas M., Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic Options, World J. Gastroenterol., 21, 32, p. 9461-9465 (28 августа 2015 г.)).

В связи с вышеизложенным объектом настоящего изобретения является получение продукта на основе антител, который способен нейтрализовать оба вируса: вирус гепатита В (ВГВ) и вирус гепатита дельта. Это позволяет усовершенствовать профилактику и лечение гепатита В. Более того, в настоящее время не существует лечения гепатита D, и в связи с этим объектом настоящего изобретения также является получение продукта на основе антител для профилактики и лечения гепатита D. Кроме того, объектом настоящего изобретения является получение продукта на основе антител, который способен обеспечить более эффективное лечение хронического гепатита В. С этой точки зрения предпочтительно, если один продукт на основе антител действует различными способами: (i) эффективно нейтрализует ВГВ, (ii) способствует клиренсу HBsAg и ВГВ, а также (iii) индуцирует сероконверсию, т.е. иммунный ответ на вирус. Более того, антитела могут также предпочтительно способствовать улучшенной презентации антигена, тем самым облегчая возобновление ответной реакции Т-клеток против ВГВ. Кроме того, объектом настоящего изобретения является получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с различными, предпочтительно со всеми известными генотипами поверхностного антигена вируса гепатита В, а также с различными, предпочтительно со всеми известными инфекционными мутантными формами поверхностного антигена вируса гепатита В. Подводя итог, объектом настоящего изобретения является получение усовершенствованных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, а также молекул родственных нуклеиновых кислот, векторов и клеток, а также фармацевтических композиций, которые позволяют исключить описанные выше недостатки предшествующего уровня техники.

Объект, лежащий в основе настоящего изобретения, определен сущностью настоящего изобретения, изложенной ниже и в прилагаемых пунктах формулы настоящего изобретения.

Ниже описаны элементы настоящего изобретения. Указанные элементы перечислены со ссылкой на конкретные варианты осуществления, однако следует понимать, что их можно комбинировать любым способом и любое число раз, чтобы получить дополнительные варианты осуществления. Указанное описание предоставлено для понимания настоящего изобретения и его объема, которые объединяют явным образом описанные варианты с любым числом изложенных и/или предпочтительных элементов. Кроме того, любые преобразования и комбинации всех элементов, описанных в настоящем документе, следует рассматривать изложенными в описании, если в контексте явным образом не указано иное.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном контексте, имеют общеизвестное специалисту в данной области техники значение.

В настоящем описании и в последующих пунктах формулы изобретения, если в контексте не указано иное, термин "включают" и варианты, такие как "включает" и "включающий", следует понимать как обозначающие включение указанного члена, целого числа или стадии, но без исключения любого другого не указанного члена, целого числа или стадии. Термин "состоит из" является отдельным вариантом термина "включает", при этом любой другой не указанный член, целое число или стадия исключены. В контексте настоящего изобретения термин "включает" включает термин "состоит из". Таким образом, термин "включающий" включает термин "содержащий", а также термин "состоящий", например, композиция, "включающая" X, может состоять исключительно из X или может включать дополнительный компонент, например X+Y.

Ссылку в единственном числе, использованную в контексте описания настоящего изобретения (прежде всего в контексте пунктов формулы изобретения), следует интерпретировать как включающую единственное и множественное число, если в контексте не указано иное или это явным образом не противоречит контексту. Перечисление в данном контексте диапазонов величин предназначено только для краткого обозначения ссылки на каждую отдельную величину, находящуюся в диапазоне. Если в контексте не указано иное, каждая индивидуальная величина включена в описание, как в случае ее индивидуального перечисления в данном контексте. Ни одну формулировку в описании не следует интерпретировать как указывающую на любой не заявленный элемент, существенный для практического осуществления настоящего изобретения.

Слово "в основном" не исключает "полностью", например "композиция, которая в основном не содержит Y", может полностью не содержать Y. При необходимости слово "в основном" можно исключить из определения настоящего изобретения.

Термин "приблизительно" в отношении численного значения x обозначает $x \pm 10\%$.

Использованный в данном контексте термин "заболевание" предназначен в основном для обозначения синонимов и используется взаимозаменяемо с терминами "нарушение" и "состояние" (в смысле состояния здоровья), поскольку все они отражают аномальное состояние организма человека или животного или одного из его отделов, при котором ухудшается нормальное функционирование, и которое, как правило, сопровождается отличительными признаками и симптомами, а также приводит к снижению продолжительности или качества жизни человека или животного.

Использованная в данном контексте ссылка на "лечение" субъекта или пациента включает предотвращение, профилактику, ослабление интенсивности симптомов, улучшение состояния и терапию. Тер-

мины "субъект" или "пациент" используются в данном контексте взаимозаменяемо для обозначения всех млекопитающих, включая человека. Примеры субъектов включают человека, крупный рогатый скот, собаку, кошек, лошадей, коз, овец, свиней и кроликов. В одном варианте пациентом является человек.

Использованные в данном контексте термины "пептид", "полипептид" и "белок", а также варианты указанных терминов относятся к молекуле, прежде всего к пептиду, олигопептиду, полипептиду или белку, включая гибридный белок, соответственно включающему по меньшей мере две аминокислоты, связанные друг с другом простой пептидной связью или модифицированной пептидной связью, такой как, например, в случаях изостерических пептидов. Например, пептид, полипептид или белок предпочтительно состоит из аминокислот, выбранных из 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, связанных друг с другом обычной пептидной связью ("классический" полипептид). Пептид, полипептид или белок может состоять из L-аминокислот и/или D-аминокислот. Прежде всего, термины "пептид", "полипептид", "белок" также включают "пептидомиметики", которые определяют как пептидные аналоги, содержащие непептидные структурные элементы, пептиды в составе которых способны имитировать биологическую активность или проявлять антагонистическую биологическую функцию(и) исходного природного пептида. Пептидомиметик не обладает классическими пептидными характеристиками, такими как расщепляемые ферментами пептидные связи. Прежде всего, пептид, полипептид или белок может включать аминокислоты, в отличие от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, в дополнение к указанным аминокислотам, или он может состоять из аминокислот, в отличие от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом. Прежде всего, в контексте настоящего изобретения пептид, полипептид или белок может в равной степени состоять из аминокислот, модифицированных в результате природных процессов, таких как процессы пост-трансплантационного созревания, или в результате химических процессов, которые известны специалисту в данной области техники. Указанные модификации исчерпывающим образом описаны в литературе. Указанные модификации могут происходить в любом участке полипептида: в основной пептидной цепи, в аминокислотной цепи или даже в С-или N-концевых участках. Прежде всего, после убиквитинирования может произойти разветвление или циклизация пептида или полипептида наряду или в отсутствие разветвления. Указанный тип модификации может происходить в результате природных или синтетических посттрансляционных процессов, которые известны специалисту в данной области. Термины "пептид", "полипептид", "белок" в контексте настоящего изобретения, прежде всего, также включают модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Например, модификации пептидов, полипептидов или белков могут включать ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозита, ковалентную или нековалентную сшивку, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, гликозилирование, включая пегилирование, гидроксилирование, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пре-нирование, рацемизацию, сенолоилирование, сульфирование, аминокислотное присоединение, такое как аргинилирование или убиквитинирование. Такие модификации подробно описаны в литературе (Proteins Structure and Molecular Properties, Creighton T.E., 2-е изд., Нью-Йорк (1993), Post-translational Covalent Modifications of Proteins, Johnson B.C. (ред.), Academic Press, Нью-Йорк (1983), Seifter et al., Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol., 182, p. 626-646 (1990) и Rattan et al., Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann. NY Acad. Sci., 663, p. 48-62 (1992)). Соответственно, термины "пептид", "полипептид", "белок" предпочтительно включают, например, липопептиды, липопротеины, гликопептиды, гликопротеины и т.п.

Использованный в данном контексте термин "полипептид" включает единичную цепь мономеров аминокислот, связанных пептидными связями, как описано выше. Использованный в данном контексте термин "белок" включает один или более, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (поли)пептидов, т.е. одну или более цепей мономеров аминокислот, связанных пептидными связями, как описано выше. Предпочтительно белок согласно настоящему изобретению включает 1, 2, 3 или 4 полипептида.

Использованный в данном контексте термин "рекомбинантный" (например, рекомбинантное антитело, рекомбинантный белок, рекомбинантная нуклеиновая кислота и т.п.) относится к любой молекуле (антитело, белок, нуклеиновая кислота и т.п.), которую получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, и которая не встречается в природе.

В данном контексте термины "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты" и "поли-нуклеотид" используются взаимозаменяемо и включают молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК.

В данном контексте термины "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо, и все указанные обозначения включают потомство. Таким образом, слова "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичные клетки субъекта и полученные из них культуры независимо от числа пересеваний. Следует также понимать, что вследствие преднамеренных или спонтанных мутаций не все потомство может быть точно идентичным по содержанию ДНК. В объем настоящего изобретения включено вариантное потомство, которое характеризуется одинаковой функци-

ей или биологической активностью по данным скрининга исходно трансформированной клетки. Если подразумеваются другие определения, это явным образом следует из контекста.

В данном контексте термины "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент" и "фрагмент антитела" используются взаимозаменяемо и относятся к любому фрагменту антитела по настоящему изобретению, который сохраняет антигенсвязывающую активность антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваясь только ими, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Кроме того, использованный в данном контексте термин "антитело" включает как антитело, так и их антигенсвязывающие фрагменты.

Использованный в данном контексте термин "нейтрализующее антитело" обозначает антитело, которое может нейтрализовать, т.е. предотвращать, ингибировать, уменьшать, затруднять или нарушать способность патогена инициировать инфекцию и/или способствовать ее распространению в организме хозяина. Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" используются в данном контексте взаимозаменяемо. Указанные антитела можно использовать в отдельности или в комбинации, в качестве профилактических или терапевтических агентов, исходя из соответствующего состава, наряду с активной вакцинацией, в качестве диагностического средства или в качестве средства продуцирования, как описано в данном контексте.

Дозы в большинстве случаев выражают в расчете на массу тела. Так, например, доза, которую выражают в виде (г, мг или другая единица)/кг (или г, мг и т.п.), обычно относится к (г, мг или другой единице) "на кг (или г, мг и т.п.) массы тела", даже если термин "масса тела" явным образом не упоминается.

Термины "связывающий" и "специфично связывающий" и аналогичная ссылка не включают неспецифическое прилипание.

Использованный в данном контексте термин "вакцина", как правило, понимают как профилактический или терапевтический материал, обеспечивающий по крайней мере один антиген, предпочтительно иммуноген. Антиген или иммуноген можно получить из любого материала, который пригоден для вакцинации. Например, антиген или иммуноген можно получить из патогена, например, из бактериальных или вирусных частиц и т.п., или из опухолевой или раковой ткани. Антиген или иммуноген стимулирует приобретенную иммунную систему организма, чтобы обеспечить приобретенный иммунный ответ. Прежде всего, термин "антиген" или "иммуноген", как правило, относится к соединению, которое может распознавать иммунная система, предпочтительно приобретенная иммунная система, и которое способно инициировать антигенспецифичный иммунный ответ, например, при формировании антител и/или антигенспецифических Т-клеток в качестве части приобретенного иммунного ответа. Как правило, антиген может представлять собой или может включать пептид или белок, который может быть презентирован с помощью главного комплекса гистосовместимости (МНС) на Т-клетках.

Использованный в данном контексте термин "вариант последовательности" относится к любой последовательности, содержащей одно или более изменений по сравнению с эталонной последовательностью, при этом эталонная последовательность представляет собой любую из последовательностей, перечисленных в "таблице последовательностей и их идентификационных номеров SEQ ID" (перечень последовательностей), т.е. последовательности от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 88. Таким образом, термин "вариант последовательности" включает варианты нуклеотидных последовательностей и варианты аминокислотных последовательностей. Для варианта последовательности в контексте нуклеотидной последовательности эталонной последовательностью также является нуклеотидная последовательность, в то время как для варианта последовательности в контексте аминокислотной последовательности эталонной последовательностью также является аминокислотная последовательность. Использованный в данном контексте термин "вариант последовательности" обозначает последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и прежде всего предпочтительно по меньшей мере на 98% или 99% идентична эталонной последовательности. Идентичность последовательности обычно рассчитывают в отношении полной эталонной последовательности (т.е. последовательность, перечисленная в настоящем документе). Процент идентичности, как указано в данном контексте, можно определить, например, с использованием компьютерного обеспечения Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), используя параметры по умолчанию, определенные в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), матрица Blosum 62, штраф за открытие гэпа = 11, а штраф за продление гэпа = 1).

Термин "вариант последовательности" в контексте нуклеотидной последовательности (нуклеиновой кислоты) содержит измененную последовательность, в которой один или более нуклеотидов эталонной последовательности удален или заменен или один или более нуклеотидов вставлены в эталонную нуклеотидную последовательность. Нуклеотиды обозначены в данном контексте стандартным однобуквенным кодом (A, C, G или T). Вследствие вырождения генетического кода "вариант последовательности" нуклеотидной последовательности может приводить в результате либо к изменению соответствующей эталонной аминокислотной последовательности, т.е. к образованию "варианта последовательности" аминокислоты, или не приводить к этому. Варианты последовательности нуклеотидов, которые не приводят к образованию вариантов аминокислотных последовательностей, являются предпочтительными (молча-

щие мутации). Однако варианты нуклеотидной последовательности, приводящие к "не молчащим" мутациям, также включены в объем настоящего изобретения, прежде всего такие варианты нуклеотидной последовательности, которые приводят к образованию аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и прежде всего предпочтительно по меньшей мере на 98 или 99% идентична эталонной аминокислотной последовательности.

Термин "вариант последовательности", использованный в контексте аминокислотной последовательности, относится к измененной последовательности, в которой одна или более аминокислот удалена, заменена или вставлена по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью. В результате изменений такой вариант последовательности содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и прежде всего предпочтительно по меньшей мере на 98 или 99% идентична эталонной аминокислотной последовательности. Например, вариант последовательности, который содержит не более 10 изменений на 100 аминокислот эталонной последовательности, т.е. содержит любую комбинацию делеций, вставок или замен, характеризуется идентичностью, которая составляет "по мере 90%" по отношению к эталонной последовательности.

Несмотря на возможность замен неконсервативных аминокислот, предпочтительными являются замены консервативных аминокислот, когда замененная аминокислота характеризуется аналогичной структурой или химическими свойствами по сравнению с соответствующей аминокислотой в эталонной последовательности. Например, замены консервативных аминокислот включают замену одной алифатической или гидрофобной аминокислоты, например аланина, валина, лейцина и изолейцина, на другую, замену одной гидроксилсодержащей аминокислоты, например серина и треонина, на другую, замену одного кислотного остатка, например, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, на другой, замену одного амидного остатка, например, аспарагина и глутамина, на другой, замену одного ароматического остатка, например фенилаланина и тирозина, на другой, замену одного основного остатка, например, лизина, аргинина и гистидина, на другой, а также замену одной аминокислоты с малой боковой цепью, например, аланина, серина, треонина, метионина и глицина, на другую.

Вставки аминокислотной последовательности включают N- и/или C-концевую гибридизацию, при этом длина цепи изменяется на величину от одного пептидного остатка до полипептидов, содержащих 100 или более остатков, а также вставки в середине последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают гибридизацию по N- или C-концевым фрагментам аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

Важно отметить, что изменения в вариантах последовательностей не нарушают функциональную способность соответствующей эталонной последовательности, например, в данном случае функциональную способность последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с одним и тем же эпитопом и/или в достаточной степени нейтрализовать инфекцию ВГВ и ВГ дельта. Инструкции по определению нуклеотидных и, соответственно, аминокислотных остатков, которые можно заменять, вставлять или удалять, не нарушая указанную функциональную способность, можно найти с помощью компьютерных программ, известных в данной области техники.

Использованный в данном контексте термин последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, "полученная из" указанной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, относится к источнику нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретной последовательности, характеризуется аминокислотной последовательностью, которая в значительной степени идентична последовательности или ее части, из которой она получена, при этом выражение "в значительной степени идентична" включает варианты последовательности, как определено выше. Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного пептида или белка, получена из соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. При этом термин "соответствующий" относится, прежде всего, к одинаковой функциональной способности. Например, "внеклеточный домен" соответствует другому "внеклеточному домену" (другого белка) или "трансмембранный домен" соответствует другому "трансмембранному домену" (другого белка). Таким образом, специалист в данной области техники может идентифицировать "соответствующие" части пептидов, белков и нуклеиновых кислот. Аналогичным образом специалист в данной области техники обычно может идентифицировать последовательности, "полученные из" другой последовательности, на основе ее источника.

Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентична исходной нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (из которого она получена). Однако последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может также содержать одну или более мутаций по сравнению с исходной нуклеиновой кислотой, пептидом, полипептидом или белком (из которого она получена), прежде всего последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная по-

следовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может представлять собой описанный выше функциональный вариант последовательности исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которого она получена). Например, один или более аминокислотных остатков в пептиде/белке можно заменить на другие аминокислотные остатки или можно вставить или удалить один или более аминокислотных остатков.

Использованный в данном контексте термин "мутация" относится к изменению последовательности нуклеиновой кислоты и/или последовательности аминокислоты по сравнению с эталонной последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью. Мутация, например, по сравнению с геномной последовательностью может представлять собой, например, соматическую мутацию (природного происхождения), спонтанную мутацию, индуцированную мутацию, например, индуцированную ферментами, химическими веществами или радиацией, или мутацию, полученную сайт-направленным мутагенезом (методы молекулярной биологии для получения специфических и преднамеренных изменений в последовательности нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотной последовательности). В связи с этим термины "мутация" или "мутирование" следует понимать как включающие также физическое осуществление мутации, например, в последовательности нуклеиновой кислоты или в аминокислотной последовательности. Мутация включает замену, делецию и вставку одного или более нуклеотидных или аминокислотных остатков, а также перестановку нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Для включения мутации в последовательность аминокислоты, мутацию предпочтительно можно осуществлять в нуклеотидной последовательности, кодирующей указанную аминокислотную последовательность, чтобы экспрессировать мутантный (рекомбинантный) полипептид. Мутацию можно осуществлять, например, при изменении, например, путем сайт-направленного мутагенеза, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислоту, при этом получают кодон, кодирующий другую аминокислоту, или при синтезе варианта последовательности, например, на основе известной нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, и разрабатывая синтез молекулы нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида, без необходимости осуществления мутации одного или более нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение, помимо других объектов, основано на открытии и выделении антител, которые являются высокоэффективными для нейтрализации вирусов гепатита В и гепатита D, а также на определении эпитопов, с которыми связываются антитела по настоящему изобретению. Указанные антитела являются предпочтительными, так как для нейтрализации вируса гепатита В требуются лишь незначительные количества антител. Более того, в настоящее время не существует методов лечения гепатита D. Антитела по настоящему изобретению являются высокоэффективными для профилактики, а также для лечения или ослабления интенсивности симптомов ВГВ и ВГ дельта. Кроме того, антитела по настоящему изобретению связываются с различными, предпочтительно со всеми известными, генотипами поверхностного антигена вируса гепатита В, а также с различными, предпочтительно со всеми известными, инфекционными мутантными формами поверхностного антигена вируса гепатита В.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

В первом объекте настоящего изобретения предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вируса гепатита В и вируса гепатита D.

Использованный в данном контексте термин "антитело" включает различные формы антител, включая, но не ограничиваясь только ими, полные антитела, фрагменты антител, прежде всего антигенсвязывающие фрагменты, антитела человека, химерные антитела, гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела и генетически сконструированные антитела (вариантные или мутантные антитела) при условии, что сохраняются характерные свойства согласно настоящему изобретению. Антитела человека и моноклональные антитела являются предпочтительными, при этом прежде всего предпочтительными являются моноклональные антитела человека, прежде всего в качестве рекомбинантных моноклональных антител человека.

Антитела человека широко известны в данной области техники (van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5, p. 368-374 (2001)). Антитела человека можно также продуцировать в трансгенных животных (например, мыши), которые способны при иммунизации продуцировать весь набор или отдельную часть антител человека в отсутствие эндогенного продуцирования иммуноглобулина. Перенос генетического чипа иммуноглобулина зародышевой линии человека В-клетки зародышевой линии таких мутантных мышей вызывает при антигенной стимуляции продуцирование антител человека (см., например, Jakobovits A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, США, 90, p. 2551-2555 (1993), Jakobovits A. et al., *Nature*, 362, p. 255-258 (1993), Bruggemann M. et al., *Year Immunol.*, 7, с 3340 (1993)). Антитела человека можно также продуцировать в библиотеках фагового дисплея (Hoogenboom H.R. и Winter G., *J. Mol. Biol.*, 227, p. 381-388 (1992), Marks J.D. et al., *J. Mol. Biol.*, 222, p. 581-597 (1991)). Для получения моноклональных антител человека пригодны также методики, описанные в статьях Cole и др. и Boerner и др. (статья Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) и статья Boerner P. et al., *J. Immunol.*, 147, p. 86-95 (1991)). Предпочтительно моноклональные антитела человека

получают с использованием усовершенствованной иммортализации В-клеток вируса Эпштейна-Барра (ВЭБ), как описано в статье Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A., An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus, *Nat. Med.*, 10, 8, p. 871-875 (2004). Используемый в данном контексте термин "антитело человека" также включает антитела, модифицированные, например, в варибельной области для придания свойств согласно настоящему изобретению, как описано в данном контексте. Используемый в данном контексте термин "варибельная область" (варибельная область легкой цепи (VL), варибельная область тяжелой цепи (VH)) обозначает каждую пару легкой и тяжелой цепей, которая напрямую принимает участие в связывании антитела с антигеном.

Настоящее изобретение включает антитела любого изотипа (например, IgA, IgG, IgM, т.е. α -, γ - или μ -тяжелая цепь), но предпочтительно антитело представляет собой IgG. В пределах изотипа IgG антитела могут представлять собой IgG подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, причем предпочтительным является IgG1. Антитела по настоящему изобретению могут содержать κ - или λ -легкую цепь. HBsAg-специфичные антитела типа IgG могут преимущественно также блокировать высвобождение ВГВ и HBsAg из инфицированных клеток, что основано на антиген-независимом захвате IgG через рецепторы FcRN-IgG в гепатоциты. В связи с этим HBsAg-специфичные антитела типа IgG могут связываться внутри клеток и тем самым блокировать высвобождение вирионов ВГВ и HBsAg.

Предпочтительно антителом по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом является очищенное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

Таким образом, антитела по настоящему изобретению предпочтительно могут представлять собой антитела человека, моноклональные антитела, моноклональные антитела человека, рекомбинантные антитела или очищенные антитела. В настоящем изобретении также предлагаются фрагменты антител по настоящему изобретению, прежде всего фрагменты, которые сохраняют антигенсвязывающую активность антител. Указанные фрагменты включают, но не ограничиваясь только ими, одноцепочечные антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Хотя настоящее описание, включая пункты формулы изобретения, может в некоторых случаях относиться явным образом к антигенсвязывающему фрагменту(ам), фрагменту(ам) антител, варианту(ам) и/или производному(ым) антител, следует понимать, что термин "антитело" или "антитело по настоящему изобретению" включает все категории антител, а именно, антигенсвязывающий фрагмент(ы), фрагмент(ы) антител, вариант(ы) и производное(ые) антител.

Фрагменты антител по настоящему изобретению можно получить из антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей при химическом восстановлении. В другом варианте, фрагменты антител можно получить клонированием и экспрессией части последовательностей тяжелой или легкой цепей. "Фрагменты" антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты. Настоящее изобретение также включает одноцепочечные Fv фрагменты (scFv), полученные из тяжелой и легкой цепей антитела по настоящему изобретению. Например, настоящее изобретение включает scFv фрагмент, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) из антитела по настоящему изобретению. Включены также мономеры и димеры тяжелой или легкой цепей, однодоменные антитела, состоящие из тяжелых цепей, а также однодоменные антитела, состоящие из легких цепей, одноцепочечные антитела, например, одноцепочечное антитело Fv, в котором варибельные области тяжелой и легкой цепей присоединены через пептидный линкер.

Фрагменты антител по настоящему изобретению могут придавать способность к моновалентным или мультивалентным взаимодействиям и содержаться в различных структурах, как описано выше. Например, для создания трехвалентного "триатела" или тетравалентного "тетратела" можно синтезировать молекулы scFv. Молекулы scFv могут включать домен Fc области, что приводит к получению двухвалентных мини-тел. Кроме того, последовательности по настоящему изобретению могут являться компонентом мультиспецифичных молекул, в которых последовательности по настоящему изобретению направленно связываются с эпитопами по настоящему изобретению, а другие области молекул связываются с другими мишенями.

Примеры молекул включают, но не ограничиваясь только ими, биспецифические Fab₂, триспецифические Fab₃, биспецифические scFv и диатела (Holliger и Hudson, *Nature Biotechnology*, 9, p. 1126-1136 (2005)).

Антитела по настоящему изобретению можно получить в очищенной форме. Как правило, антитело присутствует в композиции, которая в основном не содержит другие полипептиды, например другие полипептиды составляют менее 90 мас.%, как правило, менее 60 мас.% и более типично менее 50 мас.% композиции.

Антитела по настоящему изобретению могут проявлять иммуногенность в организме человека и/или в организме хозяина, не относящегося к человеку (или гетерологичного), например, в организме мышей. Например, антитела могут содержать идиотоп, который проявляет иммуногенность в организме хозяина, не относящегося к человеку, но не в организме человека. Антитела по настоящему изобретению, предназначенные для применения при лечении человека, включают такие антитела, которые нельзя вы-

делить простым способом из организмов хозяина, такого как мыши, козы, кролики, крысы, млекопитающие, не относящиеся к отряду приматов, и т.п., и которые обычно нельзя получить гуманизацией или из ксено-мыши.

Согласно настоящему изобретению антитело и его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg. Поверхностная оболочка вируса гепатита В содержит три "белка поверхностной оболочки ВГВ" (также известные как "HBsAg", "поверхностный антиген гепатита В"): S белок ("малый", также известен как S-HBsAg), М белок ("средний", также известен как М-HBsAg) и L белок ("крупный", также известен как L-HBsAg). S-HBsAg, М-HBsAg и L-HBsAg характеризуются одинаковым С-концевым фрагментом (также известен как "S домен", содержащий 226 аминокислоты), который соответствует S белку (S-HBsAg) и который играет основную роль для сборки и инфекционности вируса. S-HBsAg, М-HBsAg и L-HBsAg синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), собираются и секретируются в виде частиц через комплекс Гольджи. S домен включает четыре предсказанных трансмембранных домена (ТМ), при этом оба N-концевых участка, а также С-концевой участок S домена экспонированы в просвет частицы. Оба трансмембранных домена ТМ1 и ТМ2 необходимы для ко-трансляционной интеграции белка в мембране ЭР, при этом трансмембранные домены ТМ3 и ТМ4 расположены в С-концевом фрагменте третьего S домена. "Область антигенной петли" HBsAg расположена между предсказанными трансмембранными доменами ТМ3 и ТМ4 в составе S домена HBsAg, при этом область антигенной петли содержит аминокислоты 101-172 S домена, который включает в целом 226 аминокислоты (Salisse J. и Sureau C., Journal of Virology, 83, p. 9321-9328 (2009)). Важно отметить, что детерминанта инфекционности остается в антигенной петлевой области белков поверхностной оболочки ВГВ. Прежде всего остатки, расположенные между положениями 119 и 125 в HBsAg, содержат СХХС, который, как установлено, является наиболее важной последовательностью, требуемой для инфекционности вирусов ВГВ и ВГ дельта (Jaoude G.A., Sureau C., Journal of Virology; 79, p. 10460-10466 (2005)). При ссылке в данном контексте на положения в аминокислотной последовательности S домена HBsAg, ссылка указывает на аминокислотную последовательность, показанную на SEQ ID NO: 3 (см. ниже), или на ее природные или искусственные варианты.

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQN
 SQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMLRRFIHFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPL
IPGSSTTSTGPCRTCMTTAOGTSMYPSCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWE
WASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIVMMWYWGPSLYLSLSPFLPLLPI
 FFCLWVYI

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

Например, выражение "аминокислоты 101-172 S домена" относится к аминокислотным остаткам, расположенным в положениях 101-172 полипептида согласно SEQ ID NO: 3. Однако специалисту в данной области техники представляется очевидным, что в аминокислотной последовательности S домена HBsAg естественным образом могут возникать мутации или варианты (включая, но не ограничиваясь только ими, замену, делецию и/или вставку, например различные генотипы HBsAg или различные мутантные формы HBsAg, как описано в данном контексте) или их можно включать искусственным способом в аминокислотную последовательность S домена HBsAg, не оказывая влияния на его биологические свойства. В связи с этим в настоящем изобретении термин "S домен HBsAg" включает все указанные полипептиды, например включая полипептид согласно SEQ ID NO: 3 и его природные или искусственные мутантные формы. Кроме того, если в данном контексте описаны фрагменты последовательности S домена HBsAg (например, аминокислоты 101-172 или аминокислоты 120-130 S домена HBsAg), они включают не только соответствующие фрагменты последовательности SEQ ID NO: 3, но также и соответствующие фрагменты ее природных или искусственных мутантных форм. Например, "аминокислотные остатки, расположенные в положениях 101-172 S домена HBsAg" включают аминокислотные остатки, расположенные в положениях 101-172 последовательности SEQ ID NO: 3, а также соответствующие фрагменты ее мутантных форм (природных или искусственных мутантных форм). Согласно настоящему изобретению выражение "соответствующие фрагменты последовательности" или "соответствующие фрагменты" относятся к фрагментам, которые расположены в эквивалентных положениях последовательностей, которые выравнивают оптимальным образом, а именно, для получения максимального процента идентичности.

М белок (М-HBsAg) соответствует S белку, удлинённому по N-концевому домену на 55 аминокислотных остатков, называемому "пре-S2". L белок (L-HBsAg) соответствует М белку, удлинённому в N-концевом домене на 108 аминокислотных остатков, называемому "пре-S1" (генотип D). Пре-S1 и пре-S2 домены L белка могут присутствовать либо на внутренней стороне вирусных частиц (на цитоплазматической стороне ЭР), играя основную роль в сборке вируса, либо на внешней стороне (на стороне просвета ЭР), доступные для взаимодействия с клетками-мишенями и необходимые для вирусной инфекционности. Более того, поверхностные белки ВГВ (HBsAg) не только включены в поверхностные оболочки вирионов, но также и спонтанно распространяются из мембран промежуточных отделов ЭР-Гольджи, образуя пустые "субвирусные частицы" (SVP), которые высвобождаются из клетки при секреции.

Поскольку все три белка поверхностной оболочки ВГВ: S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg, содержат S домен, все три белка поверхностной оболочки ВГВ: S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg, содержат также "антигенную петлевую область". Соответственно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, которые нейтрализуют ВГВ и связываются с областью антигенной петли HBsAg, связываются со всеми тремя белками поверхностной оболочки ВГВ: S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению нейтрализует инфекцию вируса гепатита В и инфекцию вируса гепатита D. Другими словами, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению снижает инфекционность вируса гепатита В и вируса гепатита D.

Специалисту в данной области техники известны различные стандартные методы "анализа на нейтрализацию" для изучения и количественного определения инфекционности вируса (или "нейтрализации") в лабораторных условиях. В ходе анализа на нейтрализацию вирусы животных, как правило, размножают В-клетках и/или клеточных линиях. В контексте настоящего изобретения анализ на нейтрализацию является предпочтительным, при этом культивированные клетки инкубируют в присутствии фиксированного количества ВГВ или ВГ дельта в присутствии (или в отсутствие) исследуемого антитела. В качестве считываемой информации можно использовать уровни поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) или антигена е гепатита В (HBeAg), секретируемых в супернатант клеточной культуры, и/или можно использовать окрашивание HBsAg. Например, в случае ВГ дельта можно использовать иммунофлуоресцентное окрашивание дельта антигена.

В предпочтительном варианте анализа на нейтрализацию ВГВ культивированные клетки, например клетки HepaRG, прежде всего дифференцированные клетки HepaRG, инкубируют в присутствии фиксированного количества ВГВ в присутствии или в отсутствие исследуемого антитела, например, в течение 16 ч при 37°C. Указанную инкубацию предпочтительно проводят в среде (например, дополненной 4% ПЭГ 8000). После инкубации клетки можно промывать и затем культивировать. Для измерения инфекционности вируса можно определять уровни поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) и антигена е гепатита В (HBeAg), секретируемых в культуральный супернатант, например, в дни 7-11 после инфицирования методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Кроме того, можно использовать окрашивание HBeAg методом иммунофлуоресцентного анализа. В предпочтительном варианте анализа на нейтрализацию ВГ дельта можно использовать тот же метод анализа, как и для ВГВ, с тем различием, что сыворотки от носителей ВГ дельта можно использовать в качестве посевного материала инфекционного вируса ВГ дельта на дифференцированных клетках HepaRG (вместо ВГВ). Для детектирования в качестве считываемой информации можно использовать иммунофлуоресцентное окрашивание дельта антигена.

Антитело и антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению проявляют высокую нейтрализующую активность. Концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для 50% нейтрализации вируса гепатита В (ВГВ) и вируса гепатита дельта (ВГ дельта), составляет, например, приблизительно 10 мкг/мл или менее. Предпочтительно концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для 50% нейтрализации ВГВ и ВГ дельта, составляет приблизительно 5 мкг/мл, более предпочтительно концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для 50% нейтрализации ВГВ и ВГ дельта, составляет приблизительно 1 мкг/мл, еще более предпочтительно концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для 50% нейтрализации ВГВ и ВГ дельта, составляет приблизительно 750 нг/мл. Наиболее предпочтительно концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для 50% нейтрализации ВГВ и ВГ дельта, составляет 500 нг/мл или менее, например 450, 400, 350, 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60 нг/мл или приблизительно 50 нг/мл или менее. Указанное означает, что для 50% нейтрализации ВГВ и ВГ дельта необходимы лишь чрезвычайно низкие концентрации антитела. Специфичность и эффективность можно измерять с использованием стандартных методов анализа, известных специалисту в данной области техники.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, которое эффективно нейтрализует оба вируса - ВГВ и ВГ дельта, можно использовать для предотвращения и лечения гепатита В и гепатита D. В данном контексте следует отметить, что инфицирование ВГ дельта, как правило, происходит одновременно или после инфицирования ВГВ (инокуляция ВГ дельта в отсутствие ВГВ не приводит к развитию гепатита D, так как для репликации ВГ дельта необходимо наличие ВГВ), и гепатит D, как правило, наблюдается у носителей хронического ВГВ.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению ускоряет клиренс HBsAg и ВГВ. Прежде всего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению ускоряют клиренс как ВГВ, так и субвирусных частиц вируса гепатита В (SVP). Клиренс HBsAg или субвирусных частиц можно оценивать при измерении уровня HBsAg, например, в образце крови, например, взятой у пациента с диагнозом гепатит В. Аналогичным образом, клиренс ВГ дельта можно оценивать при измерении уровня ВГВ, например, в образце крови, например, взятой у пациента с диагнозом гепатит В.

В сыворотках пациентов, инфицированных ВГВ, кроме инфекционных частиц (ВГВ), как правило,

присутствует избыток (как правило, от 1000- до 100000-кратного) пустых субвирусных частиц (SVP), состоящих только из белков поверхностной оболочки ВГВ (HBsAg) в форме относительно более мелких сфер и волокон различной длины. Установлено, что субвирусные частицы значительно повышают внутриклеточную репликацию вируса и генную экспрессию ВГВ (Bruns M. et al., J. Virol., 72, 2, p. 1462-1468 (1998)). Это также является важным в контексте инфекционности сывороток, содержащих ВГВ, так как инфекционность зависит не только от числа вирусов, но также и от числа субвирусных частиц SVP (Bruns M. et al., J. Virol., 72, 2, p. 1462-1468 (1998)). Более того, избыток субвирусных частиц может служить в качестве ловушки за счет абсорбции нейтрализующих антител и таким образом замедлять элиминацию инфекции. Таким образом, удаление поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), как правило, рассматривают в качестве идеального конечного параметра лечения и ближайшего результата для лечения хронического гепатита В (ХГВ).

Соответственно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, которое предпочтительно ускоряет клиренс HBsAg, прежде всего клиренс субвирусных частиц вируса гепатита В и ВГВ, обеспечивают усовершенствованное лечение гепатита В, прежде всего в контексте хронического гепатита В. Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может проявлять свои нейтрализующие свойства еще более эффективно, так как меньшее количество антител абсорбируется на субвирусных частицах SVP, действующих в качестве ловушки. Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, которое предпочтительно ускоряет клиренс субвирусных частиц вируса гепатита В, снижает инфекционность сывороток, содержащих ВГВ.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит Fc фрагмент. Более предпочтительно используют Fc фрагмент человека, например, полученный из IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4 человека, при этом прежде всего предпочтителен IgG1 человека.

Использованный в данном контексте термин "Fc фрагмент" относится к последовательности, полученной из части тяжелой цепи иммуноглобулина, начиная непосредственно с шарнирной области и далее до участка расщепления папаином (например, остаток 216 в нативном IgG и первый остаток консервативной области тяжелой цепи в положении 114) и затем до С-концевого участка тяжелой цепи иммуноглобулина. Соответственно, Fc фрагмент может представлять собой полноразмерный Fc фрагмент или его часть (например, домен). Полноразмерный Fc фрагмент включает по крайней мере шарнирный домен, CH2 домен и CH3 домен (например, положения аминокислот 216-446 согласно ЕС-нумерации). В некоторых случаях к С-концевому остатку Fc фрагмента присоединен дополнительный остаток лизина (K), но в большинстве случаев он отщепляется от зрелого антитела. Нумерацию каждого аминокислотного остатка в Fc фрагменте осуществляют согласно принятой в данной области системы ЕС-нумерации по Кабату, см., например, статью Kabat et al., в сборнике "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 1983 и 1987.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения Fc фрагмент включает по крайней мере один из следующих элементов: шарнирный домен (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), CH2 домен, CH3 домен или их вариант, часть или фрагмент. В предпочтительных вариантах Fc фрагмент включает по крайней мере шарнирный домен, CH2 домен или CH3 домен. Более предпочтительно Fc фрагментом является полноразмерный Fc фрагмент. Fc фрагмент может также содержать одну или более аминокислотных вставок, делеций или замен по сравнению с нативным Fc фрагментом. Например, можно удалить по крайней мере один из следующих доменов: шарнирный домен, CH2 домен или CH3 домен (или их часть). Например, Fc фрагмент может включать следующие домены или состоять из них: (i) шарнирный домен (или его часть), присоединенный к CH2 домену (или к его части), (ii) шарнирный домен (или его часть), присоединенный к CH3 домену (или к его части), (iii) CH2 домен (или его часть), присоединенный к CH3 домену (или к его части), (iv) шарнирный домен (или его часть), (v) CH2 домен (или его часть) или (vi) CH3 домен или его часть.

Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что Fc фрагмент можно модифицировать таким образом, чтобы его аминокислотная последовательность отличалась от аминокислотной последовательности полноразмерного Fc фрагмента молекулы нативного иммуноглобулина, и чтобы при этом сохранялась по крайней мере одна требуемая функция, характерная для нативного Fc фрагмента. Такие функции включают связывание с Fc рецептором (FcR), модуляцию периода полураспада антитела, функцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), связывание с А белком, связывание с G белком и связывание с комплементом. Специалистам в данной области техники известны части нативных Fc фрагментов, которые ответственны за проявление указанных функций и/или играют важную роль при проявлении указанных функций.

Например, для активации каскада комплемента C1q связывается по крайней мере с двумя молекулами IgG1 или с одной молекулой IgM, присоединенной к антигенной мишени (Ward E.S. и Ghetie V., Ther. Immunol., 2, p. 77-94 (1995)). В статье Burton D.R. (Mol. Immunol., 22, p. 161-206 (1985)) описано, что область тяжелой цепи, включающая аминокислотные остатки 318 -337, принимает участие в фиксации комплемента. В статье Duncan A.R. и Winter G. (Nature, 332, p. 738-740 (1988)) с использованием сайт-направленного мутагенеза показано, что Glu318, Lys320 и Lys322 образуют участок связывания

C1q. Роль остатков Glu318, Lys320 и Lys 322 в связывании C1q подтверждена способностью короткого синтетического пептида, содержащего указанные остатки, ингибировать опосредованный комплементом лизис.

Например, связывание FcR можно опосредовать при взаимодействии Fc фрагмента (антитела) с Fc рецепторами (FcR), которые представляют собой специфические поверхностные рецепторы, расположенные на гемопоэтических клетках. Fc рецепторы принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов, и было показано, что они опосредуют как удаление покрытых антигеном патогенов за счет фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC, Van de Winkel J.G. и Andersonn C.L., *J. Leukoc. Biol.*, 49, p. 511-524 (1991)). FcR рецепторы определяют по их специфичности в отношении классов иммуноглобулинов, при этом Fc рецепторы для антител IgG обозначают как FcγR, рецепторы для IgE обозначают как FcεR, рецепторы для IgA обозначают как FcαR и т.п., а неонатальные Fc рецепторы обозначают как FcRn. Связывание Fc рецепторов описано, например, в статье Ravetch J.V. и Kinet J.P., *Annu. Rev. Immunol.*, 9, p. 457-492 (1991), в статье Capel P.J. et al., *Immunomethods*, 4, p. 25-34 (1994), в статье de Haas M. et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126, p. 330-341 (1995), а также в статье Gessner J.E. et al., *Ann. Hematol.*, 76, p. 231-248 (1998).

Сшивка рецепторов Fc доменом антител нативного IgG (FcγR) запускает широкий спектр эффекторных функций, включая фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность и высвобождение воспалительных медиаторов, а также клиренс иммунных комплексов и регуляцию продуцирования антител. В связи с этим Fc фрагменты, обеспечивающие сшивку рецепторов (FcγR), являются предпочтительными. Охарактеризованы три класса FcγR человека, а именно: (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 с аффинностью от средней до низкой, широко экспрессируется прежде всего на лейкоцитах и, как известно, играет ведущую роль в антитело-опосредованном иммунитете, и который можно разделить на три типа FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIC, которые выполняют различные функции в иммунной системе, но связываются с Fc IgG с аналогичной низкой аффинностью, при этом эктодомены указанных рецепторов являются высоко гомологичными, и (iii) FcγRIII (CD16), который связывается с IgG с аффинностью от средней до низкой и существует в виде двух типов: FcγRIIIA, обнаруживаемый на NK клетках, макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и Т-клетках, а также опосредующий ADCC, и FcγRIIIB, который интенсивно экспрессируется на нейтрофилах. FcγRIIA обнаружен на многих клетках, принимает участие в процессе гибели клеток (например, макрофаги, моноциты, нейтрофилы) и, по-видимому, способен активировать процесс гибели клеток. FcγRIIB, по-видимому, играет роль в процессах ингибирования, и обнаружен на В-клетках, макрофагах, а также на тучных клетках и эозинофилах. Важно, что 75% всего FcγRIIB обнаружено в печени (Ganesan L.P. et al., *FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes*, *Journal of Immunology*, 189, p. 4981-4988 (2012)). FcγRIIB экспрессируется в избыточных количествах на синусоидальных эндотелиальных клетках печени (LSEC) и купферовских клетках в печени, при этом LSEC представляют собой главный участок клиренса малых иммунных комплексов (Ganesan L.P. et al., *FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes*, *Journal of Immunology*, 189, p. 4981-4988 (2012)).

Соответственно, в настоящем изобретении предпочтительны такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые способны связываться с FcγRIIb, например антитела, включающие Fc фрагмент для связывания с FcγRIIb, прежде всего Fc область, такую как, например, антитела типа IgG. Более того, для повышения связывания с FcγRIIb можно сконструировать Fc фрагмент за счет включения мутаций S267E и L328F, как описано в статье Chu S.Y. et al., *Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies*, *Molecular Immunology*, 45, p. 3926-3933 (2008). Таким образом, можно ускорить клиренс иммунных комплексов (Chu S. et al., *Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xmab7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor FcγRIIb*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society International Conference, Abstracts* (2014)). Соответственно, в контексте настоящего изобретения предпочтительными являются такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые включают сконструированный Fc фрагмент с мутациями S267E и L328F, прежде всего, как описано в статье Chu S.Y. et al., *Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies*, *Molecular Immunology*, 45, p. 3926-3933 (2008).

На В-клетках функция такого фрагмента, по-видимому, заключается в подавлении дальнейшего продуцирования иммуноглобулинов и переключения изотипа, например, на класс IgE. На макрофагах действие FcγRIIB заключается в ингибировании фагоцитоза, которое опосредуется через FcγRIIA. На эозинофилах и тучных клетках b-форма может способствовать подавлению активации указанных клеток за счет связывания IgE с его отдельным рецептором.

В отношении связывания FcγRI, модификация нативного IgG по меньшей мере в одном из участков

E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329 снижает связывание с FcγRI. Остатки IgG2 в положениях 233-236, замененные в IgG1 и IgG4, снижают в 10 раз связывание с FcγRI и подавляют ответную реакцию моноцитов человека на антитело-сенсibilизированные эритроциты (Armour K.L. et al., *Eur. J. Immunol.*, 29, p. 2613-2624 (1999)). В отношении связывания FcγRII, сниженное связывание в случае FcγRIIA обнаружено, например, для IgG, содержащего мутации по крайней мере в одном из участков E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 и K414. В отношении связывания FcγRIII, сниженное связывание с FcγRIIIA обнаружено, например, для мутации по крайней мере в одном из участков E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 и D376. Картирование участков связывания Fc рецепторов на IgG1 человека, упомянутые выше участки мутаций, а также способы измерения связывания FcγRI и FcγRIIA описаны в статье Shields R.L. et al., *J. Biol. Chem.*, 276, p. 6591-6604 (2001).

В отношении связывания ключевого FcγRII, две Fc области нативного IgG, по-видимому, являются определяющими для взаимодействий фрагментов FcγRIIs с различными IgG, а именно (i) нижний шарнирный участок Fc IgG, прежде всего аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, ЕС-нумерация), и (ii) область, соседняя с CH2 доменом в составе Fc IgG, прежде всего петля и цепи в верхнем CH2 домене рядом с нижней шарнирной областью, например в области P331 (Wines B.D. et al., *J. Immunol.*, 164, p. 5313-5318 (2000)). Более того, FcγRI, по-видимому, связывается с тем же участком на Fc IgG, в то время как FcRn и A белок связываются с другим участком на Fc IgG, который, по-видимому, расположен на поверхности раздела доменов CH2-CH3 (Wines B.D. et al., *J. Immunol.*, 164, p. 5313-5318 (2000)).

Например, Fc фрагмент может содержать по крайней мере часть Fc фрагмента или состоять по крайней мере из части Fc фрагмента, которая, как известно в данной области техники, необходима для связывания с FcRn или для увеличения периода полураспада. В другом варианте или дополнительно, Fc фрагмент антитела по настоящему изобретению включает по крайней мере часть известного в данной области техники фрагмента, который требуется для связывания A белка, и/или Fc фрагмент антитела по настоящему изобретению включает по крайней мере часть молекулы Fc, которая, как известно в данной области техники, требуется для связывания G белка. Предпочтительно сохраняемой функцией является клиренс HBsAg и ВГВ, который, как полагают, опосредуется при связывании с FcγR. Соответственно, предпочтительный Fc фрагмент включает по крайней мере часть известного в данной области техники фрагмента, который требуется для связывания с FcγR. Как указано выше, предпочтительный Fc фрагмент может также содержать по крайней мере (i) нижний шарнирный участок Fc нативного IgG, прежде всего аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, ЕС-нумерация), и (ii) соседнюю область CH2 домена Fc нативного IgG, прежде всего петлю и цепи в верхнем CH2 домене, рядом с нижней шарнирной областью, например, в области P331, например, область, содержащая по крайней мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислотных остатков в верхнем CH2 домене Fc нативного IgG вблизи P331, например, между аминокислотами 320 и 340 (ЕС-нумерация) Fc нативного IgG.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению включает Fc область. Используемый в данном контексте термин "Fc область" относится к части иммуноглобулина, образованной двумя или более Fc фрагментами тяжелых цепей антитела. Например, Fc область может быть мономерной или "одноцепочечной" Fc областью (т.е. scFc область). Одноцепочечные Fc области включают Fc фрагменты, связанные в одну полипептидную цепь (например, кодируемые одной непрерывной нуклеотидной последовательностью). Примеры scFc областей описаны в заявке WO 2008/143954 A2. Предпочтительно Fc областью является димерная Fc область. Термин "димерная Fc область" или "dcFc" относится к димеру, образованному Fc фрагментами двух отдельных тяжелых цепей иммуноглобулина. Димерная Fc область может представлять собой гомодимер, состоящий из двух идентичных Fc фрагментов (например, Fc область нативного иммуноглобулина), или гетеродимер, состоящий из двух неидентичных Fc фрагментов.

Fc фрагменты в составе Fc области могут относиться к одному и тому же или к различным классам и/или подклассам. Например, Fc фрагменты можно получить из иммуноглобулина (например, иммуноглобулин человека) подклассов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно Fc фрагменты Fc области относятся к одному классу или подклассу. Однако Fc область (или один или более Fc фрагментов Fc области) также может представлять собой химерную область, при этом химерная Fc область включает Fc фрагменты, полученные из иммуноглобулинов различных классов и/или подклассов. Например, по крайней мере два Fc фрагмента димерной или одноцепочечной Fc области можно получить из иммуноглобулинов различных классов и/или подклассов. Кроме того, или в другом варианте, химерные Fc области могут содержать один или более химерных Fc фрагментов. Например, химерная Fc область или фрагмент может содержать одну или более частей, полученных из иммуноглобулина первого подкласса (например, подклассы IgG1, IgG2 или IgG3), в то время как остальную часть Fc области или фрагмента можно получить из другого подкласса. Например, Fc область или фрагмент полипептида Fc может содержать CH2 и/или CH3 домен, полученный из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласс IgG1, IgG2 или IgG4), и шарнирную область, полученную из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласс IgG3). Например, Fc область или Fc фрагмент может включать шарнирный домен и/или CH2 до-

мен, полученные из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласс IgG4), и CH3 домен, полученный из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласс IgG1, IgG2 или IgG3). Например, химерная Fc область может включать Fc фрагмент (например, полноразмерный Fc фрагмент), полученный из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласс IgG4) и Fc фрагмент, полученный из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласс IgG1, IgG2 или IgG3). Например, Fc область или Fc фрагмент может содержать CH2 домен, полученный из иммуноглобулина IgG4, и CH3 домен, полученный из иммуноглобулина IgG1. Например, Fc область или Fc фрагмент может содержать CH1 домен и CH2 домен, полученные из молекулы IgG4, и CH3 домен, полученный из молекулы IgG1. Например, Fc область или Fc фрагмент может содержать часть CH2 домена, полученную из конкретного подкласса антитела, например, положения 292-340 в CH2 домене (ЕС-нумерация). Например, Fc область или Fc фрагмент могут содержать аминокислоты в положениях 292-340 CH2 домена, полученные из фрагмента IgG4, и остальную часть CH2 домена, полученную из фрагмента IgG1 (в другом варианте положения 292-340 CH2 домена можно получить из фрагмента IgG1, а остальную часть CH2 домена можно получить из фрагмента IgG4).

Более того, Fc область или Fc фрагмент могут (дополнительно или в другом варианте), например, содержать химерную шарнирную область. Например, химерную шарнирную область можно получить, например, частично из молекулы IgG1, IgG2 или IgG4 (например, верхняя и нижняя средняя шарнирная последовательность) и частично из молекулы IgG3 (например, средняя шарнирная последовательность). В другом примере Fc область или Fc фрагмент могут содержать химерную шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4. В еще одном примере химерная шарнирная область может содержать верхний и нижний шарнирные домены, полученные из молекулы IgG4, и средний шарнирный домен, полученный из молекулы IgG1. Такой шарнирный домен можно получить, например, при замене пролина (Ser228Pro) в положениях 228 (ЕС-нумерация) в среднем шарнирном домене шарнирной области IgG4. В другом варианте химерная шарнирная область может включать аминокислоты в положениях 233-236 (ЕС-нумерация), полученные из антитела IgG2, и/или мутацию Ser228Pro, при этом остальную часть аминокислот шарнирной области получают из антитела IgG4 (например, химерная шарнирная область ESKYGPPCPPCPAPPVAGP). Другие химерные шарнирные области, которые можно использовать в Fc фрагменте антитела по настоящему изобретению, описаны в патенте US 2005/0163783 A1.

В настоящем изобретении Fc фрагмент или Fc область предпочтительно включают аминокислотную последовательность, полученную из последовательности иммуноглобулина человека (например, из Fc области или Fc фрагмента молекулы IgG человека), или состоит из нее. Однако полипептиды могут содержать одну или более аминокислот из других видов млекопитающих. Например, в полипептиды по настоящему изобретению можно включить Fc фрагмент или его участок связывания из приматов. В другом варианте в Fc фрагменте или Fc области могут присутствовать одна или более аминокислот из мыши.

Предпочтительно антитело по настоящему изобретению включает, прежде всего дополнительно к Fc фрагменту, как описано выше, другие части, полученные из консервативной области, прежде всего, из консервативной области IgG, предпочтительно из консервативной области IgG1, более предпочтительно из консервативной области IgG1 человека. Более предпочтительно антитело по настоящему изобретению включает, прежде всего дополнительно к Fc фрагменту, как описано выше, все другие части консервативных областей, прежде всего все другие части консервативных областей IgG, предпочтительно все другие части консервативных областей IgG1, более предпочтительно все другие части консервативных областей IgG1 человека.

Как описано выше, наиболее предпочтительное антитело по настоящему изобретению включает Fc область (полноразмерную), полученную из IgG1 человека. Более предпочтительно антитело по настоящему изобретению включает, прежде всего дополнительно к Fc области (полноразмерной), полученной из IgG1 человека, также все другие части консервативных областей IgG, предпочтительно все другие части консервативных областей IgG1, более предпочтительно все другие части консервативных областей IgG1 человека.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению также предпочтительно связываются 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. Примеры различных генотипов HBsAg включают следующие последовательности: код доступа базы данных GenBank J02203 (HBV-D, ayw3), код доступа базы данных GenBank J899792.1 (HBV-D, adw2), код доступа базы данных GenBank AM282986 (HBV-A), код доступа базы данных GenBank D23678 (HBV-B1 Japan), код доступа базы данных GenBank AB117758 (HBV-C1 Cambodia), код доступа базы данных GenBank AB205192 (HBV-E Ghana), код доступа базы данных GenBank X69798 (HBV-F4 Brazil), код доступа базы данных GenBank AF160501 (HBV-G USA), код доступа базы данных GenBank AY090454 (HBV-H Nicaragua), код доступа базы данных GenBank AF241409 (HBV-I Vietnam) и код доступа базы данных GenBank AB486012 (HBV-J Borneo). Аминокислотные последовательности антигенной петлевой области S домена различных генотипов HBsAg указаны в табл. 1 (SEQ ID NO: 5-15).

Более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобрете-

нию связываются по крайней мере с 6, еще более предпочтительно по крайней мере с 8 и, прежде всего, предпочтительно по крайней мере со всеми 10 генотипами HBsAg: A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. Согласно геномной последовательности ВГВ дифференцирован на множество генотипов. В настоящее время определены восемь известных типов генома ВГВ (A-H). Кроме того, идентифицированы также два новых генотипа I и J (Sunbul M., World J. Gastroenterol., 20, 18, p. 5427-5434 (2014)). Известно, что генотип влияет на прогрессирование заболевания, и были заявлены различные ответные реакции на противовирусное лечение в зависимости от генотипа. Например, генотип А характеризуется тенденцией к хроническому течению заболевания, в то время как при генотипе С часто встречаются вирусные мутации. Для генотипа D характерно как хроническое течение заболевания, так и вирусные мутации. Более того, генотипы ВГВ распространены во всем мире дифференцировано (Sunbul M., World J. Gastroenterol., 20, 18, p. 5427-5434 (2014)). Получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, которые предпочтительно связываются по крайней мере с 6, предпочтительно по крайней мере с 8, более предпочтительно со всеми 10 генотипами HBsAg - A, B, C, D, E, F, G, H, I и J, позволяет получить антитело, которое связывается с различными генотипами в широком диапазоне.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или с 18 мутантными формами HBsAg, содержащими мутации в антигенной петлевой области:

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.

Указанные мутантные формы являются природными мутантными формами на основе S домена HBsAg генотипа D, код доступа базы данных Genbank FJ899792 (SEQ ID NO: 4), где указаны мутантный(ые) аминокислотный(ые) остаток(ки). SEQ ID NO: 4:

MENVTSGLGLPVLVLAQGFLLTRILTPQSLDSWWTSNLFGLGTTVCLGQ
NSQSPTSNHSPTSCPTCPGYRWMCLRRFIIFLLCLIFLLVLLDYQGMPLVCP
LIPGSSTTGTPCRTCCTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWE
WASARFSWLSLLVPFVQWVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLSPLPLLP
IFFCLWVYI

(область антигенной петли, т.е. аминокислоты 101-172, подчеркнута).

Аминокислотные последовательности антигенной петлевой области S домена различных мутантных форм HBsAg показаны в табл. 1 (SEQ ID NO: 16-33).

Более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются по крайней мере с 12, еще более предпочтительно по крайней мере с 15 и, прежде всего, предпочтительно со всеми 18 инфекционными мутантными формами HBsAg, содержащими мутации в антигенной петлевой области:

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.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с эпитопом, содержащим по крайней мере одну, предпочтительно по крайней мере две, более предпочтительно по крайней мере три аминокислоты, еще более предпочтительно по крайней мере четыре аминокислоты антигенной петлевой области HBsAg, при этом по крайней мере две, предпочтительно по крайней мере три, более предпочтительно по крайней мере четыре аминокислоты выбирают из аминокислот 115-133 S домена HBsAg, предпочтительно из аминокислот 120-133 S домена HBsAg, более предпочтительно из аминокислот 120-130 S домена HBsAg. Следует отметить, что положения аминокислот (например, 115-133, 120-133, 120-130) относятся к S домену HBsAg, как описано выше, который присутствует во всех трех белках поверхностной оболочки ВГВ: S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg, причем S-HBsAg, как правило, соответствует S домену HBsAg.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, прежде всего связывается с эпитопом в антигенной петлевой области HBsAg, при этом эпитоп, как правило, состоит из одной или более аминокислот, расположенных в положениях, выбранных из положений аминокислот 115-133, предпочтительно выбранных из положений аминокислот 120-133, более предпочтительно выбранных из положений 120-130 S домена HBsAg.

Использованный в данном контексте термин "образованный" в отношении эпитопа означает, что эпитоп, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобре-

тению, может быть линейным (непрерывным) или конформационным (прерывистым). Линейный или непрерывный эпитоп представляет собой эпитоп, который антитела распознают по его линейной последовательности аминокислот, или первичной структуре. И наоборот, конформационный эпитоп характеризуется специфической трехмерной формой и структурой белка. Соответственно, если эпитоп является линейным эпитопом и включает более одной аминокислоты, расположенной в положениях, выбранных из положений аминокислот 115-133, предпочтительно выбранных из положений аминокислот 120-133 S домена HBsAg, то аминокислоты, входящие в состав эпитопа, как правило, занимают соседние положения первичной структуры (т.е. последовательно расположенные аминокислоты в аминокислотной последовательности). В случае конформационного эпитопа (3D-структура), наоборот, аминокислотная последовательность, как правило, образует 3D-структуру в виде эпитопа, и таким образом аминокислоты, образующие эпитоп (или аминокислоты "включенные в" эпитоп), могут располагаться или не располагаться в соседних положениях первичной структуры (т.е. могут представлять собой или не представлять собой последовательно расположенные аминокислоты в аминокислотной последовательности).

Предпочтительно эпитоп, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, образован только аминокислотой(ами), выбранными из аминокислот, расположенных в положениях 115-133, предпочтительно выбранными из аминокислот, расположенных в положениях 120-133, более предпочтительно выбранными из аминокислот, расположенных в положениях 120-130 S домена HBsAg. Другими словами, для образования эпитопа, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, предпочтительно не требуются аминокислоты (дополнительные), расположенные за пределами положений 115-133, предпочтительно за пределами положений 120-133, более предпочтительно за пределами положений 120-130.

Предпочтительно эпитоп в составе антигенной петлевой области HBsAg, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, образован двумя или более аминокислотами, расположенными в положениях, выбранных из положений аминокислот 115-133, предпочтительно выбранных из положений аминокислот 120-133, более предпочтительно выбранных из положений аминокислот 120-130 S домена HBsAg. Более предпочтительно эпитоп в составе антигенной петлевой области HBsAg, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, образован тремя или более аминокислотами, расположенными в положениях, выбранных из положений аминокислот 115-133, предпочтительно выбранных из положений аминокислот 120-133, более предпочтительно выбранных из положений аминокислот 120-130 S домена HBsAg. Еще более предпочтительно эпитоп в составе антигенной петлевой области HBsAg, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, образован четырьмя или более аминокислотами, расположенными в положениях, выбранных из положений аминокислот 115-133, предпочтительно выбранных из положений аминокислот 120-133, более предпочтительно выбранных из положений аминокислот 120-130 S домена HBsAg. Другими словами, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается предпочтительно по крайней мере с одним, предпочтительно по крайней мере с двумя, более предпочтительно по крайней мере с тремя, еще более предпочтительно по крайней мере с четырьмя аминокислотами антигенной петлевой области HBsAg, выбранными из аминокислот 115-133 S домена HBsAg, предпочтительно из аминокислот 120-133 S домена HBsAg, более предпочтительно выбранными из аминокислот 120-130 S домена HBsAg.

Более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом, включающим по крайней мере два, предпочтительно по крайней мере три, более предпочтительно по крайней мере четыре аминокислоты антигенной петлевой области HBsAg, при этом по крайней мере две, предпочтительно по крайней мере три, более предпочтительно по крайней мере четыре аминокислоты выбирают из аминокислот 120-133, предпочтительно из аминокислот 120-130 S домена HBsAg, и при этом по крайней мере две, предпочтительно по крайней мере три, более предпочтительно по крайней мере четыре аминокислоты расположены в соседних положениях (т.е. являются последовательно расположенными аминокислотами в аминокислотной последовательности/первичной структуре).

Эпитопом, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, предпочтительно является конформационный эпитоп. Соответственно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению предпочтительно связывается с эпитопом, включающим по крайней мере две, предпочтительно по крайней мере три, более предпочтительно по крайней мере четыре аминокислоты антигенной петлевой области HBsAg, при этом по крайней мере две, предпочтительно по крайней мере три, более предпочтительно по крайней мере четыре аминокислоты выбирают из аминокислот 120-133, предпочтительно из аминокислот 120-130 S домена HBsAg и при этом по крайней мере две, предпочтительно по крайней мере три, более предпочтительно по крайней мере четыре аминокислоты не расположены в соседних положениях (первичной структуры).

Другими словами, (i) либо ни одна из аминокислот, с которыми связывается антитело (т.е. аминокислоты, образующие эпитоп), не расположены в соседних положениях первичной структуры, либо (ii) некоторые, например две или три, аминокислоты, с которыми связывается антитело (т.е. аминокислоты, образующие эпитоп), расположены в соседних положениях (первичной структуры), в то время как

другие аминокислоты, с которыми связывается антитело (т.е. аминокислоты, образующие эпитоп), не расположены в соседних положениях (первичной структуры).

Аминокислоты, с которыми связывается антитело (т.е. аминокислоты, образующие эпитоп), которые не расположены в соседних положениях первичной структуры, как правило, разделены в пространстве одной или более аминокислотами, с которыми антитело не связывается. Предпочтительно по крайней мере одна, более предпочтительно по крайней мере две, еще более предпочтительно по крайней мере три, наиболее предпочтительно по крайней мере четыре, прежде всего предпочтительно по крайней мере пять аминокислот могут быть расположены между двумя, предпочтительно по крайней мере между тремя аминокислотами, которые входят в состав эпитопа и которые не расположены в соседних положениях.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с эпитопом, включающим по крайней мере аминокислоты P120, C121, R122 и C124 S домена HBsAg. Более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88:

PCRXC,

где X обозначает любую аминокислоту или отсутствует, предпочтительно X обозначает любую аминокислоту, более предпочтительно X обозначает T, Y, R, S или F, еще более предпочтительно X обозначает T, Y или R, наиболее предпочтительно X обозначает T или R.

Еще более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80:

TGPCRTC

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

Наиболее предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85:

STTSTGPCRTC

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

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также предпочтительно связывается с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность, содержащую по крайней мере аминокислоты 145-151 S домена HBsAg:

GNCTCIP (SEQ ID NO: 81).

Более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81.

Более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

Как описано выше, эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, может быть линейным (непрерывного типа) или конформационным (прерывистого типа). Предпочтительно антитело и фрагменты антител по настоящему изобретению связываются с конформационным эпитопом, более предпочтительно конформационный эпитоп присутствует только в не восстанавливающих условиях.

Однако антитело или его фрагмент по настоящему изобретению связывается также предпочтительно с линейным эпитопом, более предпочтительно линейный эпитоп присутствует как в не восстанавливающих условиях, так и в восстанавливающих условиях.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом, расположенным в антигенной петлевой области HBsAg, образованным аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1:

$X_1X_2X_3TCX_4X_5X_6AX_7G$,

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

Предпочтительно X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 обозначают аминокислоты, которые замещены консервативными аминокислотами по сравнению с аминокислотами 120-130 последовательности SEQ ID NO: 3. Предпочтительно X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 обозначают также аминокислоты, которые замещены консервативными аминокислотами по сравнению с аминокислотами 20-30 любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-33 (см. табл. 1 со ссылкой на последовательности антигенной петлевой области, т.е. на положения аминокислот 101-172 S домена различных вариантов HBsAg).

Предпочтительно в последовательности SEQ ID NO: 1 X_1 обозначает аминокислоту с малой боковой цепью. Использованный в данном контексте термин аминокислота "с малой боковой цепью" отно-

сится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, цистеина, глицина, пролина, серина, треонина и валина. Более предпочтительно X_1 обозначает пролин, серии или треонин.

Предпочтительно в последовательности SEQ ID NO: 1 X_2 обозначает аминокислоту с малой боковой цепью. Более предпочтительно X_2 обозначает цистеин или треонин.

Предпочтительно в последовательности SEQ ID NO: 1 X_3 обозначает заряженную аминокислоту или алифатическую аминокислоту. Используемый в данном контексте термин "заряженная" аминокислота относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и гистидина. Используемый в данном контексте термин "алифатическая" аминокислота относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина, глицина, изолейцина, лейцина и валина. Более предпочтительно X_3 обозначает аргинин, лизин, аспарагиновую кислоту или изолейцин.

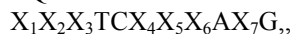
Предпочтительно в последовательности SEQ ID NO: 1 X_4 обозначает аминокислоту с малой боковой цепью и/или гидрофобную аминокислоту. Используемый в данном контексте термин "гидрофобная" аминокислота относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, валина, триптофана, тирозина, метионина, пролина и глицина. Более предпочтительно X_4 обозначает метионин или треонин.

Предпочтительно в последовательности SEQ ID NO: 1 X_5 обозначает аминокислоту с малой боковой цепью и/или гидрофобную аминокислоту. Более предпочтительно X_5 обозначает треонин, аланин или изолейцин.

Предпочтительно в последовательности SEQ ID NO: 1 X_6 обозначает аминокислоту с малой боковой цепью и/или гидрофобную аминокислоту. Более предпочтительно X_6 обозначает треонин, пролин или лейцин.

Предпочтительно в последовательности SEQ ID NO: 1 X_7 обозначает полярную аминокислоту или алифатическую аминокислоту. Используемый в данном контексте термин "полярная" аминокислота относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты, аспарагина, аргинина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, глутамин, триптофана, тирозина, серина и треонина. Более предпочтительно X_7 обозначает глутамин, гистидин или лейцин.

Соответственно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению более предпочтительно связывается с эпитопом, расположенным в антигенной петле HBsAg, образованной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2:



где X_1 обозначает Р, Т или S,

X_2 обозначает С или S,

X_3 обозначает R, K, D или I,

X_4 обозначает М или Т,

X_5 обозначает Т, А или I,

X_6 обозначает Т, Р или L,

X_7 обозначает Q, Н или L.

В отношении предпочтительных эпитопов, образованных аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, следует отметить, что использованный в данном контексте термин "образованный", прежде всего не обозначает, что антитело обязательно связывается с каждой и любой аминокислотой в последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. Прежде всего, в случае предпочтительных конформационных эпитопов антитело может связываться только с некоторыми аминокислотами в последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, при этом другие аминокислотные остатки могут выполнять лишь функцию "спейсеров", тем самым обеспечивая 3D-структуру эпитопа.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с эпитопом, расположенным в антигенной петле HBsAg, образованным одной или более, предпочтительно двумя или более, более предпочтительно тремя или более и еще более предпочтительно четырьмя или более аминокислотами, входящими в состав аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 5-33, показанных в табл. 1.

Более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с областью антигенной петли HBsAg, включающей аминокислотную последовательность из любой последовательности SEQ ID NO: 5-33, показанных в табл. 1, или вариант указанных последовательностей. Еще более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются со всеми вариантами антигенной петли HBsAg, включающими аминокислотную последовательность любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-33, показанных в табл. 1. Другими словами, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, прежде всего, предпочтительно могут связываться со всеми различными антигенными петлевыми областями HBsAg, включающими аминокислотную последовательность из любой последовательности SEQ ID NO: 5-33.

Таблица 1

Типичные аминокислотные последовательности антигенной петлевой области S домена HBsAg (остатки 101-172 S домена HBsAg, за исключением последовательности SEQ ID NO: 16, которая относится к остаткам 100-172 S домена HBsAg, чтобы исключить соответствующую мутацию) различных генотипов и мутантных форм, использованных в данном контексте

Название	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
J02203 (D, ayw3)	5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
FJ899792 (D, adw2)	6	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
AM282986 (A)	7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTAAQGTSMFPPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFKYLWEWASVRFWSW
D23678 (B1)	8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTAAQGTSMFPPSCCCTK PTDGNCTCIIPSSWAFKYLWEWASVRFWSW
AB117758 (C1)	9	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTAAQGTSMFPPSCCCTK PSDGNCTCIIPSSWAFARFLWEWASVRFWSW
AB205192 (E)	10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTAAQGTSMFPPSCCCK PSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
X69798 (F4)	11	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTAAQGTSMFPPSCCCK KPSDGNCTCIIPSSWALGKYLWEWASARFSW
AF160501 (G)	12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFKYLWEWASVRFWSW
AY090454 (H)	13	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTAAQGTSMFPPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFGKYLWEWASARFSW
AF241409 (I)	14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFKYLWEWASARFSW
AB486012 (J)	15	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCRTCTTAAQGTSMFPPSCCCTK PSDGNCTCIIPSSWAFKFLWEWASVRFWSW
HBsAg Y100C/P120T	16	CQGMPLVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTAAQGTSMYPSCCCK TKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P120T	17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P120T/S143L	18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPLDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg C121S	19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTAAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg R122D	20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg R122I	21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCTCTTAAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg T123N	22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg Q129H	23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAHGTSMPSCCCT KPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg Q129L	24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAHGTSMPSCCCTK PSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133H	25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSHYPSCCCTK PSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133L	26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSLYPSCCCTK PSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133T	27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSTYPSCCCTK PSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg K141E	28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSMYPSCCCTE PSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P142S	29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KSSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg S143K	30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPKDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg D144A	31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSAGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg G145R	32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDRNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg N146A	33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTAAQGTSMYPSCCCT KPSDGACTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW

Обычно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению предпочтительно включают (по крайней мере) три определяющие комплементарность области (CDR) в тяжелой цепи и (по крайней мере) три CDR области в легкой цепи. Обычно определяющие комплементарность области (CDR) являются гипервариабельными областями, присутствующими в вариабельных областях тяжелой цепи и в вариабельных областях легкой цепи. Как правило, области CDR тяжелой цепи вместе с присоединенной легкой цепью антитела образуют рецептор антигена. Обычно три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) области располагаются в вариабельной области не в последовательном порядке. Так как рецепторы антигена, как правило, состоят из двух вариабельных областей (в составе двух различных полипептидных цепей, т.е. тяжелой и легкой цепей), существует шесть CDR областей для каждого рецептора антигена (тяжелая цепь: CDRH1, CDRH2 и CDRH3, легкая цепь: CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Одна молекула антитела обычно содержит два рецептора антигена и, следовательно, содержит 12 CDR областей. CDR области тяжелой и/или легкой цепей могут быть разделены каркасными областями, при этом каркасная область (FR) обозначает участок вариабельной области, который является менее "вариабельным" по сравнению с CDR областью. Например, цепь (или каждая цепь, соответственно) может состоять из четы-

рех каркасных областей, разделенных тремя CDR областями.

Были определены последовательности тяжелых цепей и легких цепей типичного антитела по настоящему изобретению, содержащие три различные CDR области в тяжелой цепи и три различные CDR области в легкой цепи. Положение аминокислот CDR области определяют в соответствии с системой нумерации IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>, см. статью Lefranc M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 37, p. D1006-D1012 (2009)).

В табл. 2 приведены аминокислотные последовательности CDR областей, а также вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) типичного антитела по настоящему изобретению ("HBC34").

Таблица 2

HBC34	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
длинный вариант CDRH2	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
длинный вариант CDRL2	39	VIYEVKYRP
CDRL3	40	QTFDSTTV
VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSVSS
VL	42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV CWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTLVL

Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению предпочтительно включает аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, 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% идентичны по меньшей мере одной из последовательностей CDR, с последовательностью VH и/или с последовательностью VL, приведенными в табл. 2.

В табл. 3 приведены аминокислотные последовательности CDR областей, а также вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) еще одного типичного антитела по настоящему изобретению ("HBC34v7").

Таблица 3

HBC34v7	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
длинный вариант CDRH2	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
HBC34v7	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
длинный вариант CDRL2	39	VIYEVKYRP
CDRL3	58	QTFDSTTV
VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSVSS
VL	59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV CWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTLVL

Таким образом, согласно настоящему изобретению, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также предпочтительно включает аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, 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% идентичны по меньшей мере одной из последовательностей CDR, с последовательностью VH и/или с последовательностью VL, приведенными в табл. 3.

В табл. 4 приведены аминокислотные последовательности CDR областей, а также вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) другого типичного антитела по настоящему изобретению ("HBC34v23").

Таблица 4

HBC34v23	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
длинный вариант CDRH2	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
длинный вариант CDRL2	39	VIYEVKYRP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFR SFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKL YVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVE DTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSV SS
VL	65	SYELTPPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKNK ACWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDS TTVVGGGGKLTVL

Таким образом, согласно настоящему изобретению антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также предпочтительно включает аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, 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% идентичны по меньшей мере одной из последовательностей CDR, с последовательностью VH и/или с последовательностью VL, приведенными в табл. 4.

В табл. 5 приведены аминокислотные последовательности CDR областей, а также вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) еще одного типичного антитела по настоящему изобретению ("HBC34v31").

Таблица 5

HBC34v31	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
длинный вариант CDRH2	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
длинный вариант CDRL2	39	VIYEVKYRP
CDRL3	40	QTFDSTTVV
VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVTVSS
VL	42	SYELTPPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKV CWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTLVL

Таким образом, согласно настоящему изобретению антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно включает аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, 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% идентичны по меньшей мере одной из последовательностей CDR, с последовательностью VH и/или с последовательностью VL, приведенными в табл. 5.

В табл. 6 приведены аминокислотные последовательности CDR областей, а также вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) другого типичного антитела по настоящему изобретению ("HBC34v32").

Таблица 6

HBC34v32	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
длинный вариант CDRH2	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
длинный вариант CDRL2	39	VIYEVKYRP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVTVSS
VL	59	SYELTPPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKV CWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTLVL

Таким образом, согласно настоящему изобретению антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

мент также предпочтительно включает аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере 99% идентичны по меньшей мере одной из последовательностей CDR, с последовательностью VH и/или с последовательностью VL, приведенными в табл. 6.

В табл. 7 приведены аминокислотные последовательности CDR областей, а также вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) еще одного типичного антитела по настоящему изобретению ("HBC34v33").

Таблица 7

HBC34v33	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
длинный вариант CDRH2	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
длинный вариант CDRL2	39	VIYEVKYRP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFY MSWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKLYVDSV KGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYC AAWSGNSGGMDVWGQGTITVTVSS
VL	65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNAC WYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTVVFGGG TKLTVL

Таким образом, согласно настоящему изобретению антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также предпочтительно включает аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, 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% идентичны по меньшей мере одной из последовательностей CDR, с последовательностью VH и/или с последовательностью VL, приведенными в табл. 7.

В табл. 8 представлен обзор модификаций VH и VL типичных вариантов антител "HBC34v7", "HBC34v23", "HBC34v31", "HBC34v32" и "HBC34v33" антитела "HBC34" дикого типа (WT) и соответствующих последовательностей SEQ ID NO: для аминокислотных последовательностей CDR и VH/VL.

Таблица 8

Название варианта	Модифи- кация VH	Модификация VL	CDR							VL	VH
			H1	H2	H3	L1	L2	L3			
HBC34	WT	WT	34	35/66	36	37	38/39	40	41	42	
HBC34-V7	WT	W107F	34	35/66	36	37	38/39	58	41	59	
HBC34-V23	WT	W07F/FR1234GL/CD R2Y66	34	35/66	36	37	38/39	58	41	65	
HBC34-V31	FR124GL	WT	34	35/66	36	37	38/39	40	67	42	
HBC34-V32	FR124GL	W107F	34	35/66	36	37	38/39	58	67	59	
HBC34-V33	FR124GL	W07F/FR1234GL/CD R2Y66	34	35/66	36	37	38/39	58	67	65	

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению включает тяжелую цепь, содержащую по крайней мере одну CDRH1, по крайней мере одну CDRH2 и по крайней мере одну CDRH3, а также легкую цепь, содержащую по крайней мере одну CDRL1, по крайней мере одну CDRL2 и по крайней мере одну CDRL3, причем по крайней мере одна CDR область, предпочтительно по крайней мере одна CDRH3 области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или ее функциональный вариант или состоит из них, как описано в данном контексте. Соответственно, предпочтительно по крайней мере одна CDRH3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и прежде всего предпочтительно по меньшей мере на 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 36. Более предпочтительно по крайней мере одна CDRH3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также предпочтительно включает тяжелую цепь, содержащую по крайней мере одну CDRH1, по крайней мере одну CDRH2 и по крайней мере одну CDRH3, а также легкую цепь, содержащую по крайней мере одну CDRL1, по крайней мере одну CDRL2 и по крайней мере одну CDRL3, причем по крайней мере одна CDRL3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 58 или функциональный вариант указанных последовательностей. Соответственно, по крайней мере одна CDRL3 легкой цепи предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, которая составляет по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и прежде всего предпочтительно по меньшей мере на 98% или 99%

пример 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, идентичны аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 34, 36-38, 40 и 66 соответственно или аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 34, 36-37, 39-40 и 66 соответственно. Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению включает аминокислотные последовательности по крайней мере одной CDRH1, CDRH2 и CDRH3 области тяжелой цепи и по крайней мере одной CDRL1, CDRL2 и CDRL3 области легкой цепи, которые по меньшей мере на 80%, например 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, идентичны аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 34, 36-38, 58 и 66 соответственно или аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 34, 36-37, 39, 58 и 66 соответственно.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению также предпочтительно включает аминокислотную последовательность по меньшей мере одной вариабельной области тяжелой цепи (VH) и аминокислотную последовательность по меньшей мере одной вариабельной области легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 80%, например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 41-42.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению также предпочтительно включает аминокислотную последовательность по крайней мере одной вариабельной области тяжелой цепи (VH) и аминокислотную последовательность по меньшей мере одной вариабельной области легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 80%, например 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 41-59.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению также предпочтительно включает аминокислотную последовательность по крайней мере одной вариабельной области тяжелой цепи (VH) и аминокислотную последовательность по меньшей мере одной вариабельной области легкой цепи (VL), которые по меньшей мере на 80%, например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, идентичны аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 41 и 65.

Прежде всего, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению предпочтительно является gHBC34, прежде всего антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению является HBC34.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали моноклональное антитело (mAb) по настоящему изобретению, которое в данном контексте названо HBC34 (см. пример 1). На основе указанного антитела HBC34, прежде всего для генов VH и VL HBC34, использованный в данном контексте термин "gHBC34" относится к соответствующему "характерному" антителу или к его антигенсвязывающим фрагментам. А именно, "gHBC34" относится к антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, включающему аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 35, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 36, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 37, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 38 или 39 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 40. Прежде всего, "gHBC34" относится к антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, включающему аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 35 или 66, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 36, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 37, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 38 или 39 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 40. Вариабельная область тяжелой цепи (VH) "gHBC34" включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, а вариабельная область легкой цепи (VL) "gHBC34" включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

Прежде всего, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению предпочтительно является gHBC34v7, прежде всего антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению является HBC34v7.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали еще одно моноклональное антитело (mAb) по настоящему изобретению, которое в данном контексте названо HBC34v7 (см. пример 11). На основе указанного антитела HBC34v7, прежде всего для генов VH и VL HBC34v7, использованный в данном контексте термин "gHBC34v7" относится к соответствующему "обобщенному" антителу или к его антигенсвязывающим фрагментам. А именно, "gHBC34v7" относится к антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, включающему аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 35 или 66, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 36, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 37, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 38 или 39 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 58. Вариабельная область тяжелой цепи (VH) "gHBC34v7" включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, а вариабельная область легкой цепи (VL) "gHBC34v7" включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

ное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

В связи с этим антитела по настоящему изобретению могут представлять собой антитела человека, моноклональные антитела, моноклональные антитела человека, рекомбинантные антитела или очищенные антитела. В настоящем изобретении также предлагаются фрагменты антител по настоящему изобретению, прежде всего фрагменты, которые сохраняют антигенсвязывающую активность антител. Такие фрагменты включают, но не ограничиваясь только ими, одноцепочечные антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

Фрагменты антител по настоящему изобретению можно получить из антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей в условиях химического восстановления. В другом варианте, фрагменты антител можно получить клонированием и экспрессией части последовательностей тяжелой или легкой цепей. "Фрагменты" антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты. Настоящее изобретение также включает одноцепочечные Fv фрагменты (scFv), полученные из тяжелой и легкой цепей антитела по настоящему изобретению. Например, настоящее изобретение включает scFv, содержащий CDR области из антитела по настоящему изобретению. Включены также мономеры и димеры тяжелой или легкой цепи, однодоменные антитела, состоящие из тяжелых цепей, однодоменные антитела, состоящие из легких цепей, а также одноцепочечные антитела, например, одноцепочечный Fv, в котором вариабельные области тяжелой и легкой цепей соединены через пептидный линкер.

Фрагменты антител по настоящему изобретению могут придавать способность к моновалентным или мультивалентным взаимодействиям и содержаться в различных структурах, как описано выше. Например, чтобы сконструировать трехвалентное "триатело" или четырехвалентное "тетратело", можно получить молекулы scFv. Молекулы scFv можно включать в домен Fc области, при этом получают двухвалентные минитела. Кроме того, последовательности по настоящему изобретению могут представлять собой компонент мультиспецифичных молекул, в которых последовательности по настоящему изобретению направлены связываются с эпитопами по настоящему изобретению, а другие области молекулы связываются с другими мишенями. Типичные молекулы включают, но не ограничиваясь только ими, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, биспецифический scFv и диатела (Holliger и Hudson, Nature Biotechnology, 9, p. 1126-1136 (2005)).

В другом объекте настоящего изобретения предлагается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как описано в данном контексте, предназначенное для применения в качестве лекарственного средства. Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как описано в данном контексте, предназначено для применения при профилактике, лечении или ослаблении интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D. Подробное описание указанного объекта приведено ниже в разделе "Лечение и применение в медицинских целях", а также в контексте фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Молекула нуклеиновой кислоты.

В другом объекте настоящего изобретения предлагается молекула нуклеиновой кислоты, включающая полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, как описано выше. Примеры молекул нуклеиновых кислот и/или полинуклеотидов включают, например, рекомбинантный полинуклеотид, вектор, олигонуклеотид, молекулу РНК, такую как рибосомальная РНК (рРНК), матричная РНК (мРНК), микроРНК, малая интерферирующая РНК (миРНК) или транспортная РНК (тРНК), или молекулу ДНК, такую как комплементарная ДНК (кДНК). Предпочтительными являются нуклеотидные последовательности, кодирующие или все легкие и тяжелые цепи или их часть, а также CDR области из антител по настоящему изобретению. В табл. 2-8 приведены номера (SEQ ID) аминокислотных последовательностей CDR областей, а также VH и VL типичных антител по настоящему изобретению, которые предпочтительно кодируются полинуклеотидами/последовательностями нуклеиновых кислот, как описано в данном контексте. Таким образом, в настоящем изобретении предпочтительно предлагаются нуклеотидные последовательности, кодирующие или все легкие и тяжелые цепи или их часть, прежде всего последовательности VH и VL областей, а также CDR типичных антител по настоящему изобретению. В табл. 9 представлены номера SEQ ID нуклеотидных последовательностей, кодирующих CDR области, а также VH и VL области типичных антител по настоящему изобретению. Благодаря вырожденности генетического кода настоящее изобретение включает также варианты последовательностей указанных нуклеотидных последовательностей и прежде всего такие варианты последовательностей, которые кодируют одинаковые аминокислотные последовательности.

Молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, включающую и предпочтительно состоящую из компонентов нуклеиновой кислоты. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" предпочтительно относится к молекулам ДНК или РНК. Прежде всего, он используется как синоним термину "полинуклеотид". Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полимер, включающий нуклеотидные мономеры или состоящий из них, которые ковалентно связаны друг с другом фосфодиэфирными связями в основной сахариднофосфатной цепи. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" также включает молекулы модифицированных нуклеиновых кислот, такие как молекулы ДНК

или РНК с модифицированными основаниями, с модифицированными сахарами или с модифицированной основной цепью и т.п.

В табл. 9 представлены последовательности нуклеиновых кислот CDR областей, а также вариативной области тяжелой цепи (VH) и вариативной области легкой цепи (VL) типичных антител по настоящему изобретению ("HBC34", "HBC34v7", "HBC34v23", "HBC34v31", "HBC34v32" и "HBC34v33").

Таблица 9

Название	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновой кислоты
HBC34		
CDRH1	43	GGACGCATCTTTAGAAGTTTTTAC
CDRH2	44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA
CDRH3	45	GCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTATGGACGTC
CDRL1	46	AAATTGGGGAATAAAAAAT
CDRL2	47	GAGGTAAAA
длинный вариант CDRL2	48	gtcatctatGAGGTAAAtaccgcccc
CDRL3	49	CAGACGTGGGACAGCACCCTGTGGTG
VH	50	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCGGGGGGTCCAGAGACTGTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCTTTAGAAGTTTTTACATGAGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACTATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAATTATATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTATTCTGCAAATGAACAACCTGAGAGTCGAGGACACGGCGTTTATTACTGCGCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTATGGACGCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCTCCGTCTCTCA
VL	51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCTGTCCCGCAGGACAGACAGTCAGCATCCCCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGAATAAAAAATGTTTGTGGTTTCAGCATAAGCCAGGCCAGTCCCTGTGTGGTCTATATGAGGTAAATACCGCCCTCGGGGATTCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGATGAGGCTGCCTATTTCTGTCAGACGTGGGACAGCACCCTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACAGGCTGACCGTCTCA
кодон-оптимизированная VH	70	GAAGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGAGGGTGGGTCCAGCCGGAGGGAGCCAGAGACTGTCCTGTGCAGCATCAGGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTACATGTCTGGGTGCGCCAGGCACCAAGGCAAGGACTGGAGTGGGTGCGCCACCATCAACCAGGACGGATCTGAAAGCTGTATGTGGATAGTGTCAAAGGCCGGTTCACAATTAGCAGAGACAACGCTAAAAATTCTCTGTTCTGCAGATGAACAATCTGCGAGTGGAGGATACGCGGTCTACTATTGCGCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATGTCTGGGGCAGGGCACAACAGTGAGCGTCTCTCC
HBC34 v31, HBC34 v32 и HBC34 v33 VH	68	GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGCGGGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGTGTCAGCTTCTGGAAGAATCTTCAGATCTTTTACATGAGTTGGGTGAGACAGGCTCCTGGGAAGGGACTGGAGTGGGTGCAACATCAATCAGGACGGATCAGAAAGCTGTATGTGGATAGCGTCAAAGGCAGGTTCACTATTCCCGCGACAACGCCAAAAATTCTGTCTGTCAGATGAACAATCTGCGGTTGGAGGATACCGCTGTCTACTATTGTGCAGCTGGTCTGGCAACAGTGGAGGCATGGACGTGTGGGGACAGGGAACCAAGTGACAGTCAGCTCC
VL v23	69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTGTCCGCTCTCTCCAGGCCAGACAGCATCCATCACTTGCTCTGGCACAAGCTGGGGAACAAAAATGCCTGTTGGTATCAGCAGAAAGCCAGGGCAGAGTCCCGTGCTGGTCTATCTACGAGGTGAAATATCGGCCTTCAGGAATTCAGAAAAGATTCAGTGGATCAAACAGCGGCAATAC TGCTACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCATGACGAAGCTGATTACTATTGCCAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTCTTGGCGGGGAACTAAGCTGACCGTGCTG

кодон- оптимизированная VL	71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTCTCCGT CTCACCTGGACAGACCGTCTCAATCCCCTGCTCCG GCGAT AAACTGGGCAACAAGAACGTGTGCTGGTTCCAGC ACAAACCCGGACAGAGTCTGTGCTGGTCATCTA CGAGGTCAAGTATCGGCCAAGCGGCATTCCCGAA AGATTACGCGGCTCCAACCTCTGGGAATACCGCAA CACTGACTATCTCTGGAACCCAGGCAATGGACGA GGCAGCTTACTTTTGCCAGACTTGGGATTCAACTA CTGTCTGTGTTCCGCGGCGGAAGTAGACTGACTGT CCTG
кодон- оптимизированная CRDH1	72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC
кодон- оптимизированная CDRH2	73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG
кодон- оптимизированная CDRH3	74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATG TC
кодон- оптимизированная CDRL1	75	AAACTGGGCAACAAGAAC
кодон- оптимизированная CDRL2	76	GAGGTCAAG
длинный вариант кодон- оптимизированной CDRL2	77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA
кодон- оптимизированная CDRL3	78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCTGTG
HBC34v7, HBC34v23, HBC34 v31, HBC34 v32 и HBC34 v33		
CDRL1 v7 и CDRL1 v23	60	AAGCTGGGGAACAAAAAT
CDRL2 v7 и CDRL2 v23	61	GAGGTGAAA
длинный вариант CDRL2 v7 и длинный вариант CDRL2 v23	62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT
CDRL3 v7 и CDRL3 v23	63	CAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTC
VL v7	64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTGTCCG TCTCTCCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCTCT GGCGACAAGCTGGGGAACAAAAATGTCTGTGGT TCCAGCACAAGCCAGGCGAGAGTCCCGTGTGGT CATCTACGAGGTGAAATATCGGCCTTCAGGAATT CCAGAACGGTTCAGCGGATCAACAGCGGCAATA CTGCAACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCAT GGACGAAGCGCTTATTCTGCCAGACATTGATT CCACCACAGTGGTCTTTGGCGGGGAAGTAGGCT GACCGTGTG

Предпочтительно последовательность молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включает последовательности нуклеиновой кислоты согласно любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51 или состоит из нее или из функционального варианта указанной последовательности. Последовательность молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также предпочтительно включает последовательности нуклеиновой кислоты согласно любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51, 60-64 и 68-78 или состоит из них.

Последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению также предпочтительно включают последовательности нуклеиновых кислот, которые по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, 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% идентичны нуклеиновой кислоте, кодирующей CDR область, последовательность VH и/или последовательность VL, использованные в составе типичного антитела по настоящему изобретению, например, последовательности, приведенные в табл. 9.

В связи с этим молекула нуклеиновой кислоты является предпочтительной, если полинуклеотидная последовательность включает последовательности нуклеиновой кислоты согласно любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51 или состоит из нее или из функционального варианта указанной последовательности. Предпочтительна также молекула нуклеиновой кислоты, в которой полинуклеотидная последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и прежде всего предпочтительно по меньшей мере на 98 или 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51, 60-64 и 68-78. Более предпочтительно полинуклеотидная последовательность

включает последовательность нуклеиновой кислоты согласно любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51, 60-64 и 68-78 или состоит из нее.

Более предпочтительно полинуклеотидная последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и прежде всего предпочтительно по меньшей мере на 98 или 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 70-78. Последовательности SEQ ID NO: 70-78 являются кодон-оптимизированными нуклеотидными последовательностями (см. табл. 9). Полинуклеотидная последовательность прежде всего предпочтительно включает последовательность нуклеиновой кислоты согласно любой из последовательностей SEQ ID NO: 70-78 или состоит из нее.

В основном молекулу нуклеиновой кислоты можно использовать, чтобы вставлять, удалять или изменять определенные нуклеотидные последовательности. Изменения в результате таких операций включают, но не ограничиваясь только ими, изменения для включения участков рестрикции, корректировки применения кодонов, добавления или оптимизации транскрипционных и/или трансляционных регуляторных последовательностей и т.п. Нуклеиновую кислоту также можно изменять, чтобы изменить кодируемые аминокислоты. Например, может быть полезным включение в аминокислотную последовательность антитела одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т.п.) аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Такие точечные мутации позволяют модифицировать эффекторные функции, антигенсвязывающую аффинность, посттрансляционные модификации, иммуногенность и т.п., позволяют вставлять аминокислоты для присоединения ковалентных групп (например, метки) или позволяют включать маркеры (например, в целях очистки). Мутации можно включать в специфические участки или можно включать случайным образом с последующей селекцией (например, молекулярная эволюция). Например, в одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих любую из CDR областей, последовательностей VH и/или VL типичного антитела по настоящему изобретению можно проводить случайную или направленную мутацию, чтобы придать различные свойства кодируемым аминокислотам. Такие изменения могут являться результатом итеративного (повторяющегося) процесса, в ходе которого сохраняются исходные изменения и при этом включают новые изменения в других положениях нуклеотидов. Кроме того, можно комбинировать изменения, достигнутые на независимых стадиях. Различные свойства, включенные в кодируемые аминокислоты, могут включать, но не ограничиваясь только ими, повышенную аффинность.

Вектор.

В объем настоящего изобретения включены, кроме того, векторы, например, векторы экспрессии, включающие молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Предпочтительно вектор включает описанную выше молекулу нуклеиновой кислоты.

Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, т.е. к молекуле нуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе. В контексте настоящего изобретения вектор пригоден для включения или экспрессии требуемой последовательности нуклеиновой кислоты. Такие векторы могут представлять собой векторы хранения, векторы экспрессии, клонирующие векторы, векторы для переноса генов и т.п. Вектор хранения представляет собой вектор, который обеспечивает соответствующее хранение молекулы нуклеиновой кислоты. Таким образом, вектор может включать последовательность, соответствующую, например, требуемому антителу или его фрагменту по настоящему изобретению. Вектор экспрессии можно использовать для получения продуктов экспрессии, таких как РНК, например, мРНК, или пептиды, полипептиды или белки. Например, вектор экспрессии может включать последовательности, необходимые для транскрипции участка последовательности в составе вектора, такой как последовательность промотора. Клонировующий вектор, как правило, представляет собой вектор, содержащий участок клонирования, который можно использовать для включения последовательностей нуклеиновых кислот в вектор. Клонировующий вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор или вектор бактериофага. Вектор для переноса генов может представлять собой вектор, который можно использовать для переноса молекул нуклеиновых кислот В-клетки или в организмы, например, векторы вирусов. В контексте настоящего изобретения вектор может представлять собой, например, вектор РНК или вектор ДНК. Предпочтительно вектором является молекула ДНК. Например, в контексте настоящего изобретения вектор включает участок клонирования, маркер селекции, такой как фактор устойчивости к антибиотику, и последовательность, пригодную для размножения вектора, такую как точка начала репликации. Предпочтительно, в контексте настоящей заявки вектором является плазмидный вектор.

Клетки.

В следующем объекте настоящего изобретения предлагается также клетка, экспрессирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и/или включающая вектор по настоящему изобретению.

Примеры таких клеток включают, но не ограничиваясь только ими, эукариотические клетки, например дрожжевые клетки, клетки животных или клетки растений. Предпочтительно клетками являются

клетки млекопитающих, более предпочтительно клеточная линия млекопитающих. Предпочтительные примеры включают клетки человека, клетки CHO, клетки HEK293T, клетки PER.C6, клетки NS0, клетки печени человека, например, клетки Нера RG, миеломные клетки или клетки гибридомы.

Прежде всего, клетку можно трансфектировать вектором по настоящему изобретению, предпочтительно вектором экспрессии. Термин "трансфекция" относится к введению молекул нуклеиновых кислот, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК) В-клетки, предпочтительно в эукариотические клетки. В контексте настоящего изобретения термин "трансфекция" включает любой известный специалисту в данной области техники способ введения молекул нуклеиновых кислот В-клетки, предпочтительно в эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. Такие способы включают, например, электропорацию, липофекцию, например основанную на катионных липидах и/или липосомах, осаждение в присутствии фосфата кальция, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вирусов или трансфекцию на основе катионных полимеров, таких как диэтиламиноэтил (ДЭАЭ) - декстран или полиэтиленминимин и т.п. Предпочтительно введение является не вирусным.

Кроме того, клетки по настоящему изобретению можно стабильно или временно трансфектировать вектором по настоящему изобретению, например, для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Предпочтительно клетки стабильно трансфектируют вектором по настоящему изобретению, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. В другом варианте клетки также предпочтительно временно трансфектируют вектором по настоящему изобретению, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

Необязательные дополнительные признаки антител.

Антитела по настоящему изобретению можно присоединять, например, к лекарственному средству для доставки в участок лечения или присоединять к детектируемой метке, чтобы способствовать визуализации участка, включающего исследуемые клетки. Способы присоединения антител к лекарственным средствам и детектируемым меткам известны в данной области техники, так как они представляют собой способы визуализации с использованием детектируемых меток. Меченые антитела можно использовать во множестве методов анализа, в которых применяют множество меток. Детектирование образования комплекса антитело-антиген между антителом по настоящему изобретению и исследуемым эпитопом в составе HBsAg, прежде всего в антигенной петлевой области HBsAg, можно ускорить за счет присоединения к антителу детектируемого вещества. Пригодные способы детектирования включают применение меток, таких как радионуклиды, ферменты, коферменты, флуорофоры, хемилюминесцентные реагенты, хромогены, субстраты ферментов или ко-факторы, ингибиторы ферментов, комплексы простетических групп, свободные радикалы, частицы, красители и т.п. Примеры пригодных ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, Р-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу, примеры пригодных комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин, примеры пригодных флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоционат, родамин, диэтилтриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин, примером люминесцентного материала является люминол, примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин, а примеры пригодных радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , или ^3H . Такие реагенты-метки можно использовать при проведении различных известных анализов, таких как радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), флуоресцентный иммуноанализ и т.п. В связи с этим меченые антитела по настоящему изобретению можно использовать при проведении указанных анализов, например, как описано в патентах US 3766162, US 3791932, US 3817837 и US 4233402.

Антитело по настоящему изобретению можно конъюгировать с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин, терапевтическим агентом или ионом радиоактивного металла или радиоизотопом. Примеры радиоизотопов включают, но не ограничиваясь только 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 можно использовать для модификации данной биологической ответной реакции, при этом строение фрагмента лекарственного средства не ограничивается классическими химическими терапевтическими агентами. Например, фрагмент лекарственного средства может представлять собой белок или полипептид, характеризующийся требуемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин.

Методики конъюгации таких терапевтических фрагментов с антителами известны. См., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy" в книге "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", ред. Reisfeld et al., Alan R. Liss, Inc., p. 243-256 (1985), Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery" в книге "Controlled Drug Delivery", ред. Robinson et al., 2 изд., Marcel Dekker, Inc., p. 623-653 (1987), Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" в книге "Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications", ред. Pinchera et al., Editrice Kurtis, Милан, Италия, p. 475-506 (1985), "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radio-labeled Antibody in Cancer Therapy" в книге "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", ред. Baldwin et al., Academic Press, Нью-Йорк, p. 303-316 (1985) и Thorpe et al., Immunol. Rev., 62, p. 119-158

(1982).

В другом варианте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно конъюгировать со вторым антителом или с фрагментом антитела, при этом получают гетероконъюгат антител, как описано в патенте US 4676980. Кроме того, между метками и антителами по настоящему изобретению можно включать линкеры, как описано в патенте US 4831175. К антителам или их антигенсвязывающим фрагментам можно напрямую присоединять радиоактивный йод, индий, иттрий или другую радиоактивную частицу, известную в данной области техники, например, как описано в патенте US 5595721. Лечение может включать комбинацию способов лечения, с использованием конъюгированных и неконъюгированных антител, которые вводят одновременно или последовательно, например, как описано в заявках WO 00/52031, WO 00/52473.

Антитела по настоящему изобретению также можно присоединять к твердой подложке. Кроме того, антитела по настоящему изобретению или их функциональные фрагменты можно модифицировать химическим методом ковалентной конъюгации с полимером, например, чтобы увеличить их период полураспада в кровотоке. Примеры полимеров и способов их присоединения к пептидам приведены в патентах US 4766106, US 4179337, US 4495285 и US 4609546. В некоторых вариантах полимеры можно выбрать из полиоксиэтилированных полиолов и полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ растворим в воде при комнатной температуре и характеризуется общей формулой $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R может обозначать водород или защитную группу, такую как алкильная или алканольная группа. Предпочтительно защитная группа может содержать от 1 до 8 атомов углерода. Например, защитной группой является метил. Индекс "n" обозначает положительное целое число. В одном варианте n равен от 1 до 1000. В другом варианте n равен от 2 до 500. Предпочтительно ПЭГ характеризуется средней молекулярной массой от 1000 до 40000, более предпочтительно ПЭГ характеризуется средней молекулярной массой от 2000 до 20000, еще более предпочтительно ПЭГ характеризуется средней молекулярной массой от 3000 до 12000. Кроме того, ПЭГ может содержать по крайней мере одну гидроксильную группу, например ПЭГ может содержать концевую гидроксильную группу. Например, именно концевую гидроксильную группу активируют для взаимодействия со свободной аминогруппой в составе ингибитора. Однако следует понимать, что для получения ковалентно конъюгированного ПЭГ/антитела по настоящему изобретению тип и число реакционноспособных групп можно изменять.

Согласно настоящему изобретению можно также использовать водорастворимые полиоксиэтилированные полиолы. Указанные соединения включают полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу, полиоксиэтилированный глицерин (ПОГ) и т.п. В одном варианте используют ПОГ. В связи с тем, что основная цепь глицерина в составе полиоксиэтилированного глицерина представляет собой цепь, аналогичную природному глицерину, например, в моно-, ди-, триглицеридах животных и человека, без ссылки на какую-либо теорию полагают, что такое разветвленное соединение не обязательно следует рассматривать как чужеродный агент в организме. ПОГ может характеризоваться молекулярной массой в том же диапазоне, как и ПЭГ. Другой системой для доставки лекарственных средств, которую можно использовать для увеличения периода полураспада в кровотоке, является липосома. Способы получения липосомальных систем доставки известны специалисту в данной области техники. В данной области техники известны другие системы для доставки лекарственных средств и описаны, например, в книгах Poznansky и др. (1980) и Poznansky (1984).

Антитела по настоящему изобретению можно получить в очищенной форме. Как правило, антитело присутствует в композиции, которая в основном не содержит другие полипептиды, при этом другие полипептиды составляют, например, менее 90 мас.%, обычно менее 60 мас.% и более типично менее 50 мас.% композиции.

Антитела по настоящему изобретению могут проявлять иммуногенность в организмах хозяина, не относящихся к человеку (или гетерологичных), например в организме мышей. Прежде всего, антитела могут содержать идиотоп, который является иммуногенным в организмах хозяина, не относящихся к человеку, но не в организме человека. Прежде всего, антитела по настоящему изобретению, предназначенные для применения при лечении человека, включают такие антитела, которые нельзя выделить простым способом из организмов хозяина, таких как мыши, козы, кролики, крысы, млекопитающие, не относящиеся к отряду приматов, и т.п., и, как правило, нельзя получить гуманизацией или из ксено-мышей.

Получение антител.

Антитела по настоящему изобретению можно получить любым способом, известным в данной области техники. Например, известна общая методология получения моноклональных антител с использованием гибридомной технологии (Kohler G. и Milstein C. (1975), Kozbar и др. (1983)). В одном варианте используют альтернативный способ иммортализации вируса Эпштейна-Барра (ВЭБ), описанный в заявке WO 2004/076677.

Предпочтительный способ описан в заявке WO 2004/076677. В указанном способе В-клетки, продуцирующие антитело по настоящему изобретению, трансформируют вирусом ВЭБ и поликлональным активатором В-клеток. На стадии трансформации необязательно можно добавлять дополнительные агенты, стимулирующие клеточный рост и дифференциацию, чтобы дополнительно повысить эффективность. Указанные стимулирующие агенты могут представлять собой цитокины, такие как IL-2 и IL-15. В

одном объекте для дополнительного повышения эффективности на стадии иммортализации добавляют IL-2, однако его применение не играет значительной роли. Затем иммортализованные В-клетки, полученные указанными способами, можно культивировать с использованием способов, известных в данной области техники, и выделять.

Другой предпочтительный способ описан в заявке WO 2010/046775. В указанном способе плазматические клетки культивируют в ограниченных количествах или в качестве единичных плазматических клеток в микролуночных культуральных планшетах. Антитела можно выделять из культур плазматических клеток. Кроме того, из культур плазматических клеток можно экстрагировать РНК и проводить полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием известных в данной области техники способов. Области V_H и V_L в составе антител можно амплифицировать методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), секвенировать и клонировать в векторе экспрессии, который затем трансфектируют В-клетки HEK293T или в другие клетки хозяина. Клонирование нуклеиновой кислоты в векторах экспрессии, трансфекцию клеток хозяина, культивирование трансфектированных клеток хозяина и выделение продуцируемого антитела можно проводить с использованием любых способов, известных специалисту в данной области техники.

Затем антитела можно при необходимости дополнительно очищать с использованием фильтрации, центрифугирования и различных хроматографических методов, таких как ВЭЖХ или аффинная хроматография. Методы очистки антител, например, моноклональных антител, включая методы получения антител фармацевтической степени чистоты известны в данной области техники.

Фрагменты антител по настоящему изобретению можно получить из антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей в условиях химического восстановления. В другом варианте, фрагменты антител можно получить клонированием и экспрессией части последовательности тяжелой или легкой цепей. "Фрагменты" антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты. Настоящее изобретение также включает одноцепочечные Fv фрагменты (scFv), полученные из тяжелой и легкой цепей антитела по настоящему изобретению. Например, настоящее изобретение включает scFv, содержащий CDR области из антитела по настоящему изобретению. Включены также мономеры и димеры тяжелой или легкой цепей, однодоменные антитела, состоящие из тяжелых цепей, однодоменные антитела, состоящие из легких цепей, а также одноцепочечные антитела, например одноцепочечное Fv, в котором вариабельные области тяжелой и легкой цепей соединены через пептидный линкер.

Фрагменты антител по настоящему изобретению могут придавать способность к моновалентным или мультивалентным взаимодействиям и содержаться в различных структурах, как описано выше. Например, чтобы сконструировать трехвалентное "триатело" или четырехвалентное "тетратело", можно синтезировать молекулы scFv. Молекулы scFv можно включать в домен Fc области, при этом получают двухвалентные мини-тела. Кроме того, последовательности по настоящему изобретению могут являться компонентом мультиспецифичных молекул, в которых последовательности по настоящему изобретению направленно связываются с эпитопами по настоящему изобретению, а другие области молекул связываются с другими мишенями. Типичные молекулы включают, но не ограничиваясь только ими, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, биспецифический scFv и диатела (Holliger и Hudson, Nature Biotechnology, 9, p. 1126-1136 (2005)).

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих антитела или фрагменты антител по настоящему изобретению, можно использовать стандартные методы молекулярной биологии. Требуемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично с использованием методов олигонуклеотидного синтеза. В зависимости от конкретного случая можно использовать сайт-направленный мутагенез и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антител по настоящему изобретению или их фрагменты, можно использовать любую пригодную систему клетки хозяина/вектор. Для экспрессии фрагментов антител, таких как Fab и F(ab')₂ фрагменты, и прежде всего Fv фрагменты и одноцепочечные фрагменты антител, например, одноцепочечный Fv можно частично использовать бактериальные системы, например E. coli, и другие микробные системы. Для продуцирования более крупных молекул антител, включая полные молекулы антител, можно использовать экспрессионные системы на основе эукариотических клеток хозяина, например млекопитающих. Пригодные клетки хозяина млекопитающих включают, но не ограничиваясь только ими, клетки CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, миеломные клетки или клетки гибридомы.

В настоящем изобретении предлагается также способ получения молекулы антитела по настоящему изобретению, включающий культивирование клетки хозяина, содержащей вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, в условиях, пригодных для экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему изобретению, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела может включать только полипептид тяжелой или легкой цепи, в указанном случае для трансфекции клеток хозяина необходимо использовать только последовательность, кодирующую полипептид тяжелой или легкой цепи. Для получения продуктов, включающих обе тяжелую и легкую цепи, клеточную линию можно трансфектировать двумя векторами, при этом первый вектор кодирует

полипептид легкой цепи, а второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. В другом варианте можно использовать единичный вектор, включающий последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

В другом варианте, антитела по настоящему изобретению можно получить с использованием следующих стадий: (i) экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в В-клетке хозяина, например, с использованием вектора по настоящему изобретению и (ii) выделение экспрессированного антитела. Кроме того, способ может включать (iii) очистку выделенного антитела. В отношении требуемой специфичности или функции указанных полученных антител можно проводить скрининг трансформированных В-клеток и культивированных плазматических клеток.

Стадию скрининга можно проводить с использованием любого метода иммуноанализа, например, ИФА, окрашивание тканей или клеток (включая трансфектированные клетки), анализ на нейтрализацию, или любого метода анализа из ряда других методов анализа, известных в данной области техники для идентификации требуемой специфичности или функции. Анализ можно выбрать на основе простого распознавания одного или более антигенов или можно выбрать на дополнительной основе требуемой функции, например, чтобы выбрать нейтрализующие антитела, а не только антигенсвязывающие антитела, чтобы выбрать антитела, которые способны изменять характеристики клеток-мишеней, такие как их сигнальные каскады, их форма, скорость роста, способность оказывать влияние на другие клетки, ответная реакция на влияние других клеток или других реагентов или на изменение условий, статус дифференциации и т.п.

Затем из положительной культуры трансформированных В-клеток можно получить индивидуальные клоны трансформированных В-клеток. Стадию клонирования для выделения индивидуальных клонов из смеси положительных клеток можно проводить с использованием ограниченного разведения, микро-манипуляции, осаждения одиночных клеток при клеточной сортировке или другим способом, известным в данной области техники.

Нуклеиновую кислоту из культивированных плазматических клеток можно выделять, клонировать и экспрессировать в В-клетках НЕК293Т или в других известных клетках хозяина с использованием способов, известных в данной области техники.

Клоны иммортализованных В-клеток или трансфектированных клеток хозяина по настоящему изобретению можно использовать различными способами, например, в качестве источника моноклональных антител, в качестве источника нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), кодирующей требуемое моноклональное антитело, для исследований и т.п.

В настоящем изобретении предлагается также композиция, включающая иммортализованные В-клетки памяти или трансфектированные клетки хозяина, которые продуцируют антитела по настоящему изобретению.

Клон иммортализованных В-клеток или культивированные плазматические клетки по настоящему изобретению можно также использовать в качестве источника нуклеиновой кислоты для клонирования генов антитела для последующей рекомбинантной экспрессии. Экспрессия из рекомбинантных источников является наиболее распространенным методом, который используют в фармацевтических целях, чем экспрессия из В-клеток или гибридом, например, по причинам стабильности, воспроизводимости, простоты культивирования и т.п.

В связи с этим в настоящем изобретении также предлагается способ получения рекомбинантной клетки, включающий следующие стадии: (i) получение одной или более нуклеиновых кислот (например, мРНК тяжелой и/или легкой цепи) из клона В-клеток или из культивированных плазматических клеток, которые кодируют требуемое антитело, (ii) включение нуклеиновой кислоты в вектор экспрессии и (iii) трансфекция вектора В-клетку хозяина, при этом обеспечивают экспрессию требуемого антитела в В-клетке хозяина.

Аналогичным образом, в настоящем изобретении предлагается способ получения рекомбинантной клетки, включающий следующие стадии: (i) секвенирование нуклеиновой(ых) кислоты(т) из клона В-клеток или из культивированных плазматических клеток, которые кодируют требуемое антитело, и (ii) использование информации о последовательности, полученной на стадии (i), для получения нуклеиновой(ых) кислоты(т) для включения в В-клетку хозяина, при этом обеспечивают экспрессию требуемого антитела в указанной клетке хозяина. Нуклеиновую кислоту необязательно можно обрабатывать между стадиями (i) и (ii), чтобы включить участки рестрикции, корректировать использование кодонов и/или оптимизировать транскрипционные и/или трансляционные последовательности.

Кроме того, в настоящем изобретении также предлагается способ получения трансфектированной клетки хозяина, включающий стадию трансфекции клетки хозяина одной или более нуклеиновыми кислотами, которые кодируют требуемое антитело, при этом нуклеиновыми кислотами являются нуклеиновые кислоты, которые получают из клона иммортализованных В-клеток или из культивированных плазматических клеток по настоящему изобретению. В связи с этим методы, включающие, во-первых, получение нуклеиновой(ых) кислоты(т) и затем ее использование для трансфекции клетки хозяина, могут осуществлять различные люди в различные периоды времени в различных местах (например, в различных странах).

Указанные рекомбинантные клетки по настоящему изобретению можно затем использовать для экспрессии и для культивирования. Такие клетки, прежде всего, пригодны для экспрессии антител при широкомасштабном фармацевтическом производстве. Их также можно использовать в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции. Можно использовать любой пригодный метод культивирования, включая, но не ограничиваясь только ими, статическое культивирование, культивирование в роллерных флаконах, в асцитной жидкости, в биореакторе с системой половолоконных картриджей, в модульном мини-ферментере, в биореакторе с мешалкой, культивирование на микроносителях, в перфузионном биореакторе с керамическим наполнителем и т.п.

Способы получения и секвенирования генов иммуноглобулина из В-клеток или из плазматических клеток известны в данной области техники (см., например, главу 4 книги Kuby, Immunology, 4^{ое} изд. (2000)).

Трансфектированная клетка хозяина может представлять собой эукариотическую клетку, включая дрожжевые клетки и клетки животных, прежде всего клетки млекопитающих (например, клетки CHO, клетки NS0, клетки человека, такие как клетки PER.C6 или HKB-11, миеломные клетки или клетки печени человека, такие как Нера RG), а также клетки растений, при этом клетки млекопитающих являются предпочтительными. Предпочтительные экспрессирующие организмы способны гликозилировать антитело по настоящему изобретению, прежде всего углеводородными структурами, которые сами по себе не являются иммуногенными в организме человека. В одном варианте трансфектированная клетка хозяина может расти в бессывороточной среде. В другом варианте трансфектированная клетка хозяина может расти в культуре в отсутствие продуктов животного происхождения. Трансфектированную клетку хозяина также можно культивировать, чтобы получить клеточную линию.

В настоящем изобретении предлагается также способ получения одной или более молекул нуклеиновых кислот (например, генов тяжелой и легкой цепей), которые кодируют требуемое антитело, включающий стадии: (i) получение клона иммортализованных В-клеток или культивирование плазматических клеток по настоящему изобретению, (ii) получение нуклеиновой кислоты, которая кодирует требуемое антитело, из клона В-клеток или из культивированных плазматических клеток. Кроме того, в настоящем изобретении предлагается способ получения последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует требуемое антитело, включающий стадии: (i) получение клона иммортализованных В-клеток или культивирование плазматических клеток по настоящему изобретению, (ii) секвенирование нуклеиновой кислоты, которая кодирует требуемое антитело, из клона В-клеток или из культивированных плазматических клеток.

В настоящем изобретении, кроме того, предлагается способ получения молекулы(л) нуклеиновой кислоты, которая кодирует требуемое антитело, включающий стадию получения нуклеиновой кислоты, полученной из клона трансформированных В-клеток или из культивированных плазматических клеток по настоящему изобретению. Таким образом, методы, включающие сначала получение клона В-клеток или культивированных плазматических клеток и затем получение нуклеиновой кислоты(т) из клона В-клеток или из культивированных плазматических клеток, могут осуществлять различные люди в различные периоды времени в различных местах (например, в различных странах).

Настоящее изобретение также включает способ получения антитела (например, для фармацевтического применения) по настоящему изобретению, включающий стадии: (i) получение и/или секвенирование одной или более молекул нуклеиновой кислоты (например, генов тяжелой и легкой цепей) из выбранного клона В-клеток или из культивированных плазматических клеток, экспрессирующих требуемое антитело, (ii) вставка нуклеиновой(ых) кислоты(т) или использование последовательности(ей) нуклеиновой(ых) кислоты(т) для получения вектора экспрессии, (iii) трансфекция клетки хозяина, которая способна экспрессировать требуемое антитело, (iv) культивирование или субкультивирование трансфектированных клеток хозяина в условиях, в которых экспрессируется требуемое антитело, и, необязательно, (v) очистка требуемого антитела.

В настоящем изобретении также предлагается способ получения антитела, включающий следующие стадии: культивирование или субкультивирование популяции трансфектированных клеток хозяина, например, популяции стабильно трансфектированных клеток хозяина, в условиях, при которых экспрессируется требуемое антитело, и, необязательно, очистка требуемого антитела, причем указанную популяцию трансфектированных клеток хозяина получают в результате проведения следующих стадий: (i) получение нуклеиновой(ых) кислоты(т), кодирующей выбранное антитело, которое продуцируется клоном В-клеток или культивированными плазматическими клетками, полученными, как описано выше, (ii) вставка нуклеиновой(ых) кислоты(т) в вектор экспрессии, (iii) трансфекция вектора В-клетку хозяина, которая способна экспрессировать требуемое антитело, и (iv) культивирование или субкультивирование трансфектированной клетки хозяина, включающей вставленные нуклеиновые кислоты, для получения требуемого антитела. Таким образом, методы, включающие сначала получение рекомбинантной клетки хозяина и затем ее культивирование для экспрессии антитела, могут осуществлять различные люди в совершенно различные периоды времени в различных местах (например, в различных странах).

Фармацевтические композиции.

В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, включающая один

или более из ниже перечисленных материалов:

- (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению,
- (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению,
- (iii) вектор, включающий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, или
- (iv) клетка, экспрессирующая антитело по настоящему изобретению или включающая вектор по настоящему изобретению.

Другими словами, в настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению и/или клетку по настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция предпочтительно также может содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент. Хотя носитель или эксципиент может облегчать введение, он сам по себе не должен индуцировать продуцирование антител, вредных для индивидуума, которому вводят композицию. Носитель также не должен оказывать токсическое действие. Пригодные носители могут представлять собой крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и инактивированные вирусные частицы. В основном фармацевтически приемлемые носители в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут представлять собой активные компоненты или неактивные компоненты. Предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель в фармацевтической композиции по настоящему изобретению является неактивным компонентом в отношении гепатита В или D.

Можно использовать фармацевтически приемлемые соли, например соли неорганических 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 включать 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 агенты для регуляции pH (буферные вещества). Указанные носители позволяют перерабатывать фармацевтические композиции в таблетки, пилюли, драже, капсулы, жидкости, гели, сиропы, эмульсии и суспензии, предназначенные для приема внутрь субъектом.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно получить в различных формах. Например, композиции можно получить в виде препаратов для инъекций, или в виде жидких растворов, или суспензий. Можно также получить твердые формы, которые перед инъекцией можно растворить в жидких носителях для получения раствора или суспензии (например, лиофилизованная композиция, аналогичная продуктам Synagis™ и Herceptin™, предназначенная для разведения стерильной водой, содержащей консервант). Композицию можно получить для местного введения, например, в виде мази, крема или порошка. Композицию можно получить для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея или сиропа (необязательно в смеси с ароматизатором). Композицию можно получить для пульмонального введения, например, в виде ингаляционного препарата, используя тонкодисперсный порошок, или в виде спрея. Композицию можно получить в виде суппозитория или вагинального суппозитория. Композицию можно получить для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Композицию можно представить в форме набора, созданного таким образом, что непосредственно перед введением субъекту комбинированную композицию растворяют повторно. Например, лиофилизованное антитело можно представлять в наборе со стерильной водой или стерильным буферным раствором.

Предпочтительно активным ингредиентом в композиции является молекула антитела, фрагмент антитела или его варианты и производные, прежде всего, активным ингредиентом в композиции является антитело, фрагмент антитела или его варианты и производные по настоящему изобретению. Сам по себе активный ингредиент может подвергаться деградации в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композиция предназначена для введения способом с использованием желудочно-кишечного тракта, композиция может содержать агенты, которые защищают антитело от деградации, но которые высвобождают антитело после его абсорбции из желудочно-кишечного тракта.

Подробное описание фармацевтически приемлемых носителей приведено в справочнике Gennaro Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20 изд., ISBN: 0683306472 (2000).

Значением pH фармацевтических композиций по настоящему изобретению обычно составляет от 5,5 до 8,5, в некоторых вариантах pH может составлять от 6 до 8, а в других вариантах pH может составлять приблизительно 7. Значение pH можно поддерживать при использовании буферного вещества. Композиция может быть стерильной и/или апиrogenной. Композиция может быть изотонической в отношении человека. В одном варианте фармацевтические композиции по настоящему изобретению поставляют в герметично закрытых контейнерах.

В объем настоящего изобретения включены композиции в нескольких формах введения, которые

включают, но не ограничиваясь только ими, такие формы, которые пригодны для парентерального введения, например, инъекцией или вливанием, например, струйным вливанием или непрерывным вливанием. Если продукт предназначен для инъекции или вливания, его можно получить в форме суспензии, раствора или эмульсии в масляном или в водном носителе, и он может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие агенты, консерванты, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В другом варианте молекулу антитела можно представить в сухой форме, предназначенной для растворения перед применением в пригодной стерильной жидкости. Носитель, как правило, означает материал, который пригоден для хранения, транспортировки и/или введения соединения, такого как фармацевтически активное соединение, прежде всего антитела по настоящему изобретению. Например, носитель может представлять собой физиологически приемлемую жидкость, которая пригодна для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтически активного соединения, прежде всего антител по настоящему изобретению. После получения лекарственной формы композиции по настоящему изобретению можно вводить напрямую субъекту. В одном варианте состав композиции оптимизируют для введения млекопитающему, например, человеку.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить рядом способов, включая, но не ограничиваясь только ими, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриаартериальный, костномозговой, внутрибрюшинный, внутриоболочечный, внутрижелудочковый, внутрикожный, чрескожный, местный, подкожный, интраназальный, энтеральный, подязычный, интравагинальный или ректальный способы введения. Для введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно также использовать безыгольный шприц. Предпочтительно фармацевтическую композицию можно получить для перорального введения, например, в виде таблеток, капсул и т.п., для местного введения или в виде препарата для инъекций, например, в виде жидких растворов или суспензий, при этом фармацевтическую композицию, прежде всего предпочтительно можно использовать в виде препарата для инъекций. Предпочтительны также твердые формы, пригодные для растворения перед инъекцией в жидких носителях для получения раствора или суспензии, например, такую фармацевтическую композицию получают в лиофилизованной форме.

Для инъекции, например внутривенной, чрескожной или подкожной инъекции или инъекции в очаг поражения, активный ингредиент предпочтительно перерабатывают в форму парентерально приемлемого водного раствора, который является апиногенным и характеризуется пригодным рН, изотоничностью и стабильностью. Специалисты в данной области техники могут приготовить пригодные растворы с использованием, например, изотонических растворителей, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. При необходимости можно включать консерванты, стабилизаторы, буферные вещества, антиоксиданты и/или другие вспомогательные вещества. Если полипептид, пептид или нуклеиновую кислоту, другое фармацевтически полезное соединение настоящему изобретению предназначено для введения индивидууму, то введение предпочтительно проводят в "профилактически эффективном количестве" или "терапевтически эффективном количестве" (в зависимости от ситуации), которое является достаточным для проявления благоприятного действия на индивидуума. Действительное введенное количество, а также способ и период введения зависят от природы и степени тяжести состояния, подлежащего лечению. Для инъекции фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получать, например, в виде предварительно заполненного шприца.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, как определено выше, также можно вводить перорально в любой перорально приемлемой стандартной лекарственной форме, включая, но не ограничиваясь только ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального введения широко используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Как правило, также добавляют смазывающие вещества, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы пригодные растворители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Если для перорального введения необходимы водные суспензии, активный ингредиент, т.е. молекулу по настоящему изобретению, конъюгированную с карго-переносчиком, как определено выше, представляют в комбинации с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При необходимости можно также добавлять определенные подсластители, ароматизаторы или красители.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно также вводить местным способом, прежде всего, если цель лечения включает участки или органы, легко доступные при местном применении, например, включая заболевания кожи или любой другой доступной эпителиальной ткани. Пригодные составы для местного введения получают для каждого из указанных участков или органов. Для местного применения фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно перерабатывают в пригодную мазь, содержащую фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, прежде всего ее компоненты, как определено выше, суспендированные или растворенные в одном или более носителях. Носители для местного введения включают, но не ограничиваясь только ими, минеральное масло, вазелиновое масло, медицинский белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, полиоксипропилен, эмульгированный воск и воду. В другом варианте применения фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно перерабатывать в пригодные лосьон или крем. В контексте

настоящего изобретения пригодные носители включают, но не ограничиваясь только ими, минеральное масло, сорбит моностеарат, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

Схемы дозировок могут представлять собой схему однократных введений или схему многократных введений, при этом в контексте настоящего изобретения схема многократных введений является предпочтительным. К известным фармацевтическим препаратам на основе антител, прежде всего к фармацевтическим препаратам на основе антител против ВГВ, например продукт Hepatect® CP, прилагается инструкция, в которой указана частота введения, прежде всего для различных показаний, например указана предпочтительная частота введения фармацевтического препарата: ежедневно, еженедельно, ежемесячно и т.п. Частота введения и дозировка могут также зависеть от степени тяжести симптомов.

Например, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить ежедневно, например, один или несколько раз в день, например, один, два, три раза или четыре раза в день, предпочтительно один или два раза в день, более предпочтительно один раз в день в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 или более дней, например, ежедневно в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 месяцев. Предпочтительно фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить еженедельно, например, один или два раза в неделю в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 или более недель, например, еженедельно в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или еженедельно в течение 2, 3, 4 или 5 лет. Кроме того, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению предпочтительно можно вводить ежемесячно, например, один раз в месяц, или, более предпочтительно каждый второй месяц в течение 1, 2, 3, 4 или 5 или более лет. Предпочтительным конечным параметром введения является достижение сероконверсии, предпочтительно конечным параметром лечения является устойчивое отсутствие HBsAg в сыворотке, сопровождающееся сероконверсией антител против ВГВ. Введение также предпочтительно продолжают на протяжении всей жизни. Кроме того, также предусмотрено только одно однократное введение, прежде всего для определенных показаний, например для профилактики гепатита В в случае случайного контакта неиммунизированных субъектов.

При введении однократной дозы, например ежедневной, еженедельной или ежемесячной дозы, для еженедельной дозы предпочтительно количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, прежде всего предпочтительно не превышает 1 г, предпочтительно не превышает 500 мг, более предпочтительно не превышает 250 мг, еще более предпочтительно не превышает 100 мг и прежде всего предпочтительно не превышает 50 мг.

Фармацевтические композиции, как правило, включают "эффективное" количество одного или более антител по настоящему изобретению, т.е. количество, которое является достаточным для лечения, ослабления, снижения интенсивности симптомов или профилактики подлежащего лечению заболевания или состояния, или является достаточным для оказания детектируемого терапевтического действия. Терапевтические эффекты также включают снижение или ослабление патогенной активности или физических симптомов. Точное эффективное количество для любого конкретного субъекта зависит от размера субъекта, его массы и состояния здоровья, природы и степени тяжести состояния, а также от лекарственных средств или комбинации лекарственных средств, выбранных для введения. Эффективное количество для данной ситуации определяется при проведении стандартных экспериментов и оценивается лечащим врачом. Согласно настоящему изобретению эффективная доза обычно составляет от приблизительно 0,005 до приблизительно 100 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0,0075 до приблизительно 50 мг/кг, более предпочтительно от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг/кг и еще более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 5 мг/кг антитела по настоящему изобретению (например, количество антитела в фармацевтической композиции) в расчете на массу тела (например, в кг) индивидуума, которому вводят указанную дозу.

Например, в случае трансплантации печени, например вследствие печеночной недостаточности, вызванной гепатитом В, количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтической композиции по настоящему изобретению для однократной дозы, вводимой в день трансплантации, предпочтительно может составлять не более 50 мг, более предпочтительно не более 10 мг, затем в послеоперационный период указанное количество может составлять не более 10-50 мг, предпочтительно не более 2-10 мг в день, которое вводят в течение семи дней, и не более 10-50 мг, предпочтительно не более 2-10 мг в расчете на однократную дозу, вводимую каждые 1-3 месяца для поддержания уровней анти-HBs в сыворотке приблизительно 100 МЕ/л.

Для лечения хронического гепатита В антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, например, предпочтительно вводят подкожно, при этом однократная доза составляет вплоть до 500 мг, предпочтительно вплоть до 250 мг, более предпочтительно вплоть до 100 мг антитела по настоящему изобретению. Указанную однократную дозу можно вводить ежедневно, еженедельно или ежемесячно, как описано выше.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также может содержать дополнительный активный компонент, который может представлять собой дополнительное антитело или компонент, который не является антителом. Дополнительный активный компонент предпочтительно вы-

бирают из группы, состоящей из ингибиторов полимеразы, интерферонов и/или ингибиторов контрольных точек. Предпочтительные ингибиторы полимеразы включают ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин и тенофовир. Ингибиторы полимеразы подавляют обратную транскрипцию и синтез положительной цепи ДНК. Ингибиторы полимеразы не препятствуют распространению вирусов, образованию ковалентнонепрерывной кольцевой кнкДНК, а также не влияют на высвобождение HBsAg. Интерфероны (ИНФ) включают ИНФ- α и ИНФ- β , при этом ИНФ- β является предпочтительным. Предпочтительные ингибиторы контрольных точек направлены на блокирование PD-1/PD-L1 и/или CTLA4 и в связи с этим включают антитела против PD-1 и антитела против PD-L1, а также антитела против CTLA4. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать один или более дополнительных активных компонентов.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут присутствовать или в одной и той же фармацевтической композиции в качестве дополнительного активного компонента, или предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению присутствует в первой фармацевтической композиции, а дополнительный активный компонент присутствует во второй фармацевтической композиции, отличающейся от первой фармацевтической композиции. Соответственно, если предусмотрено более одного дополнительного активного компонента, каждый дополнительный активный компонент и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению предпочтительно включают в разные фармацевтические композиции. Такие разные фармацевтические композиции можно вводить или совместно/одновременно или в различные моменты времени или в различных участках (например, различные отделы тела).

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и дополнительный активный компонент обеспечивают аддитивное терапевтическое действие или предпочтительно синергетическое терапевтическое действие. Термин "синергия" используется в данном контексте для описания комбинированного действия двух или более активных агентов, которое превышает сумму индивидуальных действий каждого соответствующего активного агента. Таким образом, если объединенное действие двух или более агентов приводит к "синергетическому ингибированию" активности или процесса, подразумевается, что ингибирование активности или процесса является более значительным по сравнению с суммой ингибирующих действий каждого соответствующего активного агента. Термин "синергетическое терапевтическое действие" относится к терапевтическому действию, наблюдаемому при комбинировании двух или более курсов лечения, при этом терапевтическое действие (определяемое любым числом параметров) является более значительным по сравнению с суммой индивидуальных терапевтических эффектов, наблюдаемых при проведении соответствующих индивидуальных курсов лечения.

Предпочтительной является фармацевтическая композиция, содержащая антитело к gHCB34 или его антигенсвязывающему фрагменту, а также фармацевтически приемлемый носитель.

В одном варианте композиция по настоящему изобретению может включать антитела по настоящему изобретению, при этом содержание антител составляет по крайней мере 50 мас.% (например, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 мас.% или более) в расчете на общее содержание белка в композиции. В такой композиции антитела предпочтительно присутствуют в очищенной форме.

В настоящем изобретении также предлагается способ получения фармацевтической композиции, включающий следующие стадии: (i) получение антитела по настоящему изобретению и (ii) смешивание очищенного антитела с одним или более фармацевтически приемлемых носителей.

В другом варианте способ получения фармацевтической композиции включает стадию смешивания антитела с одним или более фармацевтически приемлемых носителей, при этом антителом является моноклональное антитело, которое получают из трансформированных В-клеток или культивированных плазматических клеток по настоящему изобретению.

В качестве альтернативы доставке антител или В-клеток в терапевтических целях субъекту можно доставлять нуклеиновую кислоту (как правило, ДНК), которая кодирует требуемое моноклональное антитело (или его активный фрагмент), полученную из В-клеток или культивированных плазматических клеток, при этом нуклеиновая кислота может экспрессироваться *in situ* в организме субъекта и обеспечивать требуемое терапевтическое действие. Пригодная генная терапия и векторы для доставки нуклеиновых кислот известны в данной области техники.

Фармацевтические композиции могут включать противомикробный агент, прежде всего, если они упакованы в формате многократных доз. Такие композиции могут содержать ПАВ, например твин (полисорбат), например твин 80. Обычно ПАВ присутствуют при низких концентрациях, например менее 0,01%. Композиции могут также включать натриевые соли (например, хлорид натрия), для обеспечения тоничности. Например, концентрация NaCl, как правило, составляет 10 ± 2 мг/мл.

Кроме того, фармацевтические композиции могут содержать альдит (например, маннит) или дисахарид (например, сахароза или трегалоза), например, при концентрации приблизительно 15-30 мг/мл (например, 25 мг/мл), прежде всего, если они подлежат лиофилизации или если они включают материал, который получен при растворении лиофилизованного материала. Значение pH композиции для лиофили-

зации можно регулировать перед лиофилизацией в интервале от 5 до 8 или 5,5-7 или значение pH может составлять приблизительно 6,1.

Композиции по настоящему изобретению могут также включать один или более иммунорегуляторных агентов. В одном варианте один или более иммунорегуляторных агентов включает(ют) адъювант.

Курсы лечения и области применения в медицине.

В следующем объекте настоящего изобретения предлагается применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для (i) профилактики, лечения или ослабления симптомов гепатита В и/или гепатита D или для (ii) диагностики гепатита В и/или гепатита D.

В объем настоящего изобретения включены несколько форм и способов введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции, как описано выше в отношении фармацевтической композиции. Указанное справедливо также в контексте применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора и клетки, как описано в данном контексте, прежде всего в отношении предпочтительных форм и способов введения.

Способы диагностики могут включать контактирование антитела или фрагмента антитела с образцом. Такие образцы можно получить у субъекта, например, выделенный образец ткани, полученный, например, из носового прохода, синусовых пазух, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, печени, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, мозга, кожи или крови, предпочтительно из сыворотки. Способы диагностики могут также включать детектирование комплекса антиген/антитело, прежде всего после контактирования антитела или фрагмента антитела с образцом. Такую стадию детектирование, как правило, проводят в лабораторных условиях, т.е. без контактирования с организмом человека или животного. Примеры способов детектирования известны специалисту в данной области техники и включают, например, метод ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ).

В настоящем изобретении также предлагается применение (i) антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или его вариантов и производных по настоящему изобретению, (ii) клона иммортализованных В-клеток по настоящему изобретению, (iii) нуклеиновой кислоты или вектора по настоящему изобретению или (iv) фармацевтической композиции по настоящему изобретению для (а) получения лекарственного средства, предназначенного для профилактики, лечения или ослабления симптомов гепатита В и/или гепатита D или для (б) диагностики гепатита В и/или гепатита D.

В настоящем изобретении также предлагается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетка по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства, предназначенного прежде всего для профилактики или лечения гепатита В и/или гепатита D. Предлагается также применение антитела по настоящему изобретению для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения субъекта и/или диагностики субъекта. Предлагается также способ лечения субъекта, включающий стадию введения субъекту композиции по настоящему изобретению. В некоторых вариантах субъектом может являться человек. Один способ проверки эффективности терапевтического лечения включает мониторинг симптомов заболевания после введения композиции по настоящему изобретению. Лечение можно проводить по схеме однократных введений или по схеме многократных введений.

В одном варианте антитело, фрагмент антитела, клон иммортализованных В-клеток или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят субъекту, нуждающемуся в указанном лечении. Такой субъект включает, но не ограничиваясь только ими, прежде всего субъекта из группы риска или предрасположенного к развитию гепатита В и/или гепатита D.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению также можно использовать для диагностики гепатита В и/или гепатита D. Кроме того, эпитоп в антигенной петлевой области HBsAg, который способен связываться с антителом по настоящему изобретению, как описано в данном контексте, можно использовать в наборе для мониторинга эффективности лечения по присутствию защитных антител в отношении ВГВ или по их титру.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для лечения или ослабления интенсивности симптомов хронического гепатита В.

Следует отметить, что антитело по настоящему изобретению (i) эффективно нейтрализует инфекцию ВГВ, (ii) связывается с L-HBsAg (крупный белок поверхностной оболочки ВГВ, который присутствует в инфекционных частицах ВГВ), тем самым предотвращая распространение ВГВ, (iii) связывается с S-HBsAg, тем самым ускоряя элиминацию субвирусных частиц (SVP), и (iv) может индуцировать сероконверсию, т.е. активную ответную иммунную реакцию на вирус.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению,

нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для предотвращения (повторного) инфицирования гепатитом В после трансплантации печени, прежде всего в случае печеночной недостаточности, вызванной гепатитом В.

С этой точки зрения пациенту, направленному на трансплантацию печени, предпочтительно можно вводить высокую дозу в день трансплантации и вводить суточные дозы в течение приблизительно недели после операции. Затем предпочтительно дополнительные дозы можно вводить каждые 1-3 месяца для поддержания уровней антитела против ВГВ в сыворотке выше 100 МЕ/мл

В другом предпочтительном варианте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для предотвращения/профилактики гепатита В у не иммунизированных субъектов. Данный подход применяют, например, в случае (предполагаемого) случайного контакта с ВГВ (пост-контактная профилактика). Термин "не иммунизированные субъекты" включает субъектов, которых никогда не вакцинировали, и в связи с этим они являются не иммунизированными, а также субъектов, у которых отсутствует ответная иммунная реакция (не определяются антитела против гепатита В) после вакцинации. Прежде всего, в последней группе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для (непрерывного) предотвращения гепатита В, т.е. в отличие от "пост-контактной профилактики" (непрерывное) предотвращение является предпочтительным для таких субъектов, у которых отсутствует ответная иммунная реакция (не определяются антитела против гепатита В) после вакцинации, и которым необходимо непрерывное предотвращение.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для профилактики гепатита В у пациентов, проходящих курс гемодиализа.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для предотвращения гепатита В у новорожденного. В связи с этим прежде всего предпочтительными являются новорожденные у матерей, являющихся носителями вируса гепатита В/не иммунизированных матерей. Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят при рождении или по возможности в максимально короткий срок после рождения. Предпочтительно введение можно повторять до достижения сероконверсии после вакцинации.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для лечения или ослабления интенсивности симптомов гепатита D, предпочтительно гепатита В и гепатита D, прежде всего сочетанного заболевания гепатитом В и гепатитом D. Интересно отметить, что антитело по настоящему изобретению не только эффективно нейтрализует вирус гепатита В, но также и вирус гепатита D. В связи с этим антитело по настоящему изобретению может обеспечить первоочередное лечение гепатита D.

Комбинированное лечение.

Введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению при осуществлении способов и в ходе применения по настоящему изобретению можно проводить в отдельности или в комбинации с совместным агентом (названным в данном контексте "дополнительным активным компонентом"), пригодным для лечения и/или стабилизации заболевания или нарушения, которое необходимо вылечить или подавить.

Настоящее изобретение включает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, при этом введение осуществляют субъекту до или после проведения других курсов лечения или одновременно с ними или до или после введения совместных агентов, пригодных для лечения и/или профилактики гепатита В, или одновременно с ними. Указанное антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию, которые вводят одновременно с указанными совместными агентами, можно вводить в одной и той же или другой композиции(ях), а также одним и тем же или другим способом(ами) введения.

Указанные другие курсы лечения или совместные агенты можно выбрать из группы, состоящей из ингибиторов полимеразы, интерферонов и/или ингибиторов контрольных точек.

Таким образом, в другом объекте настоящего изобретения для описанных выше областей применения в медицине антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором полимеразы, интерфероном и/или ингибитором контрольной точки.

Предпочтительные ингибиторы полимеразы включают ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин и тенофовир. Ламивудин является наиболее предпочтительным ингибитором полимеразы. Ингибиторы полимеразы подавляют обратную транскрипцию и синтез положительной цепи ДНК. Ингибиторы полимеразы не препятствуют распространению вирусов, образованию кнкДНК, а также не влияют на высвобождение HBsAg.

Интерфероны включают ИНФ-α и ИНФ-β, причем ИНФ-β является предпочтительным.

Действие предпочтительных ингибиторов контрольных точек направлено на блокирование PD-1/PD-L1 и/или CTLA4, и в связи с этим они включают антитела против PD-1 и антитела против PD-L1, а также антитела против CTLA4. Таким образом, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать один или более дополнительных активных компонентов.

Другой предпочтительный совместный агент (дополнительные активные компоненты), предназначенный для введения в комбинации с антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, с нуклеиновой кислотой по настоящему изобретению, вектором по настоящему изобретению, клеткой по настоящему изобретению или с фармацевтической композицией по настоящему изобретению, включает агонисты LTβR.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором полимеразы. Данный подход прежде всего предназначен для применения указанной комбинации для профилактики, лечения или ослабления симптомов гепатита В и/или гепатита D. В данном случае предпочтительные ингибиторы полимеразы включают ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин и тенофовир. Наиболее предпочтительным ингибитором полимеразы является ламивудин.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят тем же способом, как и ингибитор полимеразы, интерферон и/или ингибитор контрольной точки, или другим способом.

В связи с этим в еще одном объекте настоящего изобретения также предлагается комбинация, включающая:

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и

(ii) ингибитор полимеразы, интерферон и/или ингибитор контрольной точки.

Такую комбинацию предпочтительно используют для профилактики, лечения или снижения интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D, прежде всего для лечения или снижения интенсивности симптомов хронического гепатита В и/или хронического гепатита D. Более предпочтительно комбинацию используют для введения пациентам, инфицированным только ВГВ, или пациентам со смешанной инфекцией ВГВ/ВГД.

Такая комбинация предпочтительно ускоряет элиминацию HBsAg.

В связи с этим в настоящем изобретении также предлагается набор, включающий:

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и

(ii) ингибитор полимеразы, интерферон и/или ингибитор контрольной точки.

Кроме того, набор может содержать средства для введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, такие как, шприц или флакон, и/или листок-вкладыш, например, с инструкциям по применению антитела по или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и/или ингибитора полимеразы, интерферона и/или ингибитора контрольной точки.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут присутствовать либо в той же самой фармацевтической композиции, что и дополнительный активный компонент (совместный агент), или предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению включают в первую фармацевтическую композицию, а дополнительный активный

компонент (совместный агент) включают во вторую фармацевтическую композицию, отличающуюся от первой фармацевтической композиции. Соответственно, если предусмотрено более одного дополнительного активного компонента (совместного агента), каждый дополнительный активный компонент (совместный агент) и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению предпочтительно содержатся в различных фармацевтических композициях. Указанные различные фармацевтические композиции можно вводить либо совместно/одновременно, либо в различные моменты времени или в различные участки (например, в различные отделы тела).

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и дополнительный активный компонент (совместный агент) обеспечивают аддитивное терапевтическое действие или предпочтительно синергетическое терапевтическое действие. Как описано выше, термин "синергия" используется для описания комбинированного действия двух или более активных агентов, которое превышает сумму индивидуальных действий каждого соответствующего активного агента. Таким образом, если комбинированное действие двух или более агентов приводит к "синергетическому ингибированию" активности или процесса, то подразумевается, что ингибирование активности или процесса является более значительным по сравнению с суммой ингибирующих действий каждого соответствующего активного агента. Термин "синергетическое терапевтическое действие" относится к терапевтическому действию, наблюдаемому при использовании комбинации двух или более курсов лечения, при этом терапевтическое действие (определяемое любым числом параметров) является более значительным по сравнению с суммой индивидуальных терапевтических действий, наблюдаемых при проведении соответствующих индивидуальных курсов лечения.

Области и способы применения.

В другом объекте настоящего изобретения предлагается применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для мониторинга качества вакцин против гепатита В или против гепатита D по наличию в антигене указанной вакцины специфического эпитопа в правильной конформации.

Более того, в настоящем изобретении предлагается также применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для диагностики гепатита В и/или гепатита D.

Кроме того, в настоящем изобретении также предлагается применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для определения инфицированности выделенного образца крови вирусом гепатита В и/или вирусом гепатита D.

Как описано выше, способы диагностики могут включать контактирование антитела или фрагмента антитела с образцом. Такие образцы можно получить у субъекта, например выделенный образец ткани, полученный, например, из носового прохода, синусовых пазух, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, печени, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, мозга, кожи или крови, предпочтительно, из сыворотки. Способы диагностики могут также включать детектирование комплекса антиген/антитело, прежде всего, после контактирования антитела или фрагмента антитела с образцом. Такую стадию детектирования, как правило, проводят в лабораторных условиях, т.е. без контактирования с организмом человека или животного. Примеры способов детектирования известны специалисту в данной области техники и включают, например, метод ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ).

В настоящем изобретении также предлагается способ предотвращения и/или лечения гепатита В и/или гепатита D у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в указанном лечении, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предлагается способ лечения субъекта, перенесшего трансплантацию печени, включающий введение субъекту, который перенес трансплантацию печени, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В описанных выше способах предпочтительным является субъект, страдающий от хронического гепатита В.

Кроме того, описанные выше детали, прежде всего в контексте фармацевтической композиции и применения в медицине, также применимы к способам, описанным в данном контексте. Например, в описанных выше способах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетку по

настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению предпочтительно вводят в комбинации с ингибитором полимеразы, интерфероном и/или ингибитором контрольной точки, как описано в данном контексте.

Краткое описание фигур

Ниже приведено краткое описание прилагаемых фигур. Фигуры предназначены для более подробной иллюстрации настоящего изобретения. Однако они никаким образом не ограничивают объект настоящего изобретения.

На фиг. 1 для примера 1 показано связывание моноклонального антитела HBC34 с тремя различными серотипами HBsAg (adw, ady и ayw) по данным ИФА.

На фиг. 2 для примера 2 показана способность различных антител против вируса гепатита (ВГ), а именно, иммуноглобулинов против ВГВ (HBIG), HBC34 и других моноклональных антител против PreS1 (18/7) или HBsAg нейтрализовать *in vitro* инфекцию ВГВ В-клетках HepaRG. Каждое антитело тестировали при трех различных концентрациях, а именно 5, 0,5 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, за исключением HBIG, который испытывали при концентрациях 5000, 500 и 50 мкг/мл.

На фиг. 3 для примера 2 показано окрашивание HBsAg В-клетках HepaRG, инфицированных в присутствии трех различных концентраций (5, 0,5 или 0,05 мкг/мл) моноклонального антитела HBC34, а также для сравнения показано окрашивание ядер.

На фиг. 4 для примера 2 показана нейтрализующая активность антитела HBC34 в отношении инфекции ВГ дельта при различных концентрациях. При концентрации HBC34, равной 0,12 мкг/мл, ВГ дельта-положительные клетки не детектируются, что указывает на эффективную нейтрализацию ВГ дельта. Напротив, HBIG не нейтрализует ВГ дельта (исследовали при разведении 1:1000, т.е. при концентрации 50 мкг/мл).

На фиг. 5 для примера 3 показана аминокислотная последовательность антигенной петли HBsAg 10 генотипов ВГВ: А, В, С, D, Е, F, G, H, I и J. Указанные последовательности включают эпитоп, распознаваемый антителом HBC34 (выделен серым цветом). Представленную сверху последовательность (HBV-D J02203) использовали для создания пептидной библиотеки, описанной в примере 5, фиг. 7.

На фиг. 6 для примера 3 приведены полученные цитофлуориметрическим методом данные анализа связывания моноклонального антитела человека HBC34 и контрольного антитела (концентрация обоих антител составляла 5 мкг/мл) с пермеабиллизированными клетками Hep2, временно трансфектированными плазмидами, экспрессирующими различные генотипы HBsAg: А, В, С, D, Е, F, G, H, I и J, как показано на фигуре.

На фиг. 7 для примера 4 показаны аминокислотные последовательности антигенной петли 19 исследованных мутантных форм HBsAg. Кружками обведены остатки мутантных форм HBsAg, которые слабо связываются (пунктирный круг) или не связываются с антителом HBC34.

На фиг. 8 для примера 4 показано связывание моноклонального антитела человека HBC34 и двух других HBsAg-специфичных антител (Ab5 и Ab6), которые все исследованы при концентрации 5 мкг/мл, с клетками Hep2, трансфектированными плазмидами, экспрессирующими различные мутантные формы генотипа D HBsAg, которые указаны на фигуре ("WT": генотип D HBsAg, код доступа Genbank FJ899792).

На фиг. 9 для примера 5 показано связывание HBC34 с библиотекой, состоящей из 650 линейных и петлевых пептидов, по данным измерений с использованием технологии Perseus, а также последовательности четырех пептидов, связанных с HBC34. Остатки, обозначенные цифрой 1, представляют собой остатки цистеина, которые введены, чтобы обеспечить химическое присоединение к клеточному каркасу для перестройки конформационных эпитопов. Если помимо вновь введенных остатков цистеина присутствовали другие остатки цистеина, их заменяли на остатки аланина (остатки аланина подчеркнуты).

На фиг. 10 для примера 5 показано проведенное методом вестерн-блоттинга окрашивание Ab4 и HBC34 на вирусных частицах ВГВ в восстанавливающих условиях. Ab4 представляет собой антитело сравнения, которое также проявляет реактивность к антигенной петле.

На фиг. 11 для примера 6 показаны уровни вирусемии ВГВ у гуманизированных мышей uPA/SCID, инокулированных 5×10^7 копиями геномных эквивалентов ВГВ (генотип D), которых через три недели после инфицирования лечили в течение 6 недель либо антителом HBC34 (в дозе 1 мг/мг, вводимой внутривенно (в/в) два раза в неделю), контрольным антителом (контроль АВ), либо энтекавиром (ETV, вводимым перорально в дозе 1 мкг/мл). В фазе распространения инфекции ВГВ (неделя 3 - неделя 6 после инфицирования (п/и)) в группе мышей, которых лечили контрольным антителом, вирусемия возрастала на величину $>2 \log$, в то время как у мышей, которых лечили антителом HBC34 или энтекавиром, титры ВГВ снижались.

На фиг. 12 для примера 6 показано окрашивание гепатоцитов мышей, описанных в примере 6, в присутствии HBsAg (внутрипеченочный анализ) при завершении эксперимента (неделя 9). Почти для всех гепатоцитов мышей, которых лечили контрольным антителом, наблюдалось HBsAg-положительное окрашивание, в то время как при лечении обоими препаратами - энтекавиром и HBC34, наблюдалась эффективная блокировка распространения вируса (приблизительно 1-5% HBsAg-положительных клеток).

На фиг. 13 для примера 6 показаны результаты измерений кнкДНК, которые не отличаются значительно для мышей, которых умерщвляли через 3 недели после инфицирования ВГВ ("3week hbv", т.е. без лечения), и для мышей, которых лечили антителом НВС34 или энтекавиром в течение периода неделя 3 - неделя 9 после инфицирования. Напротив, в группе мышей, которых лечили контрольным антителом, при умерщвлении через 9 недель после инфицирования количество кнкДНК/клетка по данным оценки увеличивались на величину вплоть до 2 log.

На фиг. 14 для примера 6 показаны базовая линия (БЛ) уровней циркулирующего HBsAg, уровни через 3 недели лечения (неделя 6 после инфицирования) и через 6 недель лечения (неделя 9 после инфицирования). У мышей, которых лечили антителом НВС34, но не у мышей, которых лечили энтекавиром, уровни циркулирующего HBsAg снижались на величину $>1 \log$ (и ниже предела детектирования), в то время как в контрольной группе мышей уровни HBsAg увеличивались на величину $>2 \log$ (достигая уровней 5000-10000 МЕ/мл).

На фиг. 15 для примера 7 показан титр ВГВ (левая панель) и уровни циркулирующего HBsAg (правая панель) при развитии хронического гепатита В: базовая линия (БЛ), через 3 недели лечения (неделя 15 после инфицирования, "неделя 3") и через 6 недель лечения (неделя 18 после инфицирования, "неделя 6"). У мышей, которых лечили антителом НВС34, титр ВГВ и уровни циркулирующего HBsAg снижались на неделе 3 и на неделе 6 лечения. Данные для отдельных животных представлены на отдельных кривых. Данные для контрольного антитела показаны пунктирными линиями, данные для НВС34 показаны непрерывными линиями.

На фиг. 16 для примера 8 показан титр ВГВ (левая панель) и титр ВГД (правая панель), определенные у мышей uPA/SCID, репопулированных первичными гепатоцитами человека и совместно инфицированных полученной от пациентов сывороткой, содержащей РНК ВГ дельта и ДНК ВГВ. Через пять недель после инфицирования начинали лечение НВС34 или контрольным антителом ("контроль"). Показана базовая линия (БЛ, неделя 3, неделя 5) титра ВГВ (левая панель) и титра ВГ дельта (правая панель), титры через 3 недели лечения (через 8 недель после инфицирования - "неделя 8") и через 6 недель лечения (через 11 недель после инфицирования - "неделя 11"). Данные для отдельных животных представлены на отдельных кривых. Данные для контрольного антитела показаны пунктирными линиями, а данные для НВС34 показаны непрерывными линиями.

На фиг. 17 (часть 1) для примера 9 схематически показана антигенная петля поверхностного антигена ВГВ (HBV-s-антигена), эпитоп НВС34 выделен серым цветом. Для картирования эпитопа НВС34 исследовали библиотеку из 1520 различных пептидов с использованием технологии Pepscan. На фиг. 17 (часть 2-5) для примера 9 показана величина связывания (интенсивность по данным ИФА) НВС34 с 16 различными наборами пептидов. НВС34 связывается с конформационным эпитопом, о чем свидетельствует связывание с пептидами из наборов 13-16, состоящих из комбинаторных конструкторов CLIPS, представляющих две части непрерывного эпитопа (часть 2), и с пептидами из наборов 9-12, состоящих из петлевых пептидов (часть 3). Связывание НВС34 с наборами линейных пептидов 1-4 (часть 4) и 5-8 (часть 5) не наблюдается, что дополнительно подтверждает вывод о том, что НВС34 связывается с непрерывным конформационным эпитопом.

На фиг. 18 для примера 9 показано связывание НВС34 с пептидной библиотекой, состоящей из 812 непрерывных или петлевых пептидов T3 CLIPS. Для уточнения картирования эпитопа, показанного на фиг. 17, получали 3 набора пептидов (названные RN1, RN2 и RN3) на основе полученных ранее наборов (фиг. 17) при проведении анализа полной замены. На фиг. 18 показано связывание НВС34 с наборами 1-3, где остатки в положениях, выделенных рамками, заменены на одну из 13 аминокислот, выбранных из серий AEFQHKLPQRSVY_, где знак "_" обозначает делецию остатка. Исходный остаток в положении перестановки показан слева от каждой панели, а также либо (i) в последовательности, выделенной горизонтальной рамкой (если исходная аминокислота является частью серий перестановок), либо (ii) ниже последовательности (если исходная аминокислота не является частью серий перестановок).

На фиг. 19 для примера 10 показан эффект комбинированного лечения НВС34 (1 мг/кг внутривенно (в/в) два раза в неделю) и ламивудином (добавляли в воду при концентрации 0,4 мг/мл) при снижении уровней вирусемии ВГВ (панель А) и циркулирующего поверхностного антигена ВГВ (HBV-s-антигена (панель Б) у гуманизированных мышей uPA/SCID, инокулированных 2×10^9 копиями геномных эквивалентов ВГВ (генотип D), которых лечили в течение 4 недель, начиная с недели 8 после инфицирования, либо контрольным антителом (контроль), антителом НВС34 в отдельности (НВС34), ламивудином в отдельности (ламивудин) или комбинацией (НВС34 и ламивудин). Комбинированное лечение обеспечивало более значительное снижение вирусемии по сравнению с введением любого из лекарственных средств в отдельности.

На фиг. 20 для примеров 11 и 12 показано выравнивание двух наборов последовательностей VH (панель А) и VL (панель Б), сконструированных для получения вариантов антитела 1-32. CDR области (определенные методом IMGT) выделены серым цветом.

На фиг. 21 для примера 11 показано связывание 18 сконструированных вариантов НВС34 (полученных при комбинировании мутированных последовательностей VH и VL, как указано в столбцах 2 и 3) с HBsAg (субтип adw) по данным анализа методом ИФА. В столбце 4 символ "-" означает отсутствие

связывания, символ "+/-" означает значительное снижение связывания, символ "+/~" означает сниженное связывание, символ "+" означает связывание, аналогичное или равное связыванию исходного антитела.

На фиг. 22 для примера 11 показано связывание 8 различных сконструированных вариантов НВС34 с HBsAg (adw) по данным анализа ИФА на основе прямого связывания с антигенами. Указанные 8 вариантов выбирали среди 18 мутантных форм НВС34, показанных на фиг. 21, при этом для уточнения характеристики аффинности в отношении HBsAg, 8 антител титровали и сравнивали с последовательностью исходного антитела.

На фиг. 23 для примера 11 суммированы характеристики 8 антител, показанных на фиг. 22. Значения EC_{50} определяли аппроксимацией кривых, показанных на фиг. 22, с использованием программы Graphpad prism. Продуктивность определяли количественной оценкой (ИФА) IgG, секретируемого в супернатант, полученный после трансфекции 300 мл клеток 293 Expi каждым из 8 вариантов, а также исходным антителом.

На фиг. 24 для примеров 11 и 12 представлена таблица, в которой суммированы характеристики 15 вариантов, в том числе 12 дополнительных сконструированных вариантов НВС34, разработанных с использованием полученного ранее набора при введении дополнительных мутаций в каркасные участки (панель А). Кривые связывания получали титрованием антител в ходе анализа методом ИФА на основе связывания антител с антигенами и рассчитывали значения EC_{50} экстраполяцией кривых с использованием программы Graphpad prism. Значения продуктивности рассчитывали на основе количественной оценки IgG, секретируемого в супернатант, полученный после трансфекции 30 мл клеток 293 Expi каждым из 15 вариантов, а также исходным антителом. Графики кратных изменений показаны на панели Б.

На фиг. 25 для примеров 11 и 12 показано связывание НВС34, а также вариантов 6, 7, 19, 23 и 24 по данным цитофлуориметрического анализа. Все антитела титровали, начиная от концентрации 5 мкг/мл, и связывали с пермеабиллизированными клетками Hep2, временно трансфектированными плазмидами, экспрессирующими различные генотипы HBsAg: A, B, C, D, E, F, G, H, I и J.

Примеры

Ниже приведены конкретные примеры, иллюстрирующие различные варианты осуществления и объекты настоящего изобретения. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами, описанными в данном контексте. Следующие препараты и примеры представлены для более четкого понимания настоящего изобретения и его осуществления специалистами в данной области техники на практике. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается вариантами, приведенными в качестве примеров осуществления, которые предназначены только для иллюстрации отдельных объектов настоящего изобретения, и способами, которые являются функционально эквивалентными в объеме настоящего изобретения. Действительно, исходя из представленного выше описания, прилагаемых фигур и представленных ниже примеров, специалистам в данной области техники представляются очевидными различные модификации настоящего изобретения в дополнение к модификациям, описанным в данном контексте. Все такие модификации включены в объем настоящего изобретения и в прилагаемые пункты формулы настоящего изобретения.

Пример 1.

Идентификация и характеристика моноклонального антитела человека НВС34.

Моноклональное антитело человека выделяли аналогично тому, как описано в статье Traggiai E. et al., Nat. Med., 10, 8, p. 871-875 (2004), из образца, полученного у человека. Антитело характеризовали при определении нуклеотидной и аминокислотной последовательностей его вариабельных областей (табл. 2 и 3) и расположенных в них определяющих комплементарность областей (CRD) и антитело обозначали "НВС34". Соответственно, НВС34 представляет собой полноразмерное моноклональное антитело человека типа IgG1, включающее последовательности CDR, VH и VL, представленные выше в табл. 2 и 3.

Затем определяли, с каким серотипом из трех серотипов HBsAg: adw, ady и ayw, связывается моноклональное антитело человека НВС34. Интересно отметить, что НВС34 связывается с высокой аффинностью с тремя серотипами HBsAg (adw, ady и ayw), при этом методом ИФА регистрировали аналогичные и низкие значения EC_{50} (фиг. 1).

Защитные титры антител против ВГВ выражали в международных единицах (МЕ), что позволяет стандартизовать результаты различных анализов. Международный референсный препарат для иммуноглобулина против вирусов гепатита (ВГ) (International Reference Preparation for anti-HBs immunoglobulin, W1042) был установлен в 1977 г. Плазму, использованную для получения указанного стандарта, получали от индивидуумов, которые были инфицированы вирусом гепатита В естественным путем (Barker L.F., Lorenz D., Rastogi S.C., Finlayson J.S. и Seligmann E.B. Study of a proposed international reference preparation for anti-hepatitis B immunoglobulin. WHO Expert Committee on Biological Standardization technical report series. WHO Expert Committee on Biological Standardisation 29th Report BS 77.1 164, Женева, Швейцария, World Health Organization (1977), World Health Organization: Anti-hepatitis B immunoglobulin, WHO, Tech. Rep. Ser., 626, 18 (1978)). Согласно результатам диагностического иммуноанализа (Abbott Architect diagnostic immunoassay), активность НВС34 составляла 5000 МЕ/мг. В качестве сравнения активность НВIG составляет ~1 МЕ/мг.

Пример 2.

Антитело НВС34 эффективно нейтрализует инфекцию ВГВ и ВГ дельта.

Первый объект, использованный в примере 2, заключается в определении способности НВС34 нейтрализовать инфекцию ВГВ и в сравнении нейтрализующей активности НВС34 с нейтрализующей активностью других антител против ВГ. Для этого дифференцированные клетки НераRG инкубировали в присутствии фиксированного количества ВГВ в присутствии или в отсутствии антител (НВС34, 18/7, Ab2, Ab3 и НВIG) в среде, дополненной 4% ПЭГ 8000 (Sigma-Aldrich), при 37°C в течение 16 ч. При завершении инкубации клетки промывали и затем культивировали. Среда заменяли каждые 3 дня. Инфекцию детектировали, измеряя уровни поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) и антигена е гепатита В (HBeAg), секретированных В-клеточный супернатант, в дни 7-11 после инфицирования методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), а также детектируя окрашивание HBsAg методом иммунофлуоресцентного анализа.

Как указано на фиг. 2 и 3, НВС34 полностью нейтрализует инфекцию ВГВ при испытании в дозах от 5 до 0,5 мкг/мл, в то время как моноклональные антитела человека Ab2 и Ab3 против ВГ, которые также связываются с HBsAg, не обеспечивают полную нейтрализацию. Это указывает на то, что не все антитела, связывающиеся с HBsAg, способны нейтрализовать инфекцию ВГВ (например, Ab2 и Ab3). Следует отметить, что НВIG нейтрализует инфекцию ВГВ только при испытании в дозах от 5000 мкг/мл до 500 мкг/мл, т.е. проявляет в 1000-раз более низкую эффективность по сравнению с НВС34. Антитело 18/7 представляет собой моноклональное антитело мыши против пре-S1 области HBsAg.

Второй объект, описанный в примере 2, заключается в определении нейтрализующей активности НВС34 против ВГ дельта с использованием дифференцированных клеток НераRg. В качестве инфекционного инокулята ВГ дельта использовали сыворотку, полученную у носителей ВГ дельта. Иммунофлуоресцентное окрашивание дельта антигена использовали в качестве параметра считывания. Как показано на фиг. 4, НВС34 полностью блокирует инфекцию ВГ дельта при испытании в дозе 0,12 мкг/мл. Для сравнения проводили также испытания НВIGd, который был неэффективен (испытывали при соотношении 1:1000, т.е. в дозе 50 мкг/мл).

Пример 3.

Антитело НВС34 распознает все 10 генотипов ВГВ: А, В, С, D, Е, F, G, H, I и J.

Исследовали способность НВС34 распознавать 10 генотипов ВГВ: А, В, С, D, Е, F, G, H, I и J (как указано на фиг. 5) методом анализа проточной цитометрии. Прежде всего эпителиальные клетки человека (клетки Нер2) трансфектировали плазмидами, экспрессирующими HBsAg каждого из 10 генотипов ВГВ: А, В, С, D, Е, F, G, H, I и J (как показано на фиг. 5). Моноклональное антитело человека НВС34 (5 мкг/мл) и контрольное антитело (5 мкг/мл) использовали для окрашивания временно трансфектированных пермеабилizированных клеток. Через два дня после трансфекции клетки Нер2 собирали, фиксировали и пермеабилizировали сапонином для иммуноокрашивания антителом НВС34 или контрольным антителом Ab. Связывание антител с трансфектированными клетками анализировали с использованием цитофлуориметра Becton Dickinson FACSCanto2 (фирмы BD Biosciences) и программного обеспечения FlowJo (фирмы TreeStar). Как показано на фиг. 6, антитело НВС34 распознает HBsAg всех 10 генотипов ВГВ, при этом наблюдаются аналогичные профили окрашивания.

Пример 4.

Антитело НВС34 распознает все функциональные мутантные формы HBsAg.

Методом проточной цитометрии исследовали способность НВС34 связываться с 19 различными мутантными формами HBsAg генотипа D (на основе HBsAg генотипа D, код доступа Genbank FJ899792, как показано на фиг. 7): HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg T123N/C124R, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R и HBsAg N146A (см. SEQ ID NO: 16-33, соответствующие аминокислотным последовательностям антигенных петлевых областей указанных мутантных форм). Прежде всего эпителиальные клетки человека (клетки Нер2) трансфектировали плазмидами, экспрессирующими различные мутантные формы HBsAg, и анализировали, как описано в примере 3. Моноклональное антитело человека НВС34 (5 мкг/мл) и два других HBsAg-специфичных антитела (Ab5 и Ab6) использовали для исследования связывания НВС34 с трансфектированными клетками Нер2.

Как указано на фиг. 8, было установлено, что НВС34 связывается с 18 из 19 мутантных форм HBsAg. Связывание НВС34, но не связывание Ab5 и Ab6, полностью отсутствует только в случае мутантной формы HBsAg T123N/C124R, т.е., если мутированы оба остатка - 123 и 124. Следует отметить, что было установлено, что мутации указанных двух остатков (т.е. замена T123 и C124) на аланин связаны с потерей инфекционности ВГВ, что наиболее вероятно происходит в результате разрушением дисульфидной мостиковой связи, образованной C124, что может вызывать конформационное изменение антигенной петли (Salisse J. и Sureau C., Journal of Virology, 83, p. 9321-9328 (2009)). Таким образом, моноклональное антитело человека НВС34 связывается с 18 мутантными формами HBsAg.

Пример 5.

Антитело НВС34 связывается с консервативным конформационным эпитопом в антигенной петле.

Эпитоп, распознаваемый НВС34, идентифицировали с использованием библиотеки, состоящей из

650 линейных и петлевых пептидов (технология "CLIPS Discontinuous Epitope Mapping" фирмы Pepscan, Lelystad, Нидерланды), созданной для рассмотрения всей антигенной петлевой области HBsAg. Линейные и CLIPS пептиды синтезировали стандартным методом с использованием Fmoc-защитных групп. Петлевые пептиды синтезировали на основе химических каркасов для реконструкции конформационных эпитопов с использованием технологии химически присоединенных к каркасам пептидов (Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS)), как описано в статье Timmerman et al., Journal of Molecular Recognition, 20, p. 283-299 (2007). Например, синтезировали однопетлевые пептиды, содержащие два остатка цистеина, при этом размер петли изменяли, вводя остатки цистеина на различном расстоянии. Если присутствовали другие остатки цистеина, кроме вновь введенных остатков цистеина, то их заменяли на аланин. Боковые цепи нескольких остатков цистеина в пептидах присоединяли к матрицам CLIPS при взаимодействии в 0,5 мМ растворе матрицы CLIPS, таком как 1,3-бис-(бромметил)бензол в бикарбонате аммония на полипропиленовых планшетах PEPSCAN формата кредитной карты (455 пептидных форматов/карта). Связывание антитела с каждым пептидом исследовали методом ИФА в системе PEPSCAN. Полипропиленовые 455-луночные планшеты формата кредитной карты, содержащие ковалентно присоединенные пептиды, инкубировали в присутствии исследуемого антитела (при концентрации 1 мкг/мл) в блокирующем растворе. После промывки добавляли субстрат пероксидазы, 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолинсульфонат (ABTS) и 2 мкл 3% раствора H₂O₂. Через 1 ч развитие окрашивания оценивали с использованием камеры прибора с зарядовой связью (CCD) и системы обработки изображений. Необработанные данные представляли собой оптические значения, изменяющиеся в диапазоне от 0 до 3000 (логарифмическая шкала, аналогичная шкале от 1 до 3, которую используют в стандартном ридере ИФА для 96-луночного планшета). Как указано на фиг. 9, было установлено, что HBC34 распознает двухпетлевой пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52: XGSSTTSTGPCR^{CT}CM^TXPSDGN^ATAIPSSW^X, где остатки, обозначенные символом X, заменены на остатки цистеина, а в подчеркнутых остатках C заменен на A (SEQ ID NO: 52).

Три дополнительных пептида распознавались при более низком сигнале:

(а) линейный 15-членный пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53: TSTGPCR^{CT}CM^TTAQG (SEQ ID NO: 53),

(б) другой линейный пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 54: GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCR^{CT}CM^TT (SEQ ID NO: 54)

и (в) двухпетлевой пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55: XSMYPS^ASATKPSDGN^XTGPCR^{CT}CM^TTAQGT^SX где остатки, обозначенные символом X, заменены на остатки цистеина, а в подчеркнутых остатках C заменен на A (SEQ ID NO: 55).

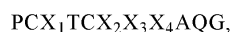
Результаты указанного анализа свидетельствуют о том, что коровый эпитоп HBC34 образован конформационным эпитопом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56: PCR^{CT}CM^TTAQG (SEQ ID NO: 56, аминокислоты 120-130 S домена HBsAg (HBV-D J02203)).

Кроме того, как указано на фиг. 10, по данным вестерн-блоттинга моноклональное антитело человека HBC34 вообще не вступает в реакцию на вирусных частицах ВГВ в восстанавливающих условиях.

Эти результаты подтверждают, что эпитоп HBsAg, с которым связывается HBC34, представляет собой конформационный эпитоп.

Представленные результаты согласуются с данными, описанными в примере 4, где мутации T123N/C124R приводили к отсутствию связывания HBC34.

Область HBsAg, которая содержит конформационный эпитоп, с которым связывается HBC34, является полиморфной в отношении различных генотипов ВГВ. Следующая характерная последовательность области эпитопа HBsAg содержит остатки, мутированные в различных генотипах, которые обозначены символом X:



где X₁ предпочтительно обозначает R или K,

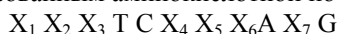
X₂ предпочтительно обозначает M или T,

X₃ предпочтительно обозначает T или I,

X₄ предпочтительно обозначает T, P или L

(SEQ ID NO: 57).

Кроме того, дополнительное сравнение приведенной выше последовательности с 18 мутантными формами HBsAg, с которыми связывается моноклональное антитело человека HBC34, показало, что HBC34 связывается с эпитопом, образованным аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2:



где X₁ обозначает P, T или S,

X₂ обозначает C или S,

X₃ обозначает R, K, D или I,

X₄ обозначает M или T,

X₅ обозначает T, A или I,

X₆ обозначает T, P или L,

X₇ обозначает Q, H или L.

Пример 6.

Введение НВС34 через 3 недели после инфицирования ВГВ предотвращает распространение вируса у гуманизированных мышей uPA.

Объект, описанный в примере 6, заключается в исследовании способности моноклонального антитела человека НВС34 предотвращать распространение ВГВ. Другими словами, цель заключается в исследовании способности антитела НВС34 в качестве ингибитора проникновения В-клетку подавлять *in vivo* инфекцию гепатоцитов человека при обработке мышей после исходного инфицирования. Для этого использовали наивных мышей uPA/SCID, репопулированных первичными гепатоцитами человека (см. статью Petersen et al., *Nature Biotechnology*, 26, p. 335-341 (2008)). Указанным мышам прививали криоконсервированные гепатоциты человека внутриселезеночной инъекцией. Через 8 недель успешность репопуляции гепатоцитов человека в печени хозяина определяли при измерении уровней сывороточного альбумина человека, который экспрессируется исключительно трансплантированными гепатоцитами человека. Мышей с соответствующими уровнями альбумина человека инокулировали 5×10^7 копиями геномных эквивалентов ВГВ (генотип D, HBcAg-положительный) внутрибрюшинно (в/б), чтобы обеспечить проникновение вируса. Через три недели после инфицирования начинали протокол лечения, при этом мышей лечили либо антителом НВС34 (в дозе 1 мг/кг, вводимой два раза в неделю внутрибрюшинно (в/б)), либо контрольным антителом или энтекавиром (ETV, который вводили перорально в дозе 1 мкг/мл в воде, Baraclude Solution, Bristol-Myers Squibb) в течение 6 недель. Образцы печени, извлеченные при умерщвлении животных, быстро замораживали в жидком азоте для иммунофлуоресцентного анализа.

ДНК ВГВ экстрагировали из образцов сыворотки с использованием набора QiAmp MinElute Virus spin kit (Qiagen, Hilden, Германия). ВГВ-специфичные праймеры и гибридизационные пробы использовали для количественного определения ДНК ВГВ при вирусемии и уровней кнкДНК, как описано ранее (Volz T. et al., *Gastroenterology*, 133, p. 843-852 (2007)). ДНК и РНК экстрагировали из образцов печени с использованием набора для очистки ДНК Master Pure DNA (Epicentre, Biozym, Германия) и набора для очистки РНК RNeasy RNA (Qiagen, Hilden, Германия). Внутривисцеральные уровни ДНК ВГВ нормализовали на клеточные уровни ДНК с использованием набора для гена β -глобина (Roche DNA control Kit, Roche Diagnostics). Уровни релаксированной кольцевой ДНК (ркДНК) оценивали, вычитая количество кнкДНК из общего количества ДНК ВГВ. Проводили обратную транскрипцию вирусных РНК и геномных РНК с использованием праймеров oligo-dT и набора для транскрипции Transcriptor Kit (Roche Applied Science) и определяли количественно с использованием праймеров, специфичных для общих вирусных РНК. Уровни РНК ВГВ нормализовали относительно РНК, специфичной к GAPDH человека. Количественное определение HBsAg в образцах крови проводили с использованием платформы Abbott Architect (quant. HBsAg kit, Abbott, Ирландия, Diagnostic Division) согласно инструкциям фирмы-производителя. Проводили иммунное окрашивание криостатных срезов печени химерных мышей с использованием моноклонального антитела, специфичного к цитokerатину-18 человека (Dako, Glostrup, Дания) для окрашивания гепатоцитов человека. Для детектирования корового антигена ВГВ (HBcAg) использовали поликлональное кроличье антитело против HBcAg. Специфичные сигналы визуализировали с применением вторичных антител, меченных красителем Alexa (Invitrogen, Darmstadt, Германия), или системы TSA-флуоресцеин (HBcAg) (Perkin Elmer, Jugesheim, Германия), в то время как окрашивание ядер проводили с использованием реагента Hoechst 33342 (фирмы Invitrogen). Окрашенные срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа.

Средний базовый уровень ДНК ВГВ в начале лечения составлял 2×10^6 копий ДНК/мл. В фазе распространения инфекции ВГВ (недели 3-6 после инфицирования (п/и)) в группе, которую лечили контрольным антителом, вирусемия возрастала на величину $>2 \log$, в то время как у мышей, которых лечили антителом НВС34 или энтекавиром, титры ВГВ снижались (фиг. 11).

При завершении эксперимента (т.е. на неделе 9) проводили также внутривисцеральный анализ мышей, регистрируя количество гепатоцитов, окрашенных в присутствии HBcAg. У мышей, которых лечили контрольным антителом, наблюдалось HBcAg-положительное окрашивание почти всех гепатоцитов, в то время как в обеих группах лечения энтекавиром и антителом НВС34 наблюдалось эффективное блокирование распространения вируса (приблизительно 1-5% HBcAg-положительных клеток). Эти результаты указывают на способность НВС34 эффективно блокировать распространение вируса в фазе активного распространения инфекции ВГВ (фиг. 12).

В соответствии с гистологическими и серологическими данными измерения кнкДНК показали, что внутривисцеральные уровни кнкДНК не отличаются значительно у мышей, которых умерщвляли через 3 недели после инфицирования ВГВ, и у мышей, которых лечили в течение периода неделя 3 -неделя 9 после инфицирования. Для сравнения, оцененное количество кнкДНК/клетка увеличивалось вплоть до $2 \log$ в контрольной группе мышей, умерщвленных через 9 недель после инфицирования, указывая на то, что у мышей, которых лечили, вновь образованные молекулы релаксированной кольцевой ДНК (ркДНК) не могут эффективно превращаться в кнкДНК (фиг. 13). Аналогичная тенденция также обнаружена при

измерении других внутрипеченочных вирусных параметров, таких как уровни ркДНК и РНК-транскриптов ВГВ.

Кроме того, измеряли исходные уровни циркулирующего в крови HBsAg (базовая линия (БЛ)) на неделе 3 лечения (неделя 6 после инфицирования) и на неделе 6 лечения (неделя 9 после инфицирования). Следует отметить, что у мышей, которых лечили антителом НВС34, уровни циркулирующего HBsAg снижались на величину $>1 \log$ (а также ниже предела детектирования), но не у мышей, которых лечили энтекавиром, в то время как в контрольной группе уровни HBsAg увеличивались на величину $>2 \log$ (достигая уровней 5000-10000 МЕ/мл) (фиг. 14). Присутствие антитела НВС34 не оказывает влияние на измерение HBsAg, как следует из результатов эксперимента (spike-in experiment) по проверке чистоты исследования, в ходе которого было установлено, что добавление антитела НВС34 в HBsAg-положительную сыворотку мыши не изменяет ожидаемый результат измерения с использованием набора Abbott Architect для проведения диагностического иммуноанализа.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что антитело НВС34 способно блокировать распространение вируса ВГВ и ускорять клиренс HBsAg.

Пример 7.

Введение антитела НВС34 гуманизированным мышам uPA с хронической инфекцией ВГВ ускоряет клиренс ВГВ и HBsAg.

Для имитации развития хронического гепатита В наивных гуманизированных мышей uPA/SCID инфицировали ВГВ, при этом через 12 недель после инфицирования наблюдался средний уровень ДНК ВГВ, равный 2×10^9 копий/мл, и уровень HBsAg, равный 10000 МЕ/мл. Указанные уровни соответствуют высоким уровням, которые обычно наблюдаются у человека с хронической инфекцией ВГВ.

Затем начиная с 12 недели после инфицирования мышей лечили либо антителом НВС34, либо контрольным антителом (1 мг/кг внутривенно (в/в) два раза в неделю) в течение 6 недель. Как показано на фиг. 15, титр ВГВ и уровни циркулирующего в крови HBsAg снижались у мышей, которых лечили антителом НВС34 в течение 3 недель (неделя 15 после инфицирования) и 6 недель (неделя 18 после инфицирования). Таким образом, лечение антителом НВС34 в течение 6 недель ускоряло четкое снижение как вирусемии ВГВ, так и снижение уровней HBsAg. Уровни HBeAg и альбумина человека у мышей, которых лечили антителом НВС34, не изменялись, что указывало на отсутствие токсического действия на печень.

Пример 8.

Введение антитела НВС34 блокирует инфекцию ВГ дельта *in vivo*.

Наивных гуманизированных мышей uPA/SCID совместно инфицировали полученной от пациента сывороткой, содержащей РНК ВГ дельта и ДНК ВГВ. Через пять недель после инфицирования (когда титры ВГВ достигли уровней от 10^7 до 10^9 , а титры РНК ВГ дельта достигли уровней от 10^3 до 10^6 копий/мл) мышам вводили НВС34 или контрольное антитело в течение 6 недель (1 мг/кг два раза в неделю внутривенно (в/в)).

ДНК ВГВ при вирусемии определяли, как описано в примерах 6 и 7. Вирусемии ВГД определяли обратной транскрипцией вирусной РНК (экстрагированной из образцов сыворотки с использованием набора QiAmp MinElute Virus Spin Kit, Qiagen, Venlo, Нидерланды) и количественной ОТ-ПЦР с использованием набора ABI Fast 1-Step Virus Master (Applied Biosystems, Carlsbad, США), ВГД-специфичных праймеров и зондов на приборе ABI ViiA7 (Applied Biosystems, Carlsbad, США).

Как видно на фиг. 16, антитело НВС34 эффективно блокирует распространение ВГ дельта как на неделе 3, так и на неделе 6 после лечения (недели 8 и 11, соответственно). Аналогично наблюдениям для мышей с хроническим гепатитом ВГВ, антитело НВС34 обеспечивает снижение титров вирусной ДНК ВГВ на величину $2 \log$ (фиг. 13).

Пример 9.

Уточнение картирования непрерывного эпитопа НВС34.

Для дополнительного уточнения распознавания эпитопа антителом НВС34, описанного в примере 5, получали новую библиотеку из 1520 пептидов, состоящих из 16 различных наборов.

Набор 1 (названный LIN15): линейные 15-членные пептиды, полученные из последовательности-мишени (SEQ ID NO: 5:

QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPISS

WAFGKFLWEWASARFSW,

J02203 (D, ауw3)) при смещении одного остатка.

Нативные остатки Суз защищали ацетамидометильной группой (так называемой "Acм", обозначены цифрой "2" в соответствующих аминокислотных последовательностях).

Набор 2 (названный LIN22): линейные 22-членные пептиды, полученные из последовательности-мишени (SEQ ID NO: 5:

QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPISS

WAFGKFLWEWASARFSW,

J02203 (D, ауw3)) при смещении одного остатка.

Нативные остатки Cys защищали группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 3 (названный LIN30): линейные 30-членные пептиды, полученные из последовательности-мишени (SEQ ID NO: 5):

QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPS

WAFGKFLWEWASARFSW,

J02203 (D, ауw3)) при смещении одного остатка.

Нативные остатки Cys защищали группой Acм (обозначены цифрой "2"). Набор 4 (названный LIN15.AA): пептиды из набора 1, но остатки в положениях 9 и 10 заменены на Ala. При наличии нативного Ala в любом положении его заменяли на Gly.

Набор 5 (названный LIN22.AA): пептиды из набора 2, но остатки в положениях 12 и 13 заменены на Ala. При наличии нативного Ala в любом положении его заменяли на Gly.

Набор 6 (названный LIN30.AA): пептиды из набора 3, но остатки в положениях 16 и 17 заменены на Ala. При наличии нативного Ala в любом положении его заменяли на Gly.

Набор 7 (названный CYS.A): комбинаторные пептиды длиной 27 остатков. В положениях 1-11 и 17-27 присутствуют линейные последовательности, которые содержат спаренные остатки Cys. Указанные 11-членные последовательности соединены через линкер "GGSGG" (SEQ ID NO: 79). Остатки Cys, которые не участвуют в образовании дисульфидных мостиковых связей, защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 8 (названный CYS.B): линейные 22-членные последовательности, которые содержат два остатка Cys, образующие дисульфидную мостиковую связь. Остатки Cys, которые не участвуют в образовании дисульфидной мостиковой связи, защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 9 (названный LOOP12): пептиды со структурно ограниченной конформацией длиной 12 остатков. В положениях 2-11 присутствуют 10-членные последовательности, полученные из последовательности-мишени антигенной петли HBV-S-Ag. В положениях 1 и 12 присутствуют остатки Cys, которые соединены фрагментом mP2 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 10 (названный LOOP15): пептиды со структурно ограниченной конформацией длиной 15 остатков. В положениях 2-14 присутствуют 13-членные последовательности, полученные из последовательности-мишени антигенной петли HBV-S-Ag. В положениях 1 и 15 присутствуют остатки Cys, которые соединены фрагментом mP2 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 11 (названный LOOP21): пептиды со структурно ограниченной конформацией длиной 21 остатков. В положениях 2-20 присутствуют 19-членные последовательности, полученные из последовательности-мишени антигенной петли HBV-S-Ag. В положениях 1 и 21 присутствуют остатки Cys, которые соединены фрагментом mP2 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 12 (названный LOOP31): пептиды со структурно ограниченной конформацией длиной 31 остатков. В положениях 2-30 присутствуют 29-членные последовательности, полученные из последовательности-мишени антигенной петли HBV-S-Ag. В положениях 1 и 31 присутствуют остатки Cys, которые соединены фрагментом mP2 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 13 (названный MAT.A): комбинаторные пептиды длиной 25 остатков. В положениях 2-12 и 14-24 присутствуют 11-членные пептиды, полученные из последовательности-мишени антигенной петли HBV-S-Ag. В положениях 1, 13 и 25 присутствуют остатки Cys, которые соединены фрагментом T3 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 14 (названный MAT.B): комбинаторные пептиды длиной 28 остатков. В положениях 2-12 и 14-27 присутствуют 11-членные и 14-членные пептиды, соответственно. В положениях 1, 13 и 28 присутствуют остатки Cys, которые соединены фрагментом T3 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 15 (названный MAT.C): комбинаторные пептиды длиной 28 остатков. В положениях 2-15 и 17-27 присутствуют 14-членные и 11-членные пептиды, соответственно. В положениях 1, 16 и 28 присутствуют остатки Cys, которые соединены фрагментом T3 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 16 (названный MAT.D): комбинаторные пептиды длиной 31 остатков. В положениях 2-15 и 17-30 присутствуют 14-членные пептиды, полученные из последовательности-мишени антигенной петли HBV-S-Ag. В положениях 1, 16 и 31 присутствуют остатки Cys, которые соединены фрагментом T3 CLIPS. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

При испытании в условиях повышенной жесткости антитело HBC34 не связывалось ни с одним пептидом на чипах. При испытании в условиях пониженной жесткости (5 мкг/мл в 0,1% буферном растворе Perscan и растворе для предварительного кондиционирования, содержащем комбинацию лошадиной сыворотки и овальбумина) антитело связывалось с пептидами со структурно ограниченной конфор-

мацией и с комбинаторными пептидами, при этом наблюдали незначительно более низкую эффективность связывания с пептидами из набора 14 и набора 16 по сравнению с пептидами из набора 13 и набора 15. Связывание на миметиках линейных эпитопов не наблюдали. Данные показаны на фиг. 17. Указанные данные свидетельствуют о том, что антитело HBC34 распознает конформационный непрерывный эпитоп, состоящий из пептидных фрагментов $_{18}\text{TGPCRTC}_{24}$ (SEQ ID NO: 80) и $_{45}\text{GNCTCIP}_{51}$ (SEQ ID NO: 81), при этом пептидный фрагмент $_{18}\text{TGPCRTC}_{24}$ (SEQ ID NO: 80) является доминантной частью эпитопа (фиг. 17).

Для уточнения картирования эпитопа антитела HBC34 при проведении анализа полной замены, основанного на описанных выше результатах, синтезировали 812 непрерывных или петлевых пептидов T3 CLIPS, состоящих из трех различных наборов.

Набор 1 (названный RN1, непрерывный T3 CLIPS): серии мутантных форм эпитопов получали из непрерывного миметика $\text{C2IPSSWAFGCSTTSTGP2RT2C}$ (SEQ ID NO: 82). Анализ замены проводили для каждого положения в указанной последовательности. Другими словами, для каждого положения в пептидной последовательности получали варианты, в которых исходную аминокислоту в указанном положении заменяли на одну из 13 аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аланина (A), глутаминовой кислоты (E), фенилаланина (F), глицина (G), гистидина (H), лизина (K), лейцина (L), пролина (P), глутамин (Q), аргинина (R), серина (S), валина (V), тирозина (Y) и " ", где знак " " обозначает делецию остатка. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 2 (названный RN2, непрерывный T3 CLIPS): серии мутантных форм эпитопов получали из непрерывного миметика $\text{CGN2T2IPSSWAFGCSTTSTGP2RT2C}$ (SEQ ID NO: 83).

Анализ замены проводили для каждого положения в указанной последовательности аналогично тому, как описано для набора 1 (т.е. остатки GN2T не мутированы). Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Набор 3 (названный RN3, петлевой T3 CLIPS): серии мутантных форм эпитопов получали из петлевого миметика CGGGCSTTSTGP2RT2C (SEQ ID NO: 84).

Анализ замены проводили для положений 6-16 в указанной последовательности аналогично тому, как описано для набора 1. Нативные остатки Cys защищены группой Acм (обозначены цифрой "2").

Антитело HBC34 испытывали методом ИФА на основе системы PEPSCAN при концентрации 20 мкг/мл на пептидном чипе, предварительно кондиционированном в 0,1% растворе SQ (буферный раствор Pepsan, содержащий 0,1% комбинации лошадиной сыворотки и овальбумина). Пептидные чипы инкубировали в растворе антитела HBC34 (в течение ночи при 4°C). После промывки пептидные чипы инкубировали соответствующим конъюгатом антитела с пероксидазой (SBA) (при разведении 1:1000) в течение 1 ч при 25°C. После промывки добавляли субстрат пероксидазы, 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолинсульфонат (ABTS), и 20 мкг/мл 3% раствора H_2O_2 . Через 1 ч измеряли развитие окрашивания. Развитие окрашивания определяли количественно с использованием камеры прибора с зарядовой связью (CCD) и системы обработки изображений.

Как ожидалось, при испытании в условиях повышенной жесткости антитело HBC34 связывалось с пептидами из всех наборов. В результате в эксперименте было установлено, что остатки $_{120}\text{PCR}_{122}$ и C_{124} играют основную роль в связывании, в то время, как только некоторые замены остатков I150, I152, W156 и F158 заметно снижают связывание (фиг. 18). Кроме того, данные, зарегистрированные согласованно на всех трех чипах, свидетельствовали о том, что замена любого остатка в области $_{114}\text{STTSTGPCRTC}_{124}$ (SEQ ID NO: 85) на E приводит к снижению связывания, в то время как обратные замены на R или Y усиливают связывание. Однако для области $_{145}\text{GNCTCIPSSWAF}_{159}$ (SEQ ID NO: 86) аналогичная тенденция не наблюдалась.

В совокупности представленные результаты свидетельствуют о том, что антитело HBC34 распознает непрерывный эпитоп, при этом присутствие остатков $_{120}\text{PCR}_{122}$ и C_{124} играет основную роль в связывании. Установлено, что присутствие остатков $_{145}\text{GNCTCIPSSWAF}_{158}$ (SEQ ID NO: 87) обеспечивает структурное окружение для установления и стабилизации взаимодействий эпитоп - паратоп. Этот вывод основан на наблюдении о том, что миметики непрерывных эпитопов (если в одном миметике присутствуют последовательности $_{145}\text{GNCTCIPSSWAF}_{158}$ (SEQ ID NO: 87) и $_{114}\text{STTSTGPCRTC}_{124}$ (SEQ ID NO: 85)) являются более устойчивыми к заменам по сравнению с последовательностью $_{114}\text{STTSTGPCRTC}_{124}$ (SEQ ID NO: 85) отдельности (набор 3, RN3). Кроме того, было установлено, что P_{151} , который фиксирует торсионные углы, тем самым обеспечивая конформационную жесткость, влияет на связывание прежде всего, если он заменен на G, который, как известно, характеризуется обратными свойствами. Замена G145P аналогичным образом влияет на связывание HBC34. Многократно наблюдалось, что замены R/Y повышают эффективность связывания в любом положении в мотиве $_{114}\text{STTSTGPCRTC}_{124}$ (SEQ ID NO: 85) но не в мотиве $_{145}\text{GNCTCIPSSWAF}_{158}$ (SEQ ID NO: 87) в то время как замены E снижают эффективность связывания. Указанное наблюдение может свидетельствовать о том, что остатки $_{114}\text{STTSTGPCRTC}_{124}$ (SEQ ID NO: 85) связываются с отрицательно заряженным

паратопом в антителе НВС34 (или вблизи кластера отрицательных зарядов), при этом повышение эффективности связывания, а также его снижение являются результатом электростатических сил и скорее характеризуют свойства паратопа, а не свойства эпитопа.

Пример 10.

Повышенное снижение НВsAg у гуманизированных мышей uPA с хронической инфекцией ВГВ, которых лечили комбинацией НВС34 и ламивудина.

В следующем испытании исследовали эффективность комбинированного лечения, включающего использование антитела НВС34. Для использования в комбинации с НВС34 был выбран ингибитор полимеразы, а именно ламивудин.

Для имитации развития хронического гепатита В наивных гуманизированных мышей uPA/SCID инфицировали ВГВ, и через 8 недель после инфицирования средний уровень ДНК ВГВ достигал 2×10^9 копий/мл, а уровень НВsAg достигал 9000 МЕ/мл. Указанные уровни соответствовали высоким уровням, которые обычно наблюдаются у пациентов с хронической инфекцией ВГВ.

Затем начиная с недели 8 после инфицирования мышей лечили либо антителом НВС34 в отдельности, ингибитором полимеразы, ламивудином, в отдельности или комбинацией НВС34 и ламивудина, или лечили контрольным антителом в течение 4 недель (НВС34 вводили в дозе 1 мг/кг внутривенно (в/в) два раза в неделю, ламивудин добавляли в питьевую воду в дозе 0,4 мг/мл).

Вирусемия ВГВ и уровни НВsAg в сыворотке оценивали на неделе 0 лечения (до начала лечения), на неделе 2 лечения, на неделе 4 лечения, на неделе 6 лечения или на неделе 0 лечения (до начала лечения), на неделе 3 лечения и на неделе 6 лечения. Результаты показаны на фиг. 19 А (вирусемия ВГВ) и Б (НВsAg).

Как показано на фиг. 19, лечение НВС34, ламивудином или обоими лекарственными средствами в комбинации вызывало снижение вирусемии (А) в среднем на величину 0,7 log, 1,3 log и 2,4 lg, соответственно. Следует отметить, что уровень НВsAg (Б) снижался на величину 1,3 log (средний уровень БЛ составлял 15600 МЕ/мл) у мышей, которых лечили антителом НВС34 в отдельности, и на величину 2,6 log (средний уровень БЛ составлял 2600 МЕ/мл) в группе мышей, которых лечили комбинацией, в то время как у мышей, которых лечили ламивудином в отдельности, значительного снижения уровня НВsAg не наблюдали (0,2 log, средний уровень БЛ составлял 9000 МЕ/мл).

Подводя итог, комбинированное лечение НВС34 и ламивудином явно обеспечивало наиболее сильный эффект. Интересно отметить, что такой сильный эффект комбинации НВС34 и ламивудина наблюдался, даже если лечение ламивудином в отдельности было неэффективным. В связи с этим наблюдаемый сильный эффект комбинации НВС34 и ламивудина явно указывает на неожиданное синергетическое действие.

Таким образом, неожиданно сильное снижение НВsAg, достигаемое при комбинированном лечении, доказывает, что антитело НВС34 можно использовать наряду с ингибиторами полимеразы, например, при развитии хронического заболевания, чтобы ускорить клиренс НВsAg как у пациентов с моноинфекцией ВГВ, так и у пациентов с совместной инфекцией ВГВ/ВГ дельта.

Пример 11.

Конструирование последовательностей антитела НВС34: CDR3 в VH и VL областях.

Первые серии мутантных форм НВС34 конструировали с использованием мутаций в CDR3 в VH и VL областях, т.е. при замене (i) остатка W107 в CDR3 в VH области либо на А, либо на F, (ii) остатка M115 в CDR3 в VH области на I или на L и/или (iii) остатка W107 в CDR3 в VL области либо на А, либо на F. Все 18 вариантов НВС34 получали при комбинировании немутированной VH или VL области НВС34 (здесь и далее называется дикий тип (WT) или исходное антитело) с различными комбинациями мутантных форм VH и VL, как показано на фиг. 20 и 21.

Продуцирование вариантов антитела НВС34 исследовали методом ИФА в отношении связывания с антигеном НВsAg adw аналогично тому, как описано в примере 1. Результаты показаны на фиг. 21.

Следует отметить, что мутация W107 в CDR3 в VH области на А (в вариантах НВС34-V5, НВС34-V8, НВС34-V9, НВС34-V10, НВС34-V12 и НВС34-V17, фиг. 21) полностью отменяет связывание НВС34 с НВsAg. Это указывает на то, что W107 является важным остатком в паратопе НВС34 в отношении распознавания антигена. Мутация W107 в CDR3 в VH области на F (аминокислота с теми же ароматическими свойствами, как и W) частично влияет на связывание НВС34 (НВС34-V1), что указывает на то, что мутацию W нельзя провести без сопутствующего снижения связывающей аффинности НВС34 в отношении НВsAg.

Мутация M115 в CDR3 в VH области на L не влияет на связывание НВС34 (НВС34-V13), в то время как мутация на I (НВС34-V11) частично снижает связывание НВС34, указывая на то, что M115 нельзя заменить ни на L, ни на I без сопутствующего снижения связывания НВС34. В соответствии с результатами, полученными для единичной мутации W107A, двойная мутация W107A и M115A (НВС34-V10) полностью отменяет связывание НВС34.

Мутация W107 в CDR3 в VL области на F не влияет на связывание НВС34 (НВС34-V7), в то время как мутация на А (НВС34-V15) частично снижает связывание НВС34, указывая на то, что без сопутствующего снижения связывания НВС34, W107 в CDR3 в области VL можно заменить на F, но не на А.

Как ожидалось, комбинация мутаций W107F в CDR3 в VH области и W107A в CDR3 в VL области полностью отменяет связывание (HBC34-v2). Комбинация мутаций M115L в CDR3 в VH области и W107F в CDR3 в VL области (HBC34-V6), мутаций M115I в CDR3 в области VH с W107F в CDR3 в области VL (HBC34-V4) и мутаций W107F в CDR3 в VH области и W107F в CDR3 в VL области частично влияет на связывание HBC34 с HBsAg, указывая на то, комбинация этих двух мутаций, но не отдельные мутации, не совместима с сохранением связывающей аффинности исходного антитела HBC34.

На следующей стадии шесть из 18 описанных выше вариантов HBC34 выбирали для дополнительной характеристики (HBC34-V1, V3, V4, V6, V7, V11 и V13), чтобы (i) подтвердить исходные результаты, (ii) измерить связывающую аффинность методом ИФА (т.е. для определения EC_{50} связывания) и (iii) оценить продуцирование указанных вариантов HBC34 во временно трансфектированных клетках 293-Expi (фиг. 22 и 23).

Как наблюдали в первом эксперименте, вариант HBC34-V3 (несущий двойную мутацию W107F в CDR3 в VH области и W107F в CDR3 в VL области) связывался с HBsAg (серотип adw), при этом EC_{50} повышалось в 9 раз по сравнению с исходным антителом HBC34. Кроме того, вариант HBC34-V3 продуцировался при концентрации почти в 5 раз более низкой по сравнению с HBC34. Варианты HBC34-V11 и HBC34-V13, несущие единичную мутацию M115I и M115L, соответственно, связывались с HBsAg, при этом наблюдалось EC_{50} , равное или незначительно более высокое по сравнению с HBC34. Однако оба варианта продуцировались менее эффективно по сравнению с HBC34 (по сравнению с HBC34 продуктивность снижалась в 0,6- и 0,3-раза). Указанные результаты свидетельствуют о том, что вариант HBC34-V11 и даже в большей степени вариант HBC34-V13 связываются с высокой аффинностью с HBsAg, но продуцируются В-клетках млекопитающих менее эффективно. Аналогичным образом, вариант HBC34-V1, несущий единичную мутацию W107F в CDR3 в VH области, связывался с HBsAg с аффинностью, сравнимой с HBC34 (EC_{50} повышалось в 1,6-раза), но продуцировался в 4 раза менее эффективно (т.е. в 0,25 раз меньше) по сравнению с HBC34. Комбинация мутации W107 в CDR3 в VL области либо с W107, M115I или M115L в CDR3 в VH области (HBC34-V3, HBC34-V4 и HBC34-V6) снижает как связывающую аффинность (EC_{50} повышалась в 1,6-9,0 раз), так и продуктивность (концентрация антитела в культуральных супернатантах снижалась в 0,20-0,35 раза). Неожиданно было установлено, что вариант с единичной мутацией W107F в CDR3 в VL области (HBC34-V7) связывается с HBsAg с аффинностью, аналогичной HBC34, и продуцируется даже более эффективно (вплоть до 1,7 раз) по сравнению с HBC34, обеспечивая чрезвычайно высокую концентрацию в культуральном супернатанте, равную 533 мкг/мл (фиг. 23).

Пример 12.

Конструирование последовательностей антитела HBC34: каркасные области.

Получали двенадцать дополнительных вариантов HBC34 (варианты HBC34-V19 - HBC34-V30, фиг. 24А), в которые включали несколько мутаций в каркасные области (FR) в обеих VH и VL областях, которые соответствовали остаткам, присутствующим в обычном не-мутированном предшественнике HBC34 (HBC34-UCA) (фиг. 20), и комбинировали с мутацией M115L в CDR3 в VH области и с мутацией W107F в CDR3 в VL области.

Результаты показаны на фиг. 24. Включение 9 мутаций в FR в VL области (HBC34-27, HBC34-V28, HBC34-V29 и HBC34-V30) в присутствии мутации W107 в CDR3 в VL области в комбинации с M115L WT значительно снижало эффективность связывания HBC34 с HBsAg, таким образом указывая на важную роль мутированных остатков в VL (фиг. 24А-Б). Варианты HBC34, в которых тот же описанный выше вариант VL (т.е. W107F/FR1234-GL) комбинировали с VH областью, несущей мутацию M115L и 9 дополнительных мутаций в FR областях, не связывались с HBsAg, указывая на существенный вклад мутаций в обеих VH и VL областях в связывании с HBsAg.

Важно отметить, что удаление только одной из 9 мутаций, введенных в FR в VL области (т.е. K66Y), в HBC34-V23 и HBC34-V24 значительно повышает связывание (EC_{50} снижалось в 100 раз) с HBsAg по сравнению с соответствующими вариантами, несущими мутацию Y66K (HBC34-V27 и HBC34-V28). Аналогичным образом, удаление мутации K66Y в HBC34-V25 и HBC34-V26 восстанавливает связывание с HBsAg по сравнению с соответствующими несвязывающими вариантами, несущими мутацию Y66K (HBC34-V27 и HBC34-V28).

Среди указанных вариантов, вариант HBC34-V23 сохраняет высокую связывающую аффинность (EC_{50} повышалось в 1,5 раза по сравнению с HBC34) и продуцируется аналогично исходному антителу HBC34. Следует отметить, что вариант HBC34-V24, отличающийся только одной аминокислотой от варианта HBC34-V23 (т.е. M115L в VH), связывается с HBsAg и характеризуется EC_{50} , аналогичным EC_{50} для варианта HBC34-V23, но продуцируется неэффективно (продуктивность составляет только 0,14 продуктивности HBC34). Представленные результаты указывают на то, что присутствие L в положении 115 хотя и не влияет значительно на связывание вариантов HBC34 с HBsAg, оказывает негативное воздействие на продуцирование вариантов HBC34, несущих указанную мутацию. Действительно, в среднем все варианты HBC34, несущие мутацию M115L (HBC34-V6, HBC34-V13, HBC34-V19, HBC34-V20, HBC34-V21, HBC34-V22, HBC34-V24, HBC34-V25, HBC34-V26, HBC34-V28, HBC34-V29 и HBC34-V30), характеризуются продуктивностью, которая составляет 0,3 продуктивности исходного антитела HBC34.

Важно отметить, что введение 5 или 9 мутаций в FR в VH области при наличии мутации M115L в CDR3 в VH области (варианты HBC34-V19 и HBC34-V20 соответственно) существенно не снижает связывание с HBsAg, указывая на то, что мутированные остатки не играют значительной роли в высокоаффинном распознавании антигена антителом HBC34. Введение мутации W107F в основную цепь вариантов HBC34-V19 и HBC34-V20 в вариантах HBC34-V21 и HBC34-V22 снижает связывание с HBsAg в 20-30 раз. Интересно отметить, что та же самая мутация (т.е. W107 в CDR3 в VL области) не влияет на связывание других вариантов, не содержащих 5 или 9 мутаций в FR в VH областях, и такой результат может указывать на кооперативную роль остатков в FR в VH областях (например, при стабилизации определенной конформации каркаса в вариабельной области) при связывании с HBsAg с остатком 107 VH.

Наконец, в соответствии с результатами, описанными в примере 11, показанными на фиг. 23, для антитела HMB34-V7, несущего единичную мутацию W107 в CDR3 в VL области, наблюдается сравнимое с HBC34 связывание с HBsAg (т.е. повышение 1,4 раза), и указанное антитело продуцируется более эффективно (повышение в 1,2 раза) по сравнению с HBC34 (в среднем при проведении двух экспериментов продуктивность HBC34-V7 повышалась в 1,5 раза, т.е. эффективность повышалась на 50% по сравнению с антителом HBC34). Этот результат позволяет предположить, что мутация W107F в CDR3 в VL области хотя и не влияет существенно на связывающую аффинность в отношении HBsAg, но оказывает положительное влияние на продуцирование антитела HBC34.

Наконец, методом анализа проточной цитометрии исследовали способность HBC34 и вариантов HBC34-V6, HBC34-V7, HBC34-V19, HBC34-V23 и HBC34-V24 распознавать 10 генотипов ВГВ: А, В, С, D, E, F, G, H, I и J (как показано на фиг. 25). Прежде всего, эпителиальные клетки человека (клетки Нер2) трансфектировали плазмидами, экспрессирующими каждый из HBsAg 10 генотипов ВГВ: А, В, С, D, E, F, G, H, I и J. Все антитела исследовали в различных концентрациях (8 серийных разведений от 5000 нг/мл до 7 нг/мл) при окрашивании временно трансфектированных пермеабилizированных клеток. Через два дня после трансфекции клетки Нер2 собирали, фиксировали и пермеабилizировали сапонином для иммуноокрашивания антителом HBC34 и пятью выбранными вариантами. Связывание антител с трансфектированными клетками анализировали на приборе Becton Dickinson FACSCanto2 (фирмы BD Biosciences) с использованием программного обеспечения FlowJo (фирмы TreeStar). Как показано на фиг. 25, HBC34 и все пять исследованных вариантов распознают HBsAg всех 10 генотипов ВГВ на одинаковом уровне.

Таблица последовательностей и номера последовательностей SEQ ID
(перечень 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 аминокислоту.	эпитоп
2	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G где X ₁ означает Р, Т или S, X ₂ означает С или S, X ₃ означает R, K, D или I, X ₄ означает М или Т, X ₅ означает Т, А или I, X ₆ означает Т, Р или L, и X ₇ означает Q, H или L.	

3	MENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIPQSLDSWWTSNLFGLGTTVC LGQNSQSPTSNNHSPTSCPTCPGYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVL LDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSD GNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTV WLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI	S домен HBsAg (код доступа GenBank № J02203)
4	MENVTSGLGPLLVLQAGFLLTRILTIPQSLDSWWTSNLFGLGTTVC CLGQNSQSPTSNNHSPTSCPTCPGYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVL LDYQGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCCTTAQGTSMYPSCCCTKPSD GNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTV WLSVIWMMWYWGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCLWVYI	S домен HBsAg (код доступа GenBank № FJ899792)
5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	J02203 (D, ayw3)
6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCCTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	FJ899792 (D, adw2)
7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFKYLWEWASVRFSW	AM282986 (A)
8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKPTDGNC TCIIPSSWAFKYLWEWASVRFSW	D23678 (B1)
9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFARFLWEWASVRFSW	AB117758 (C1)
10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCCTTLAQGTSMFPSCCCKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	AB205192 (E)
11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCCKPSDGNC TCIIPSSWALGKYLWEWASARFSW	X69798 (F4)
12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFKYLWEWASVRFSW	AF160501 (G)
13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKYLWEWASARFSW	AY090454 (H)
14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFKYLWEWASARFSW	AF241409 (I)
15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCCTTAQGTSMFPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFKFLWEWASVRFSW	AB486012 (J)
16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGN CTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Y100C/P120T
17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T
18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPLDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T/S143L
19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg C121S
20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122D
21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGCITCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCT CIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122I
22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg T123N
23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCCTPAHGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129H
24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCCTPALGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129L
25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCCTPAQGTSHYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133H
26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCCTPAQGTSLYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133L

27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSTYPSCCCTKPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133T
28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTEPSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg K141E
29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKSSDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P142S
30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPKDGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg S143K
31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSAGNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg D144A
32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDRNC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg G145R
33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGAC TCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg N146A
34	GRIFRSFY	CDRH1 aa
35	NQDGSEK	CDRH2 aa
36	AAWSGNSGGMDV	CDRH3 aa
37	KLGNKN	CDRL1 aa
38	EVK	CDRL2 aa
39	VIYEVKYRP	длинный вариант CDRL2 aa
40	QTWDSTTVV	CDRL3 aa
41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGL EWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDT AVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSS	VH aa
42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQSPVLVI YEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTDWSTT VVFGGGTRLTVL	VL aa
43	GGACGCATCTTTAGAAGTTTTAC	CDRH1 nuc
44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA	CDRH2 nuc
45	GCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTATGGACGTC	CDRH3 nuc
46	AAATTGGGGAATAAAAAAT	CDRL1 nuc
47	GAGGTAAA	CDRL2 nuc
48	gcatctatGAGGTTAAAtaccgcccc	длинный вариант CDRL2 nuc
49	CAGACGTGGGACAGCACCACTGTGGTG	CDRL3 nuc
50	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCGGG GGGGTCCCAGAGACTGTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCTTTAG AAGTTTTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGC TGGAGTGGGTGGCCACTATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAATTA TATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC GCCAAGAAGTCACTATTCTGCAAATGAACAACCTGAGAGTCGA GGACACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCTTGGAGCGGCAATAGTG GGGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCTCCGTCTCC TCA	VH nuc
51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGA CAGACAGTCAGCATCCCCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGAATAA AAATGTTTGTGGTTTCAGCATAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTT GGTCATCTATGAGGTTAAATACCGCCCCTCGGGGATTCTTGAGCG ATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAG CGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGCCTATTCTGTGACAGCGT GGACAGCACCACTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAGGCTGACCG TCCTA	VL nuc

52	<u>X</u> GSSTTSTGPCRTCMT <u>X</u> PSDGN <u>A</u> T <u>A</u> IPIPS <u>S</u> <u>X</u> где остатки, обозначенные символом X, заменены на остатки цистенна.	пептид
53	TSTGPCRTCMTTAQG	пептид
54	GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT	пептид
55	<u>X</u> SMYPS <u>A</u> <u>S</u> <u>A</u> T <u>K</u> PSDGN <u>X</u> TGPCRTCMTTAQGT <u>S</u> <u>X</u> где остатки, обозначенные символом X, заменены на остатки цистенна.	пептид
56	PCRTCMTTAQG	аминокислоты 120-130 S домена HBsAg (HBV-D J02203)
57	PCX ₁ TCX ₂ X ₃ X ₄ AQG, где X ₁ предпочтительно означает R или K, X ₂ предпочтительно означает M или T, X ₃ предпочтительно означает T или I, и X ₄ предпочтительно означает T, P или L.	эпитоп
58	QTFDSTTVV	CDRL3 v7 и CDRL3 v23 (aa)
59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVCWFQHKPGQSPVLVI YEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL	VL v7
60	AAGCTGGGGAACAAAAAT	CDRL1 v7 и CDRL1 v23 (nuc)
61	GAGGTGAAA	CDRL2 v7 и CDRL2 v23 nuc
62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT	длинный вариант CDRL2 v7 и длинный вариант CDRL2 v23 nuc
63	CAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTC	CDRL3 v7 и CDRL3 v23 nuc
64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTGTCCGTCTCTCCAGGA CAGACCGTGTCCATCCCTTGCTCTGGCGACAAGCTGGGGAACAA AAATGTCTGTTGGTTCCAGCACAAGCCAGGGCAGAGTCCCGTGCT GGTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCTTCAGGAATTCCAGAAC GGTTCAGCGGATCAAACAGCGGCAATACTGCAACCCTGACAATT AGCGGGACCCAGGCCATGGACGAAGCCGCTTATTTCTGCCAGAC ATTCGATTCCACCACAGTGGTCTTTGGCGGGGAACTAGGCTGAC CGTGCTG	VL v7 nuc
65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKNACWYQQKPGQSPVLVI YEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTT VVFGGGTKLTVL	VL v23 aa
66	INQDGSEK	HBC34 WT CDRH2 aa
67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLE WVANINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNNLRVEDT AVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTITVTVSS	HBC34 v31, HBC34 v32 и HBC34 v33 VH

68	GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGCGGGGGACTGGTGCAGCCTGG CGGCTCACTGAGACTGAGCTGTGCAGCTTCTGGAAGAATCTTCAG ATCTTTTACATGAGTTGGGTGAGACAGGCTCCTGGGAAGGGACT GGAGTGGGTGCGAAACATCAATCAGGACGGATCAGAAAAGCTGT ATGTGGATAGCGTCAAAGGCAGGTTCACTATTTCCCGCGACAAC GCCAAAAATTCTCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGGGTGGAG GATACCGCTGTCTACTATTGTGCAGCCTGGTCTGGCAACAGTGGA GGCATGGACGTGTGGGGACAGGGAACACAGTGACAGTCAGCTC C	HBC34 v31, HBC34 v32 и HBC34 v33 VH (nuc)
69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTGTCCGTCTCTCCAGGC CAGACAGCATCCATCACTTGCTCTGGCGACAAGCTGGGGAACAA AAATGCCGTGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGCAGAGTCCCGTGC TGGTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCTTCAGGAATTCCAGAA AGATTCACTGGATCAAACAGCGGCAATACTGCTACCTGACAAT TAGCGGGACCCAGGCCATGGACGAAGCTGATTACTATTGCCAGA CATTTCGATTCCACCACAGTGGTCTTTGGCGGGGGAACCTAAGCTGA CCGTGCTG	VL v23 nuc
70	GAAGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGAGGGTGGGTCCAGCCCCGG AGGGAGCCAGAGACTGTCTGTGCCGCATCAGGGAGGATCTTCA GGAGCTTCTACATGTCTGGGTGCGCCAGGCACCAAGGCAAGGGA CTGGAGTGGGTGCGCCACCATCAACCAGGACGGATCTGAAAAGCT GTATGTGGATAGTGTCAAAGGCCGGTTCACAATTAGCAGAGACA ACGCTAAAAATTCTCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGAGTGG AGGATACCGCCGTCTACTATTGCGCCGCTTGGTCTGGCAACAGCG GCGGGATGGATGTCTGGGGGCAGGGCACAAACAGTGAGCGTCTCT TCC	HBC34 WT VH кодон-оптимизи- рованная
71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTCTCCGTCTCACCTGGA CAGACCGTCTCAATCCCCTGCTCCGGCGAT AAACTGGGCAACAAGAAGTGTGCTGGTTCAGCACAAACCCGG ACAGAGTCTGTGCTGGTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCAA GCGGCATTCCCGAAAGATTACGCGGCTCCAATCTGGGAATACC GCAACACTGACTATCTCTGGAACCCAGGCAATGGACGAGGCAGC TACTTTTGCCAGACTTGGGATTCAACTACTGTCTGTTCGGCGG CGGAACTAGACTGACTGTCCTG	HBC34 WT VL кодон-оптимизи- рованная
72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC	HBC34 WT CDRH1 кодон- оптимизи- рованная
73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG	HBC34 WT CDRH2 кодон- оптимизи- рованная
74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATGTC	HBC34 WT CDRH3 кодон- оптимизи- рованная
75	AAACTGGGCAACAAGAAC	HBC34 WT CDRL1 кодон- оптимизи- рованная
76	GAGGTCAAG	HBC34 WT CDRL2 кодон- оптимизи- рованная

77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA	HBC34 WT CDRL2 длинный кодон-оптимизи- рованный вариант
78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTG	HBC34 WT CDRL3 кодон- оптимизи- рованная
79	GGSGG	линкер
80	TGPCRTC	эпитоп
81	GNCTCIP	эпитоп
82	CCIPSSWAFGCSTTSTGPCRTCC где прежде всего остатки цистеина в положениях 2, 21, и 24 замещены ацетамидометильной группой.	миметик непрерывного эпитопа
83	<u>C</u> GNCTCIPSSWAF <u>C</u> STTSTGPCRTCC где прежде всего остатки цистеина в положениях 4, 6, 24 и 27 замещены ацетамидометильной группой.	миметик непрерывного эпитопа
84	CGGGCSTTSTGPCRTCC где прежде всего остатки цистеина в положениях 13 и 16 замещены ацетамидометильной группой.	миметик петлевого эпитопа
85	STTSTGPCRTC	эпитоп
86	GNCTCIPSSWAF	эпитоп
87	GNCTCIPSSWAF	эпитоп
88	PCRXC	эпитоп

Перечень последовательностей

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is Cys or Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is Arg, Lys, Asp or Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is Met or Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is Thr, Ala or Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is Thr, Pro or Leu

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is Gln, His or Leu

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Gly
1              5              10

<210> 3
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> S домен HBsAg (GenBank acc. no. J02203)

<400> 3

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1              5              10              15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
                20              25              30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
                35              40              45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50              55              60

```

038301

Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
195 200 205

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 4
<211> 226
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> S домен HBsAg (GenBank acc. no. FJ899792)

<400> 4

Met Glu Asn Val Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

038301

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
 35 40 45
 Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
 50 55 60
 Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80
 Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
 85 90 95
 Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
 100 105 110
 Ser Ser Thr Thr Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
 130 135 140
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
 145 150 155 160
 Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
 165 170 175
 Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
 180 185 190
 Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Thr
 195 200 205
 Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
 210 215 220
 Tyr Ile
 225

<210> 5
 <211> 72
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> область антигенной петли J02203 (D, аyw3)

038301

<400> 5

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 6

<211> 72

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> область антигенной петли FJ899792 (D, adw2)

<400> 6

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 7

<211> 72

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> область антигенной петли AM282986 (A)

038301

<400> 7

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Thr Thr Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 8

<211> 72

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> область антигенной петли D23678 (B1)

<400> 8

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 9

<211> 72

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> область антигенной петли AB117758 (C1)

<400> 9

038301

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 10
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли AB205192 (E)

<400> 10

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 11
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли X69798 (F4)

<400> 11

038301

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Leu Gly Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 12

<211> 72

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> область антигенной петли AF160501 (G)

<400> 12

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 13

<211> 72

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> область антигенной петли AY090454 (H)

<400> 13

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr

038301

1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 14
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли AF241409 (I)

<400> 14

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 15
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли AB486012 (J)

<400> 15

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
1 5 10 15

038301

Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Ile Thr Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 16
<211> 73
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg Y100C/P120T

<400> 16

Cys Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr
1 5 10 15

Thr Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr
20 25 30

Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys
35 40 45

Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp
50 55 60

Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 17
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg P120T

<400> 17

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

038301

Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 18
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg P120T/S143L

<400> 18

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Leu Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 19
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg C121S

<400> 19

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

038301

Gly Thr Gly Pro Ser Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 20
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg R122D

<400> 20

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Asp Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 21
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg R122I

<400> 21

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Ile Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser

038301

20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 22
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg T123N

<400> 22

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Asn Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 23
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg Q129H

<400> 23

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala His Gly Thr Ser
20 25 30

038301

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 24
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg Q129L

<400> 24

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Leu Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 25
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg M133H

<400> 25

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

038301

His Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 26
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg M133L

<400> 26

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Leu Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 27
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg M133T

<400> 27

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

038301

Thr Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 28
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg K141E

<400> 28

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Glu Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 29
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg P142S

<400> 29

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Ser Ser Asp Gly Asn Cys Thr

038301

35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 30
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg S143K

<400> 30

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Lys Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 31
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg D144A

<400> 31

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Ala Gly Asn Cys Thr
35 40 45

038301

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 32
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg G145R

<400> 32

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Arg Asn Cys Thr
35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 33
<211> 72
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> область антигенной петли HBsAg N146A

<400> 33

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Ala Cys Thr
35 40 45

038301

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 34
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> антитело HBC34 CDRH1 aa

<400> 34

Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe Tyr
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> антитело HBC34 CDRH2 aa

<400> 35

Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 36
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> антитело HBC34 CDRH3 aa

<400> 36

Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 37
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> антитело HBC34 CDRL1 aa

<400> 37

038301

Lys Leu Gly Asn Lys Asn
1 5

<210> 38

<400> 38
000

<210> 39
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> антитело HBC34 CDRL2 long aa

<400> 39

Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> антитело HBC34 CDRL3 aa

<400> 40

Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
1 5

<210> 41
<211> 119
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> антитело HBC34 VH aa

<400> 41

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

038301

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Ser Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 106
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> антитело HBC34 VL aa

<400> 42

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30

Cys Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 43
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> антитело HBC34 CDRH1 nuc

 <400> 43
 ggacgcatct ttagaagttt ttac 24

 <210> 44
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> антитело HBC34 CDRH2 nuc

 <400> 44
 ataaaccaag atggaagtga gaaa 24

 <210> 45
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> антитело HBC34 CDRH3 nuc

 <400> 45
 gcggcttgga gcggcaatag tgggggtatg gacgtc 36

 <210> 46
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> антитело HBC34 CDRL1 nuc

 <400> 46
 aaattgggga ataaaaat 18

 <210> 47

 <400> 47
 000

 <210> 48
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> антитело HBC34 CDRL2 long nuc

 <400> 48
 gtcacttatg aggttaaata ccgcccc 27

 <210> 49

<211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> антитело HBC34 CDRL3 nuc

 <400> 49
 cagacgtggg acagcaccac tgtggtg 27

 <210> 50
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> антитело HBC34 VH nuc

 <400> 50
 gaactgcagc tggaggagtc tgggggaggc tgggtccagc cggggggggtc ccagagactg 60
 tcctgtgcag cctctggagc catctttaga agtttttaca tgagctgggt ccgccaggcc 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtggccact ataaaccaag atggaagtga gaaattatat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactatatt 240
 ctgcaaatga acaacctgag agtcgaggac acggccgttt attactgcgc ggcttgagac 300
 ggcaatagtg ggggtatgga cgtctggggc caggggacca cggctctccgt ctctctca 357

 <210> 51
 <211> 318
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> антитело HBC34 VL nuc

 <400> 51
 tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agtcagcatc 60
 ccctgtctctg gagataaatt ggggaataaa aatgtttgct ggtttcagca taagccaggc 120
 cagtcccctg tgttggtcat ctatgaggtt aaataccgcc cctcggggat tcctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaagctg cctatttctg tcagacgtgg qacagcacca ctgtggtgtt cggcggaggg 300
 accaggctga ccgtccta 318

 <210> 52
 <211> 33
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> пептид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is substituted with Cys

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is substituted with Cys

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> Xaa is substituted with Cys

<400> 52

Xaa	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr
1				5					10					15	

Xaa	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Thr	Ala	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp
			20					25					30		

Xaa

<210> 53

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид

<400> 53

Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr	Ala	Gln	Gly
1				5					10				15	

<210> 54

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид

<400> 54

Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser
1				5					10					15	

Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

038301

20

25

<210> 55
 <211> 33
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа замен Cys

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Хаа замен Cys

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> Хаа замен Cys

<400> 55

Xaa	Ser	Met	Tyr	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn
1				5					10					15	

Xaa	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser
			20					25					30		

Xaa

<210> 56
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> фрагмент региона антигенной петли (аминокислоты 120 - 130 S домена HBsAg HBV-D J02203)

<400> 56

Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr	Ala	Gln	Gly
1				5					10	

<210> 57
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

```

<220>
<223>  эпитоп

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (3)..(3)
<223>  Хаа может быть аминокислотой, предпочтительно Хаа является Arg или
Lys

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (6)..(6)
<223>  Хаа может быть аминокислотой, предпочтительно Хаа является Met или
Thr

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (7)..(7)
<223>  Хаа может быть аминокислотой, предпочтительно Хаа является Thr или
Ile

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (8)..(8)
<223>  Хаа может быть аминокислотой, предпочтительно Хаа является Thr, Pro
или Leu

<400>  57

Pro Cys Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Gln Gly
1             5             10

<210>  58
<211>  9
<212>  БЕЛОК
<213>  Искусственная последовательность

<220>
<223>  CDRL3 v7 и CDRL3 v23 (aa)

<400>  58

Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
1             5

<210>  59
<211>  106
<212>  БЕЛОК
<213>  Искусственная последовательность

<220>
<223>  VL v7

<400>  59

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1             5             10             15

```

038301

Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30

Cys Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 60
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL1 v7 и CDRL1 v23 (nuc)

<400> 60
aagctgggga acaaaaaat

18

<210> 61

<400> 61
000

<210> 62
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL2 long v7 и CDRL2 long v23 nuc

<400> 62
gtcatctacg aggtgaaata tcggcct

27

<210> 63
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL3 v7 и CDRL3 v23 nuc

<400> 63
cagacattcg attccaccac agtggtc 27

<210> 64
<211> 318
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL v7 nuc

<400> 64
tcttacgagc tgacacagcc acctagcgtg tccgtctctc caggacagac cgtgtccatc 60
ccttgctctg ggcacaagct ggggaacaaa aatgtctgtt ggttcagca caagccaggg 120
cagagtcccg tgctggatcat ctacgaggtg aaatatcggc cttcaggaat tccagaacgg 180
ttcagcggat caaacagcgg caatactgca accctgacaa ttagcgggac ccaggccatg 240
gacgaagccg cttatttctg ccagacattc gattccacca cagtggctct tggcggggga 300
actaggctga cgtgctg 318

<210> 65
<211> 106
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL v23 aa

<400> 65
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Ala
20 25 30
Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95

038301

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 66
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HBC34wt CDRH2 aa

<400> 66

Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 67
<211> 119
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HBC34 v31, HBC34 v32 and HBC34 v33 VH

<400> 67

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68

038301

<211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HBC34 v31, HBC34 v32 и HBC34 v33 VH (nuc)

 <400> 68
 gaggtgcagc tgggtggaatc cggcggggga ctggtgcagc ctggcggctc actgagactg 60
 agctgtgcag cttctggaag aatcttcaga tctttttaca tgagttgggt gagacaggct 120
 cctgggaagg gactggagtg ggtcgcaaac atcaatcagg acggatcaga aaagctgtat 180
 gtggatagcg tcaaaggcag gttcactatt tcccgcgaca acgcaaaaaa ttctctgttt 240
 ctgcagatga acaatctgcg ggtggaggat accgctgtct actattgtgc agcctggctt 300
 ggcaacagtg gaggcattga cgtgtgggga cagggaacca cagtgcagct cagctcc 357

 <210> 69
 <211> 318
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> VL v23 nuc

 <400> 69
 tcttacgagc tgacacagcc cctagcgtg tccgtctctc caggccagac agcatccatc 60
 acttgctctg gcgacaagct ggggaacaaa aatgcctgtt ggtatcagca gaagccaggg 120
 cagagtcacc tgctgggtcat ctacgagtg aaatatcggc cttcaggaat tccagaaaga 180
 ttcagtggat caaacagcgg caatactgct accctgacaa ttagcgggac ccaggccatg 240
 gacgaagctg attactattg ccagacattc gattccacca cagtgggtctt tggcggggga 300
 actaagctga ccgtgctg 318

 <210> 70
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HBC34 wt VH кодоны оптимизированы

 <400> 70
 gaactgcagc tggtcgaatc aggaggaggg tgggtccagc ccggaggag ccagagactg 60
 tcttgtgccg catcaggag gatcttcagg agcttctaca tgtcctgggt gcgccaggca 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtcgccacc atcaaccagg acggatctga aaagctgtat 180
 gtggatagtg tcaaaggcgg gttcacaatt agcagagaca acgctaaaaa ttctctgttt 240
 ctgcagatga acaatctgcg agtggaggat accgccgtct actattgcgc cgcttgggtct 300

ggcaacagcg gcgggatgga tgtctggggg cagggcaca cagtgagcgt ctcttcc 357

<210> 71
 <211> 318
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HBC34 wt VL кодоны оптимизированы

<400> 71
 tcatacgaac tgactcagcc tccctccgtc tccgtctcac ctggacagac cgtctcaatc 60
 ccctgctccg gcgataaaact gggcaacaag aacgtgtgct ggttccagca caaaccggga 120
 cagagtctctg tgctgggtcat ctacgaggtc aagtatcggc caagcggcat tcccgaaga 180
 ttcagcggct ccaactctgg gaataccgca aactgacta tctctggaac ccaggcaatg 240
 gacgaggcag cttacttttg ccagacttgg gattcaacta ctgtcgtgtt cggcggcgga 300
 actagactga ctgtcctg 318

<210> 72
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HBC34 wt CDRH1 кодоны оптимизированы

<400> 72
 gggaggatct tcaggagctt ctac 24

<210> 73
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HBC34 wt CDRH2 кодоны оптимизированы

<400> 73
 atcaaccagg acggatctga aaag 24

<210> 74
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HBC34 wt CDRH3 кодоны оптимизированы

<400> 74
 gccgcttggt ctggcaacag cggcgggatg gatgtc 36

<210> 75
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HBC34 wt CDRL1 кодоны оптимизированы

 <400> 75
 aaactgggca асаагаас 18

 <210> 76

 <400> 76
 000

 <210> 77
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HBC34 wt CDRL2 long кодоны оптимизированы

 <400> 77
 gtcacatctacg aggtcaagta tcggcca 27

 <210> 78
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> HBC34 wt CDRL3 кодоны оптимизированы

 <400> 78
 cagacttggg attcaactac tgcgtg 27

 <210> 79
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> линкер

 <400> 79

 Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

 <210> 80
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> эпитоп

<400> 80

Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
 1 5

<210> 81
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> эпитоп

<400> 81

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro
 1 5

<210> 82
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> непрерывный эпитоп mimic

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<400> 82

Cys Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Cys Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Cys
 20 25

<210> 83
 <211> 28
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

```

<220>
<223> непрерывный эпитоп mimic

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<400> 83

Cys Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Cys
1          5          10          15

Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Cys
          20          25

<210> 84
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> эпитоп mimic в виде петли

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> цистеин, связанный с ацетамидометилом

<400> 84

Cys Gly Gly Gly Cys Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
1          5          10          15

Cys

```

<210> 85
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> эпитоп

<400> 85

Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
 1 5 10

<210> 86
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> эпитоп

<400> 86

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Cys
 1 5 10 15

<210> 87
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> эпитоп

<400> 87

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe
 1 5 10

<210> 88
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> эпитоп

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа может быть любой встречающейся в природе аминокислотой

<400> 88
 Pro Cys Arg Xaa Cys
 1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализуют инфекцию вируса гепатита В и вируса гепатита дельта (D), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDRH1, CDRH2 и CDRH3; CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- (i) последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38 и 40 соответственно;
- (ii) последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 39 и 40 соответственно;
- (iii) последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38 и 58 соответственно;
- (iv) последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 39 и 58 соответственно;
- (v) последовательностей SEQ ID NO: 34, 66, 36, 37, 38 и 40 соответственно;
- (vi) последовательностей SEQ ID NO: 34, 66, 36, 37, 39 и 40 соответственно;
- (vii) последовательностей SEQ ID NO: 34, 66, 36, 37, 38 и 58 соответственно и
- (viii) последовательностей SEQ ID NO: 34, 66, 36, 37, 39 и 58 соответственно.

2. Антитело по п.1, которое относится к типу IgG.

3. Антитело по п.2, которое относится к IgG1.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его ан-

тигенсвязывающий фрагмент представляют собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или человеческое моноклональное антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 41 или 67; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 42, 59 или 65.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают вариабельную область тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41 или 67 и вариабельную область легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42, 59 или 65.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой очищенное антитело или его фрагмент

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

9. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8 в качестве лекарственного средства для профилактики, лечения или снижения интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, включающая полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10, где полинуклеотидная последовательность включает или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51, 60-64 и 68-78.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10, где полинуклеотидная последовательность включает или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51, 60-64 и 68-78.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10, где полинуклеотидная последовательность включает или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51, 60-64 и 68-78.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10, где полинуклеотидная последовательность включает или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51, 60-64 и 68-78.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10, где полинуклеотидная последовательность включает или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 98% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 43-51, 60-64 и 68-78.

16. Вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-15.

17. Клетка для продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, включающая вектор по п.16.

18. Клетка, экспрессирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-15.

19. Фармацевтическая композиция для профилактики, лечения или снижения интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D, включающая эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-15, вектора по п.16 или клетки по п.17 или 18, и фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

20. Применение нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-15 для профилактики, лечения или ослабления интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D.

21. Применение вектора по п.16 для профилактики, лечения или ослабления интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D.

22. Применение клетки по п.17 или 18 для профилактики, лечения или ослабления интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D.

23. Применение фармацевтической композиции по п.19 для профилактики, лечения или ослабления интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D.

24. Применение по любому из пп.9 и 20-23 для лечения или ослабления интенсивности симптомов хронического гепатита В.

25. Применение по любому из пп.9 и 20-23 для предотвращения (повторного) инфицирования гепатитом В после трансплантации печени, особенно в случае печеночной недостаточности, вызванной гепатитом В.

26. Применение по любому из пп.9 и 20-23 для профилактики гепатита В у неиммунизированных субъектов или у новорожденных.

27. Применение по любому из пп.9 и 20-23 для профилактики гепатита В у неиммунизированных субъектов или у пациентов, проходящих курс гемодиализа.

28. Применение по любому из пп.9 и 20-23, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или фармацевтическая композиция применяются в комбинации с ингибитором полимеразы, интерфероном и/или ингибитором контрольной точки, предпочтительно с ингибитором полимеразы, таким как ламивудин.

29. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8 для *in vitro* диагностики гепатита В и/или гепатита D.

30. Применение нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-15 для *in vitro* диагностики гепатита В и/или гепатита D.

31. Применение по п.29 или 30 для определения инфицированности выделенного образца крови вирусом гепатита В и/или вирусом гепатита D.

32. Комбинация для профилактики, лечения или ослабления интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D, включающая:

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, нуклеиновую кислоту по любому из пп.10-15, вектор по п.16, клетку по п.17 или 18 или фармацевтическую композицию по п.19;

(ii) ингибитор полимеразы, интерферон и/или ингибитор контрольной точки.

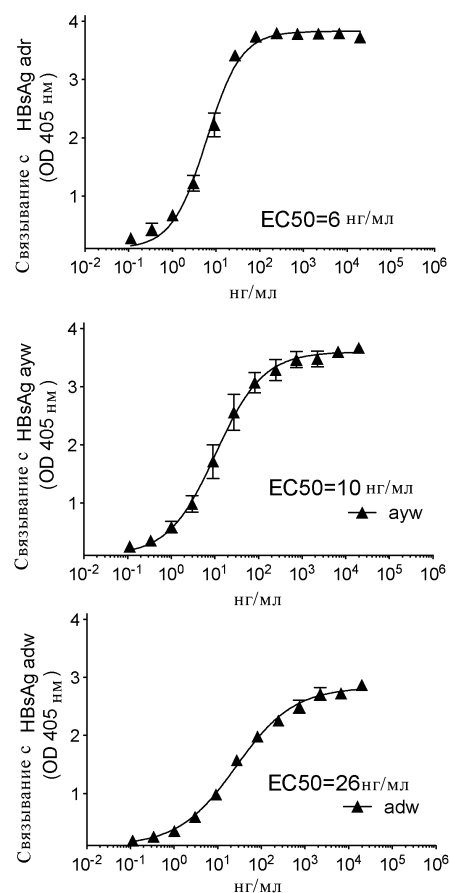
33. Комбинация по п.32 для лечения или ослабления интенсивности симптомов хронического гепатита В и/или хронического гепатита D.

34. Набор для профилактики, лечения или ослабления интенсивности симптомов гепатита В и/или гепатита D, включающий:

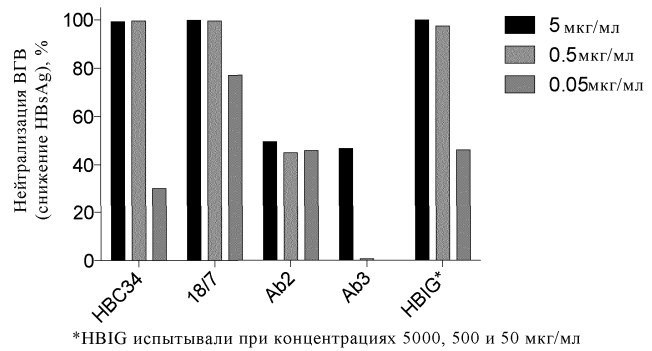
(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, нуклеиновую кислоту по любому из пп.10-15, вектор по п.16, клетку по п.17 или 18 или фармацевтическую композицию по п.19;

(ii) ингибитор полимеразы, интерферон и/или ингибитор контрольной точки; и содержит листок-вкладыш.

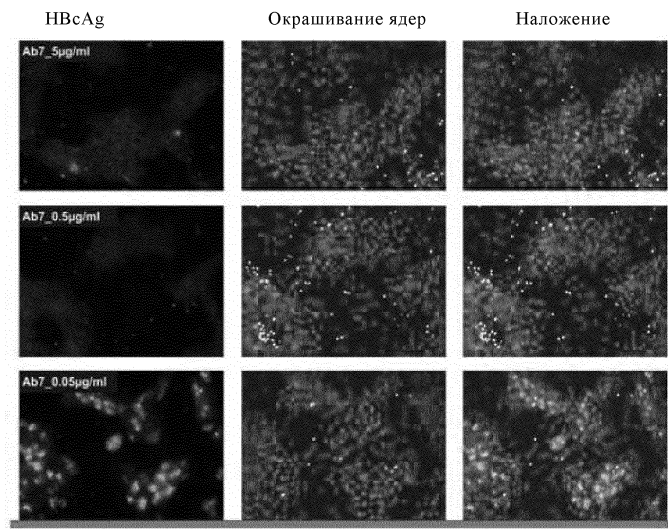
35. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8 для мониторинга качества вакцин против гепатита В или против гепатита D с помощью проверки *in vitro* наличия в антигене указанной вакцины специфического эпитопа в правильной конформации.



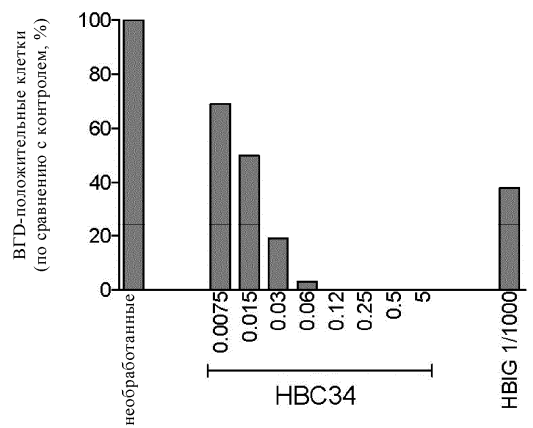
Фиг. 1



Фиг. 2



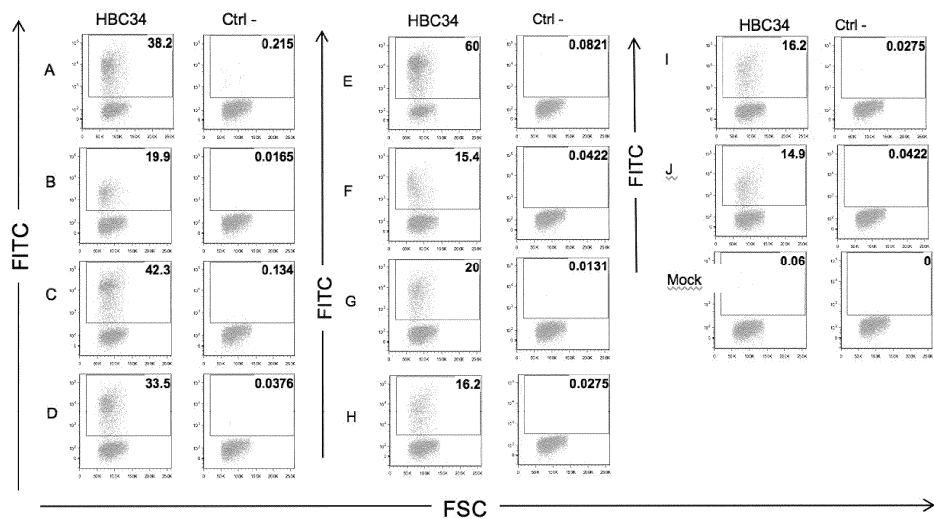
Фиг. 3



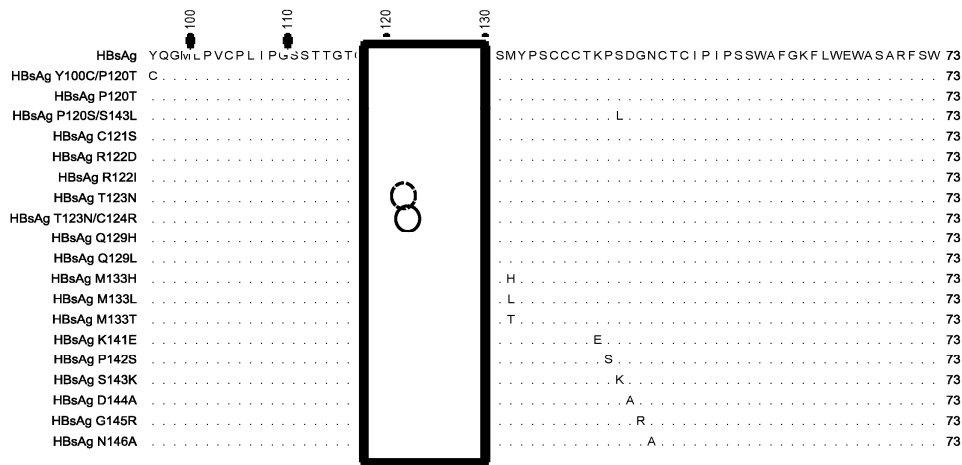
Фиг. 4

	20	40	60
HBV-D J02203 (D, ayw3)	QGM L P V C P L I P G S S T T S T G P C R T C M T T A Q G T S M Y P S C C C T K P S D G N C T C I P I P S S W A F G K F L W E W A S A R F S W	72	
FJ899792.1 (D, adw2)	G T . P	72	
HBV-A AM282986 sAg	 T T K . T . P N F A . Y V	72	
HBV-B1 Japan D23678 sAg	 K . T . P F T A . Y V	72	
HBV-C1 Cambodia AB117758 sAg	 L . T K . T . P F A R V	72	
HBV-E Ghana AB205192 sAg	 T . L F S	72	
HBV-F4 Brazil X69798 sAg	 L T K . T . L F S L . Y	72	
HBV-G USA AF160501 sAg	 K . T . P N S A . Y V	72	
HBV-H Nicaragua AY090454 sAg	 L T K . T . L F	72	
HBV-I Vietnam AF241409 sAg	 K . T . P N A . Y	72	
HBV-J Borneo AB486012 sAg	 L T T F A V	72	

Фиг. 5

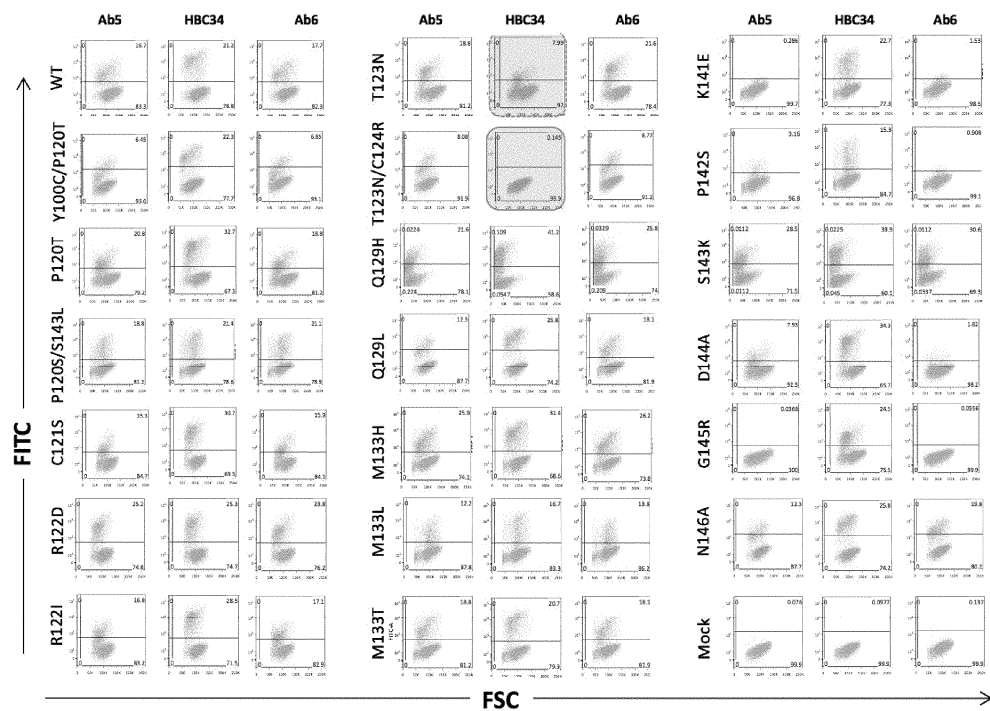


Фиг. 6

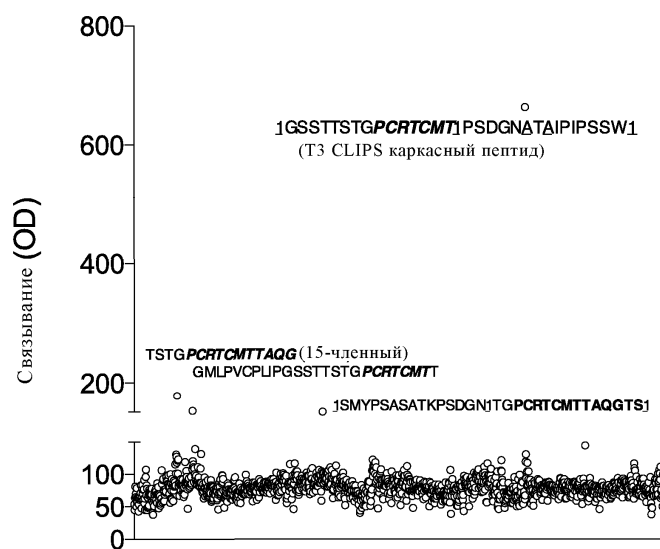


Фиг. 7

038301

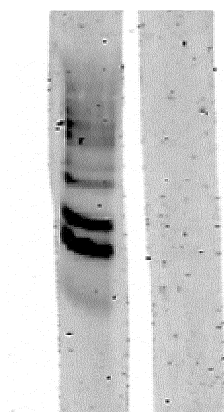


Фиг. 8



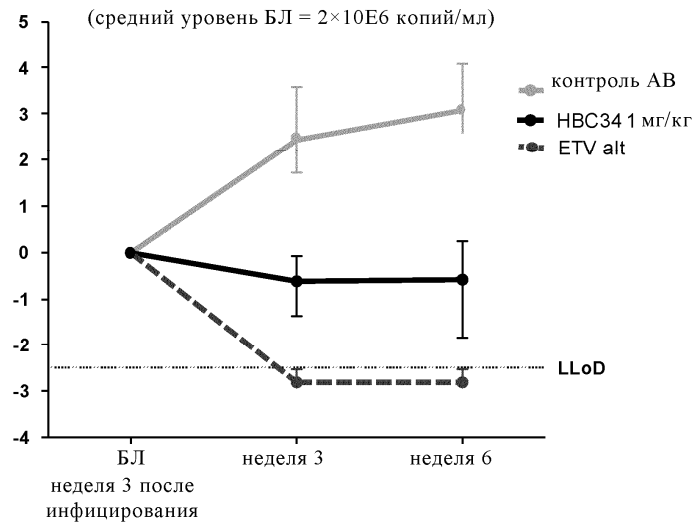
Фиг. 9

mab 8 7

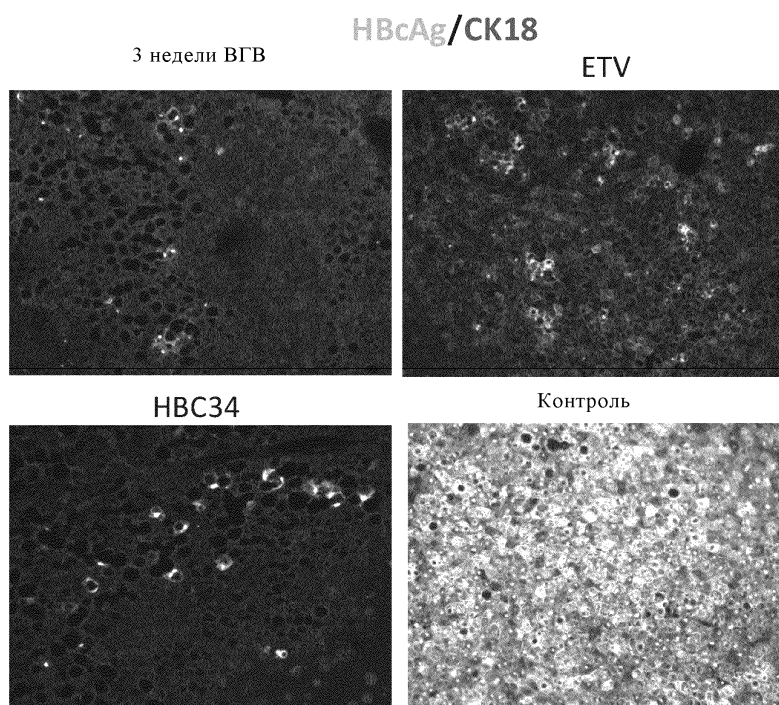


Фиг. 10

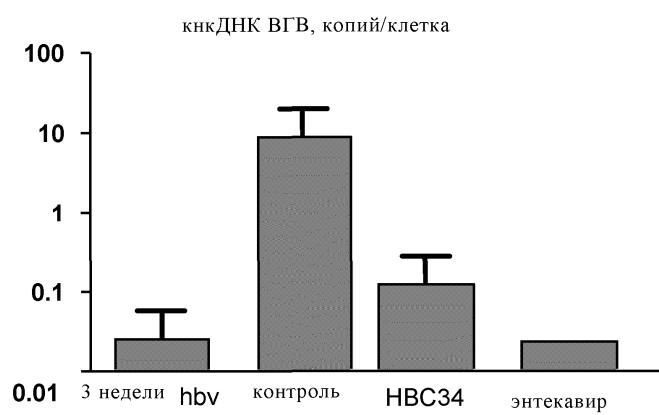
Изменение (кратное log) при вирусемии ВГВ относительно БЛ
(средний уровень БЛ = 2×10^6 копий/мл)



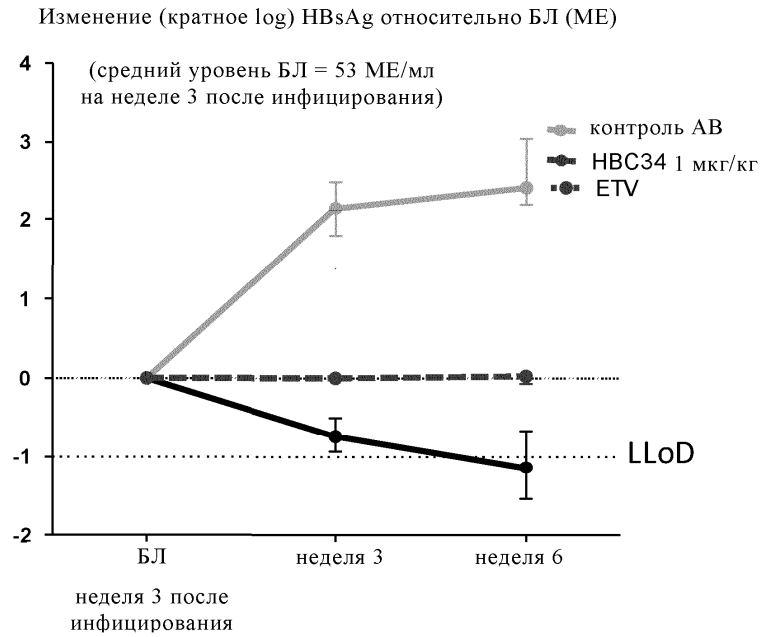
Фиг. 11



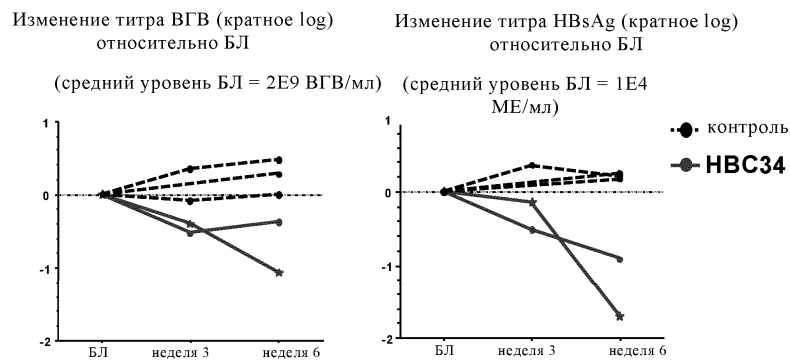
Фиг. 12



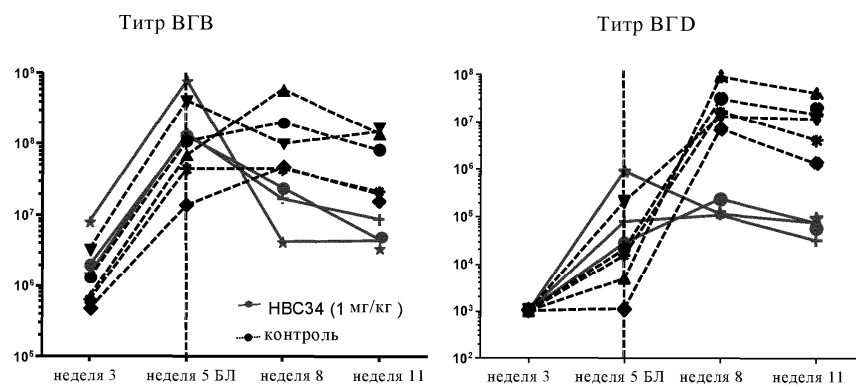
Фиг. 13



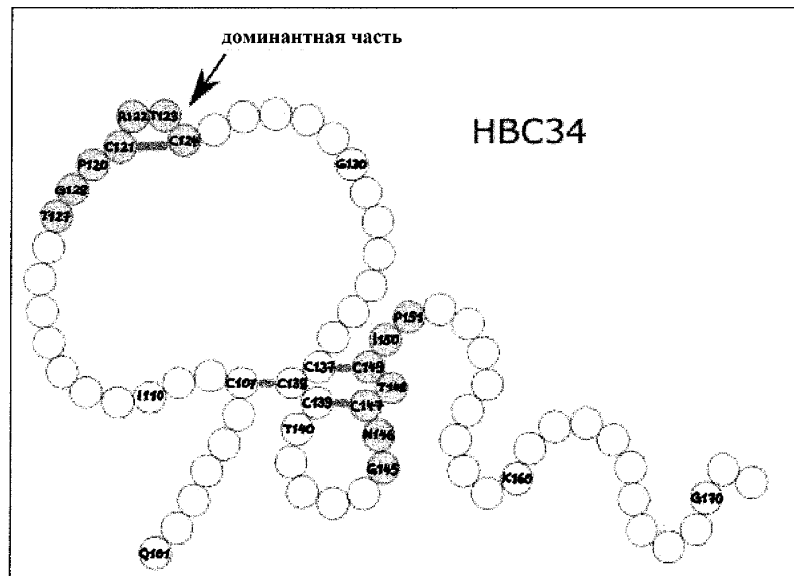
Фиг. 14



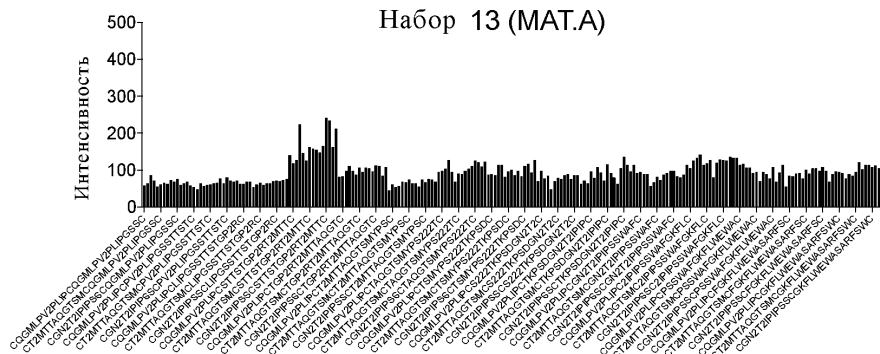
Фиг. 15



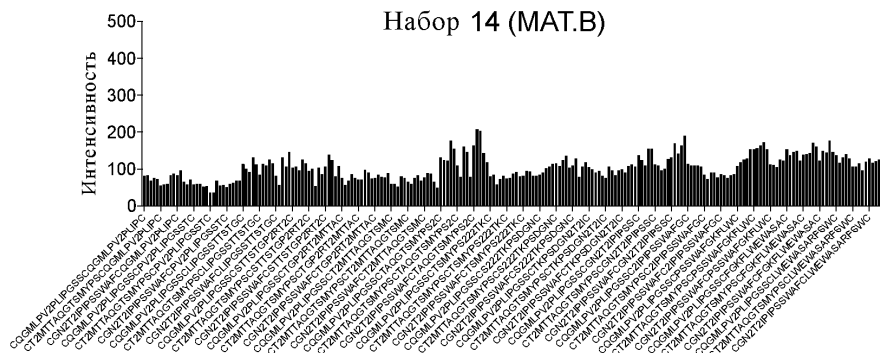
Фиг. 16



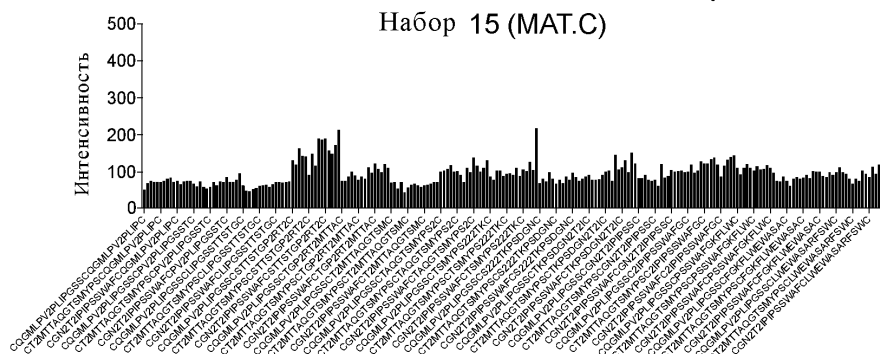
Набор 13 (MAT.A)



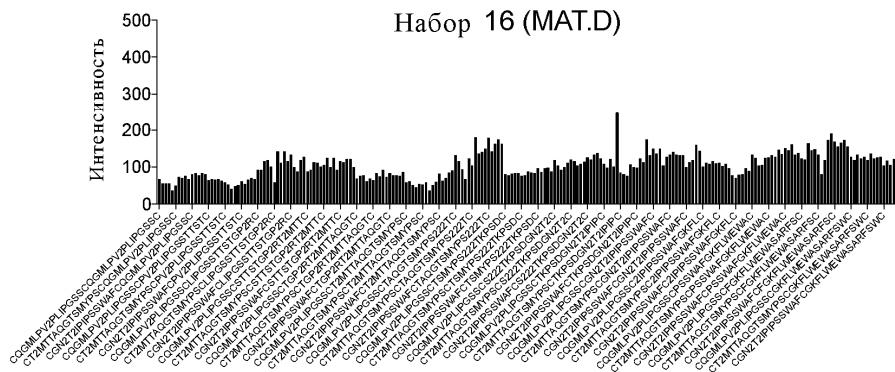
Набор 14 (MAT.B)

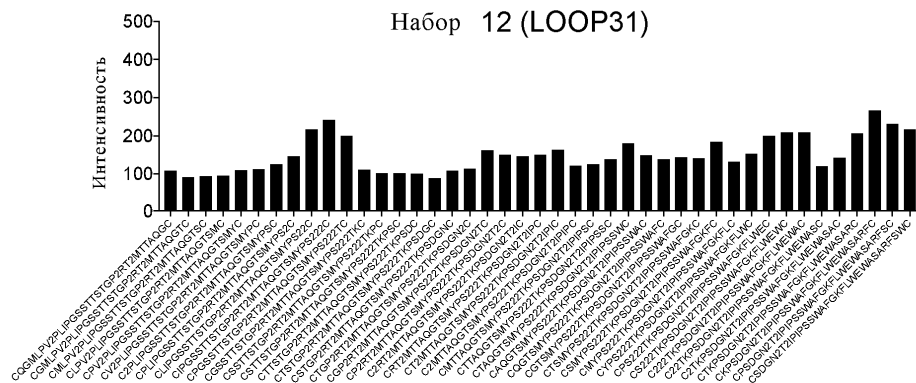
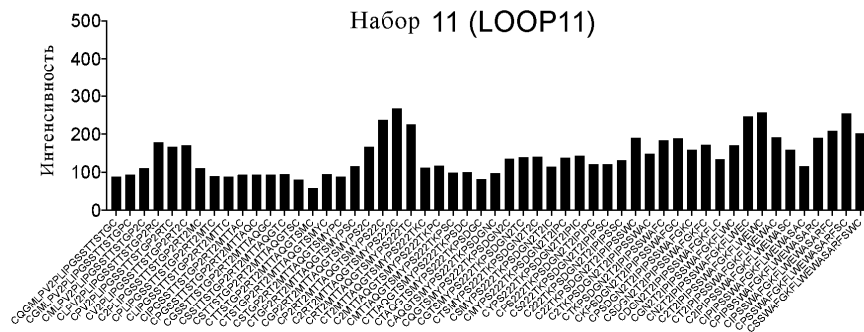
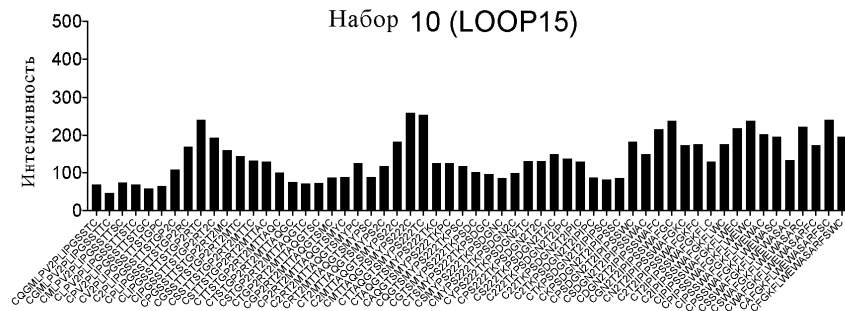
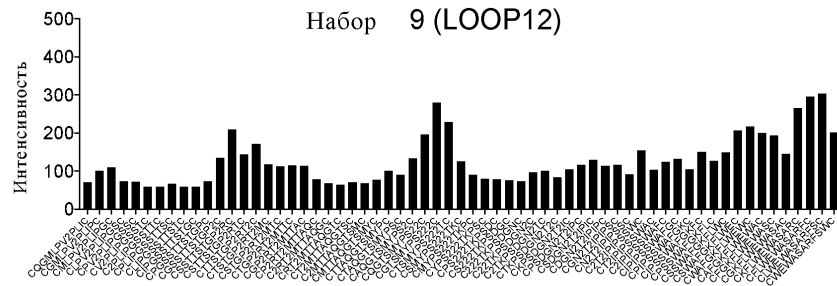


Набор 15 (MAT.C)

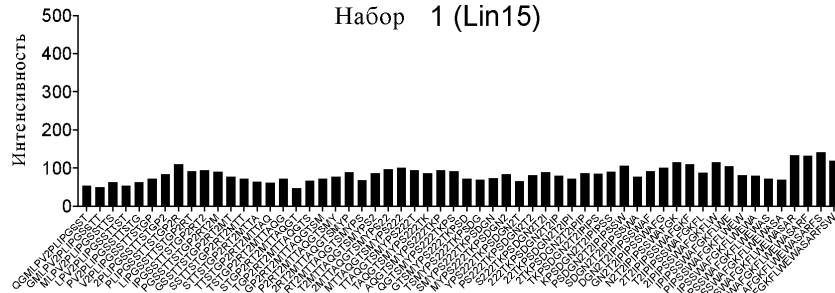


Набор 16 (MAT.D)

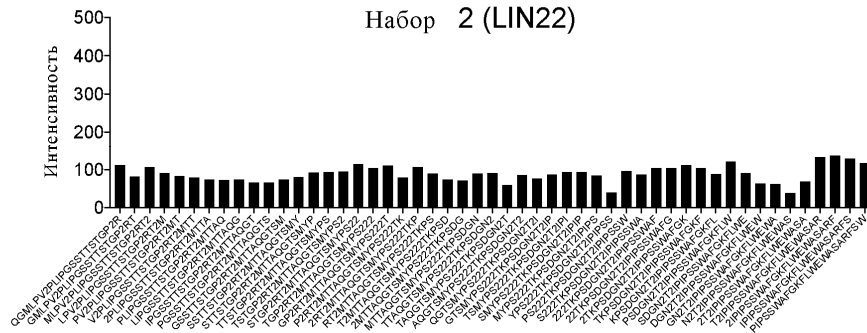




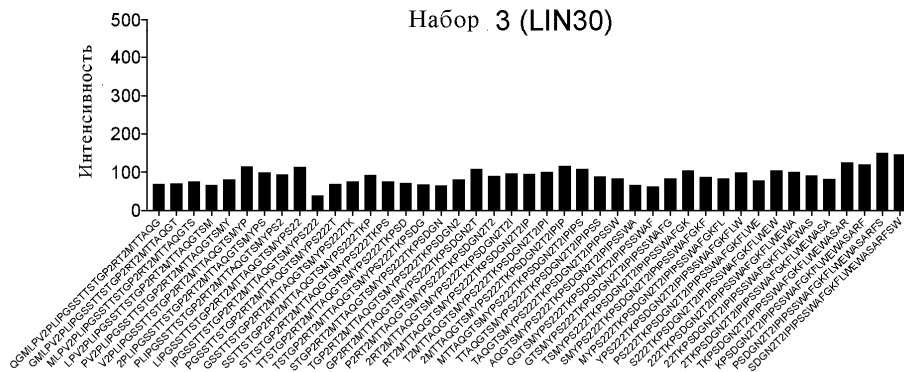
Набор 1 (Lin15)



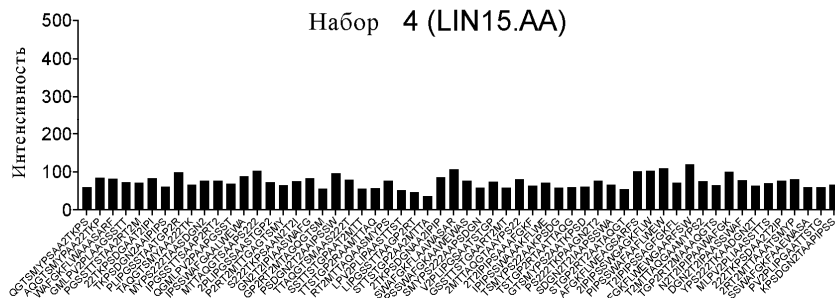
Набор 2 (LIN22)

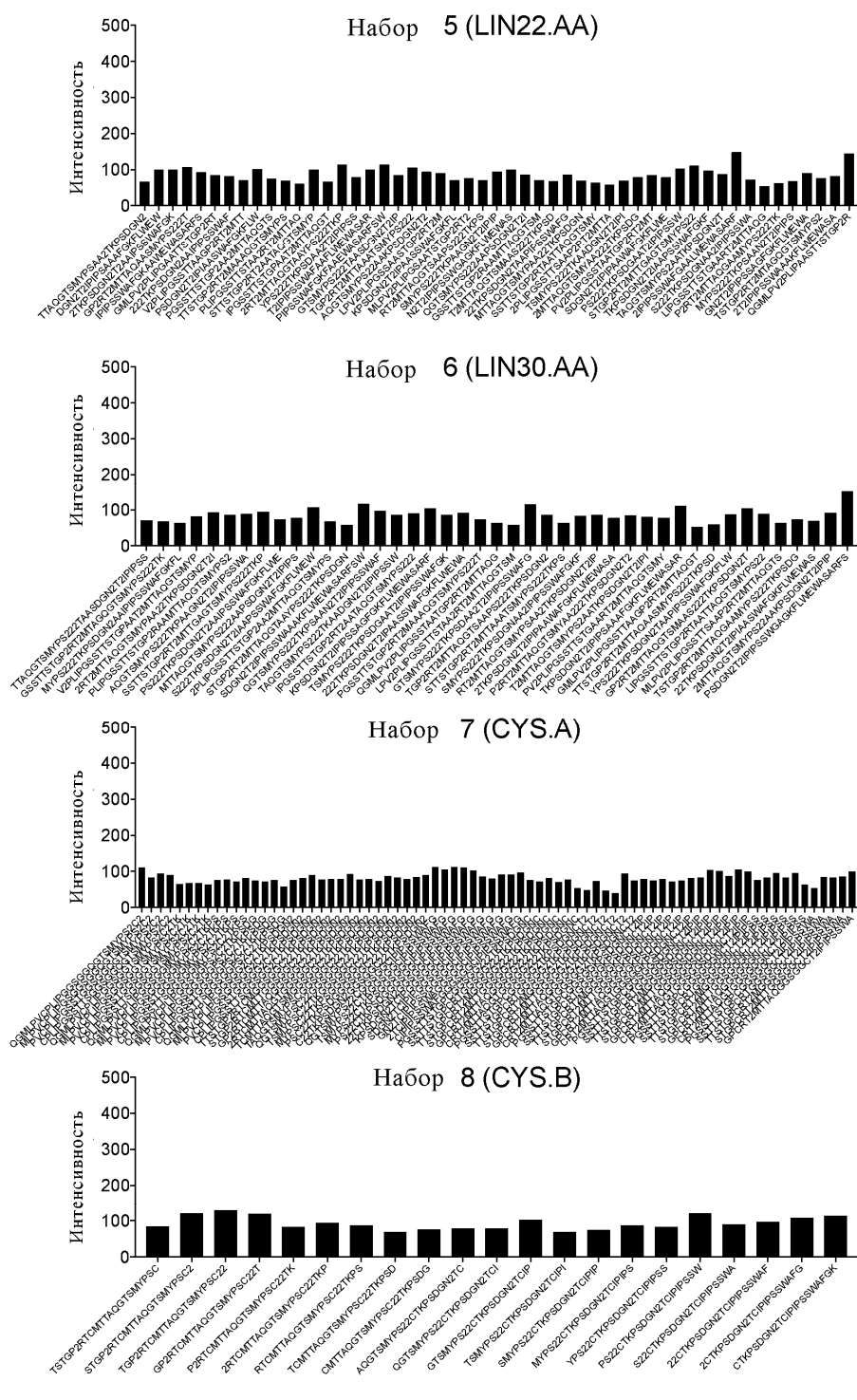


Набор 3 (LIN30)

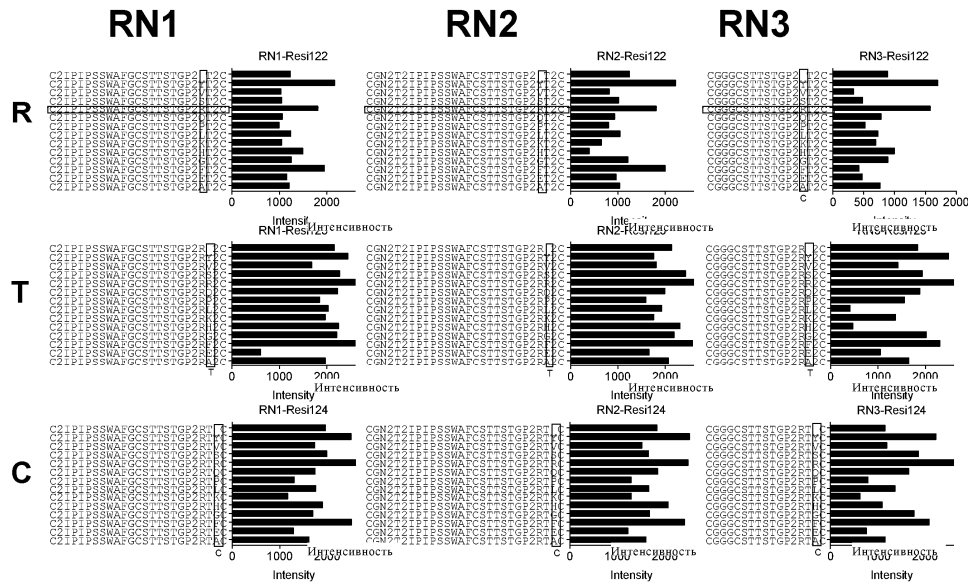
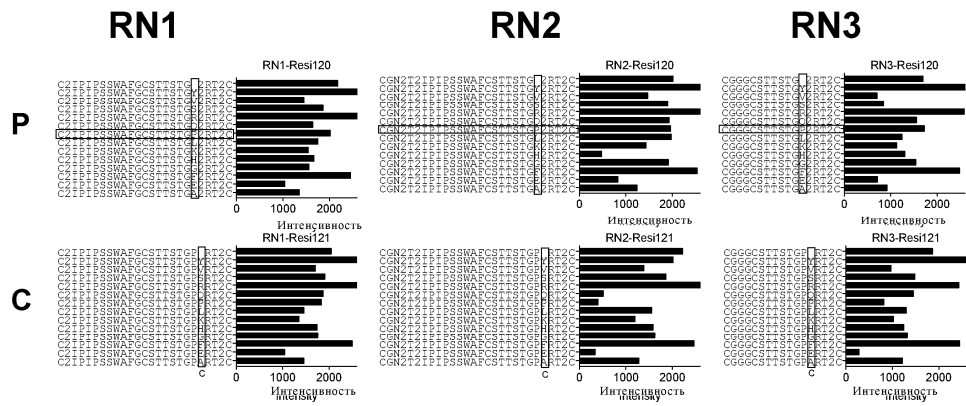
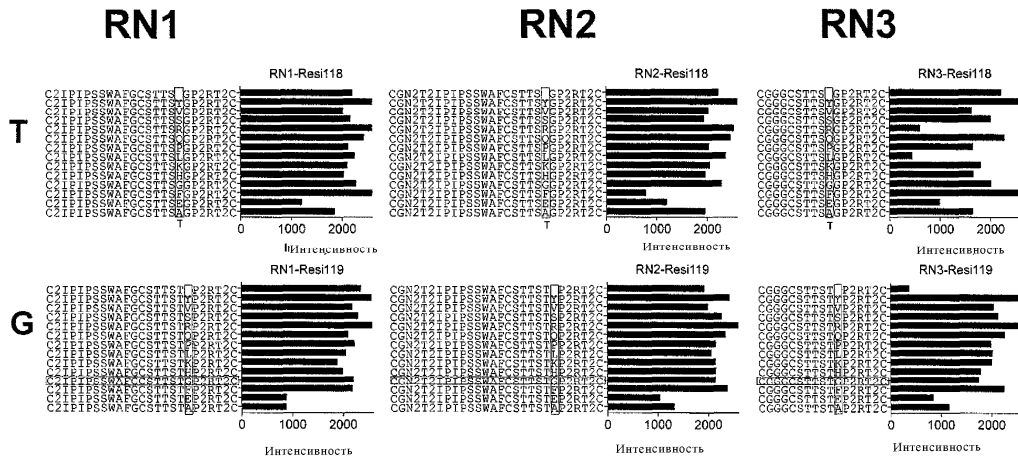


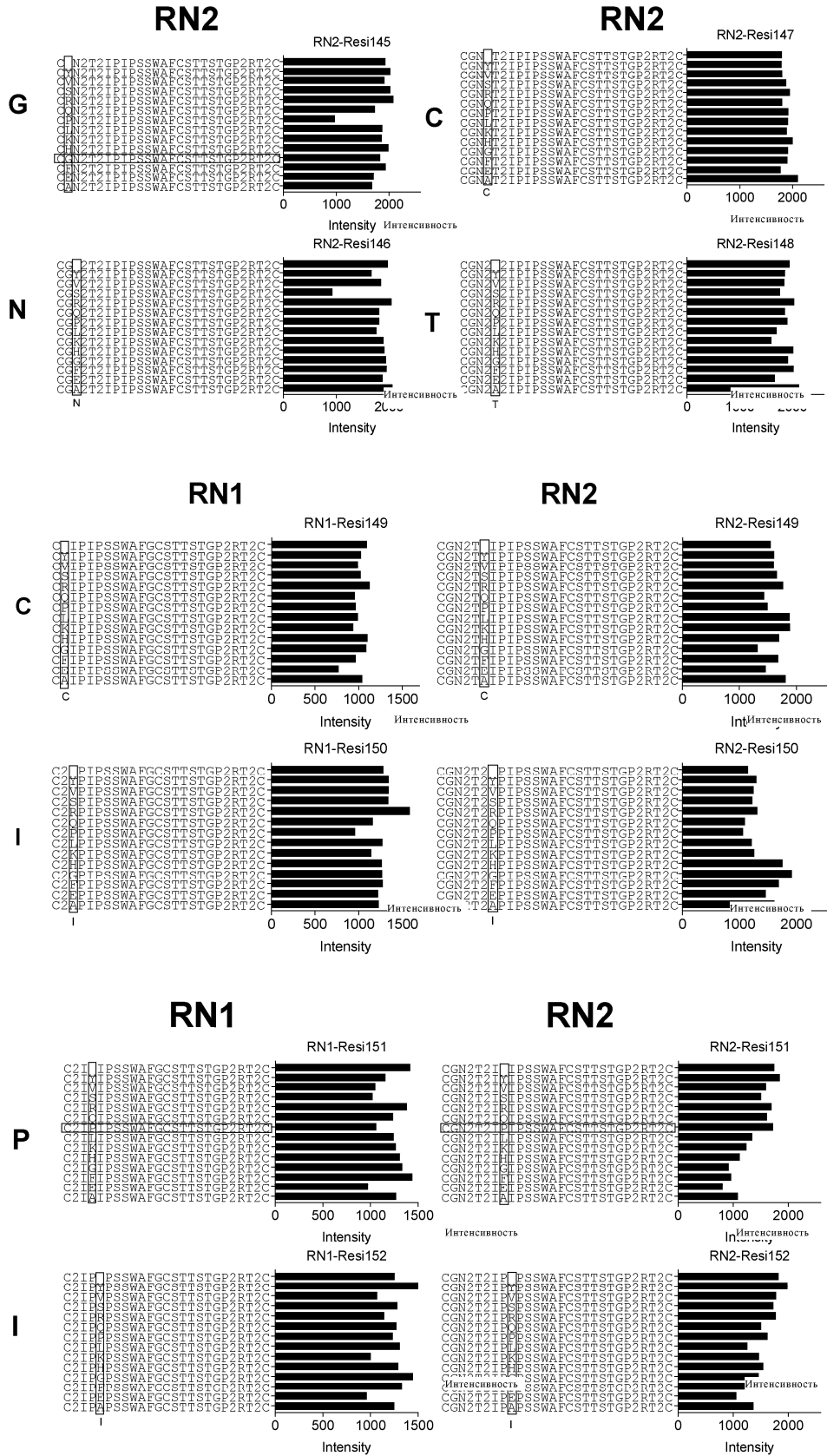
Набор 4 (LIN15.AA)

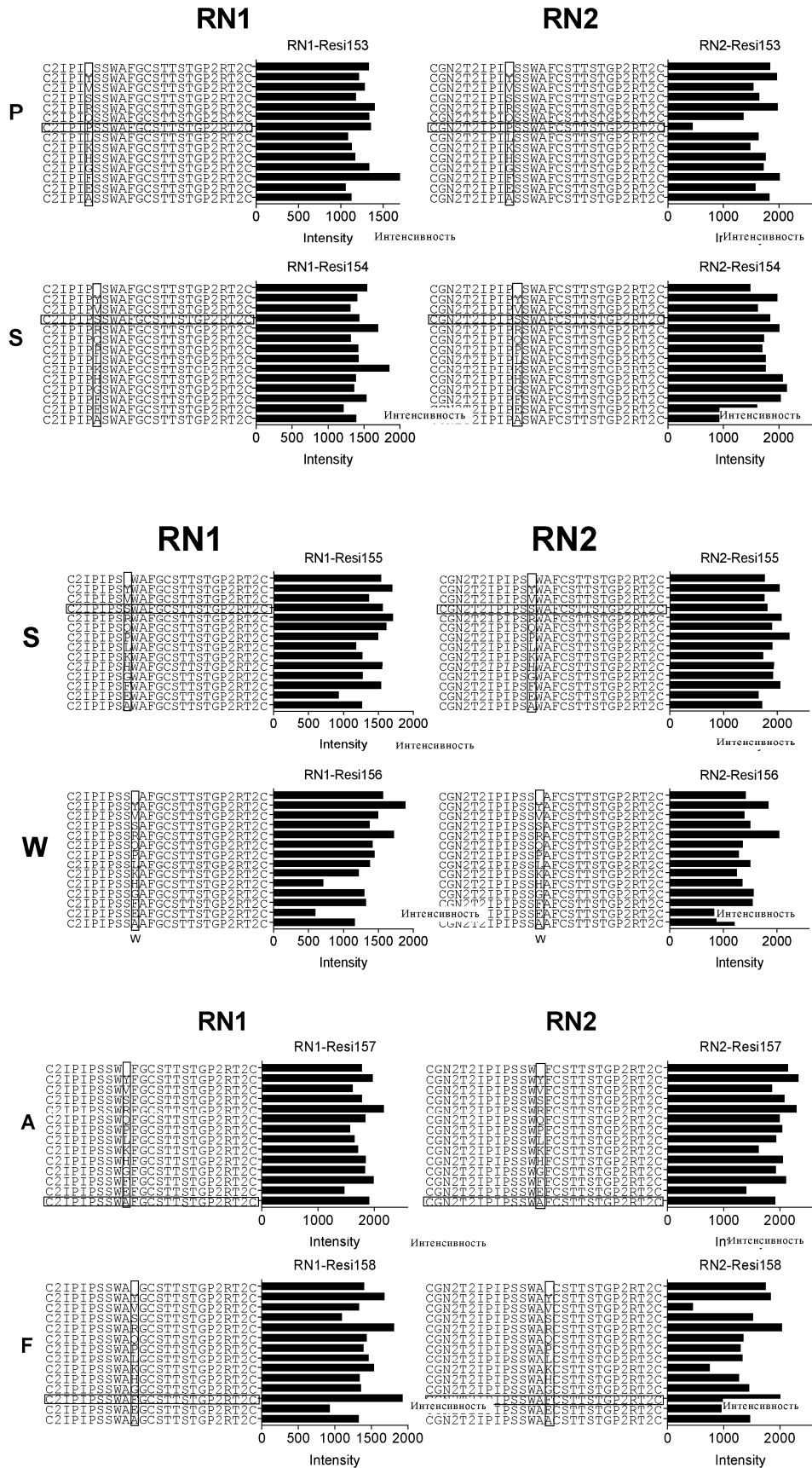




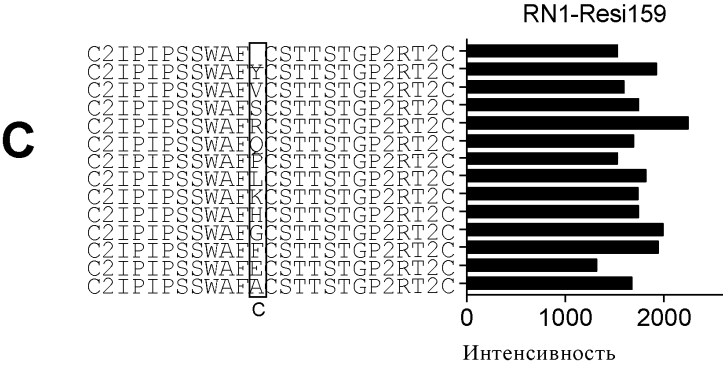
Фиг. 17







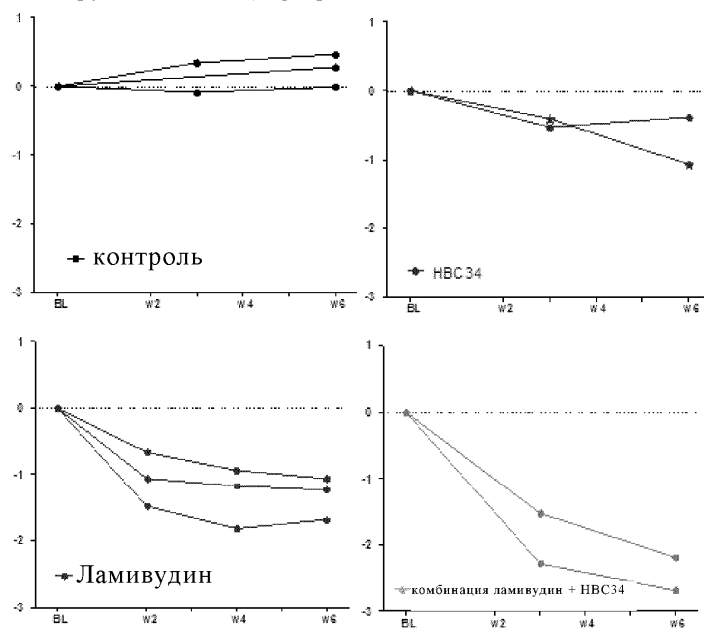
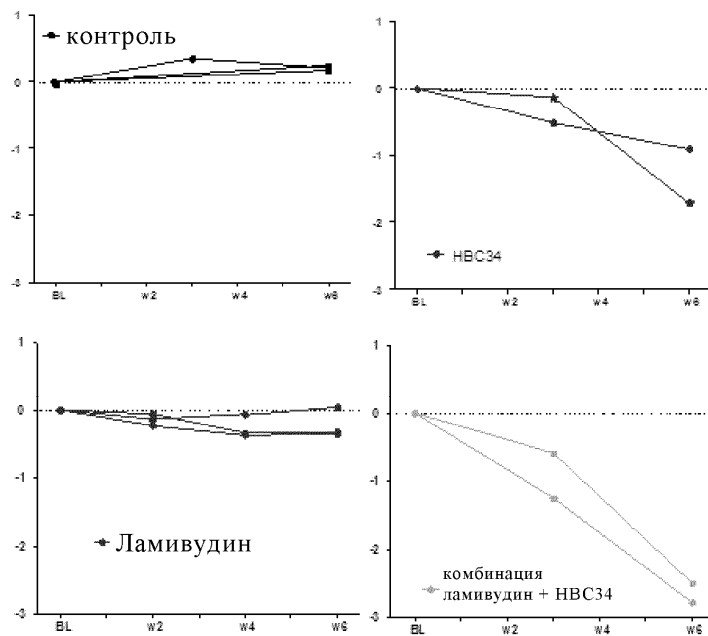
RN1



Фиг. 18

А

Вирусемия ВГВ (log-кратное изменение относительно БЛ)

**Б**

Фиг. 19

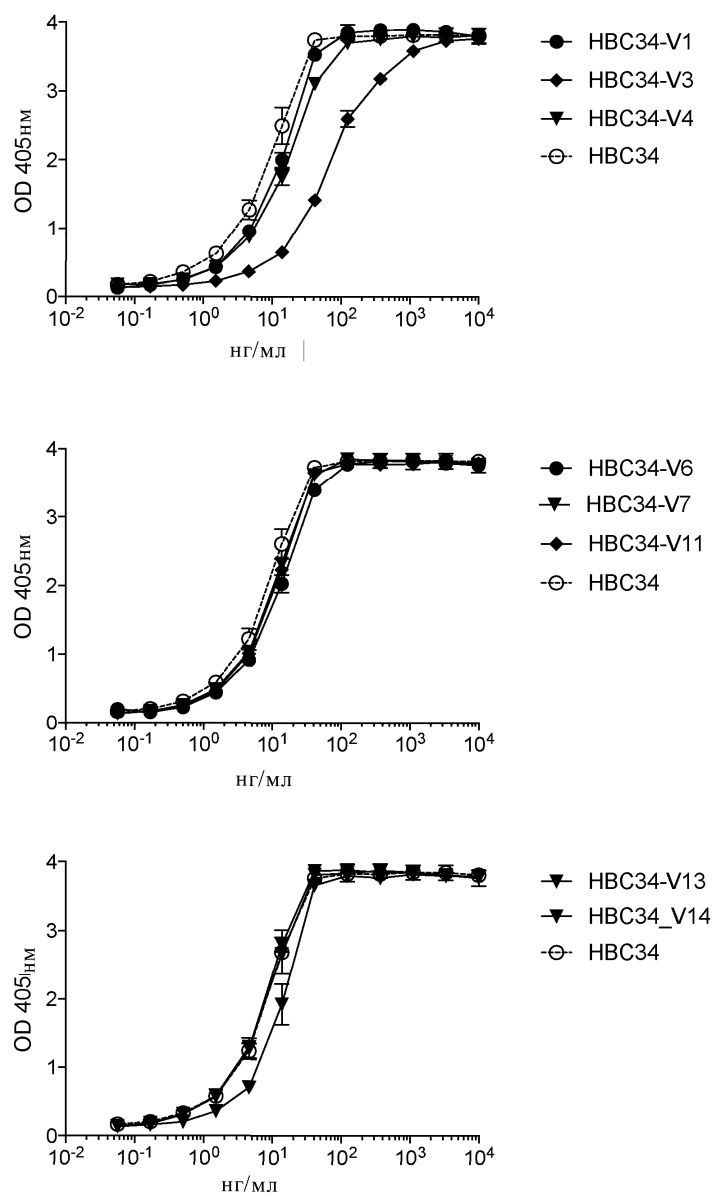
A
 VH-WT ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSS 119
 VH-M115I I 119
 VH-M115L L 119
 VH-W107A A 119
 VH-W107A/M115A A 119
 VH-W107F F 119
 VH-M115L/FR124GL V L L N Y L T 119
 VH-M115L/FR124GL V L L N Y S A L T 119
 VH-FR124GL V L L N Y S A R T 119
 VH-UCA V L L FT.S.YW N.K Y S A R T 119

B
 VH-WT ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSS 119
 VH-M115I I 119
 VH-M115L L 119
 VH-W107A A 119
 VH-W107A/M115A A 119
 VH-W107F F 119
 VH-M115L/FR124GL V L L N Y L T 119
 VH-M115L/FR124GL V L L N Y S A L T 119
 VH-FR124GL V L L N Y S A R T 119
 VH-UCA V L L FT.S.YW N.K Y S A R T 119

Фиг. 20

Название варианта	VH	VL	Связывание с HBsAg (adw)
HBC34	WT	WT	+
HBC34-V1	W107F	WT	+/-
HBC34-V2	W107F	W107A	-
HBC34-V3	W107F	W107F	+/-
HBC34-V4	M115I	W107F	+/-
HBC34-V5	W107A	W107F	-
HBC34-V6	M115L	W107F	+/~
HBC34-V7	WT	W107F	+
HBC34-V8	W107A/M115A	W107F	-
HBC34-V9	W107A/M115A	W107A	-
HBC34-V10	W107A/M115A	WT	-
HBC34-V11	M115I	WT	+/~
HBC34-V12	W107A	WT	-
HBC34-V13	M115L	WT	+
HBC34-V15	WT	W107A	+/~
HBC34-V16	M115L	W107A	+/-
HBC34-V17	W107A	W107A	-
HBC34-V18	M115I	W107A	+/-

Фиг. 21



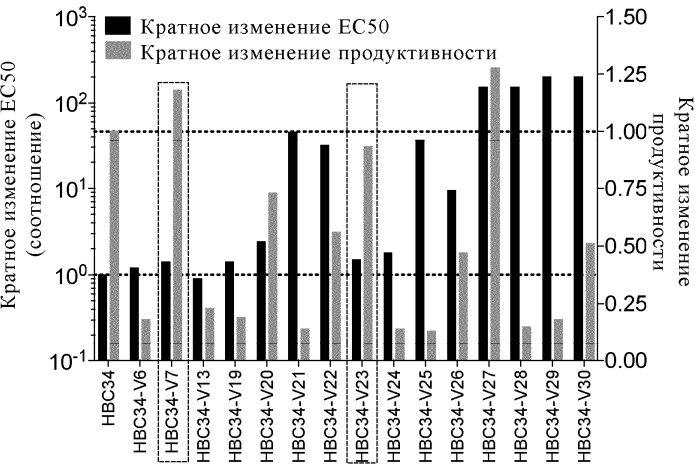
Фиг. 22

Название варианта	VH	VL	Связывание, EC50	Кратное изменение (мутант/wt)	Продуктивность, мкг/мл	Кратное изменение (мутант/wt)
HBC34	WT	WT	7,7	1,0	318	1,00
HBC34-V1	W107F	WT	12,8	1,6	79	0,25
HBC34-V3	W107F	W107F	69,4	9,0	64	0,20
HBC34-V4	M115I	W107F	15,7	2,0	112	0,35
HBC34-V6	M115L	W107F	12,7	1,6	103	0,32
HBC34-V7	WT	W107F	10,4	1,3	533	1,68
HBC34-V11	M115I	WT	10,8	1,4	195	0,61
HBC34-V13	M115L	WT	8,0	1,0	106	0,33

Фиг. 23

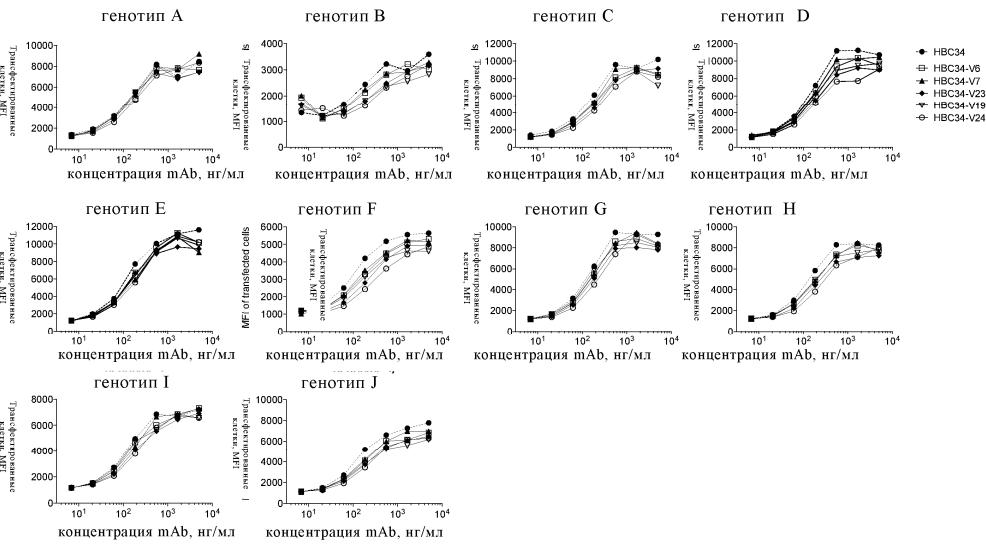
Название варианта	Модификация VH	Модификация VL	EC50	Кратное изменение (мутант/wt)	Продуктивность, мкг/мл	Кратное изменение (мутант/wt)
HBC34	WT	WT	13,3	1,0	197	1,00
HBC34-V6	M115L	W107F	16,5	1,2	35	0,18
HBC34-V7	WT	W107F	18,6	1,4	232	1,18
HBC34-V13	M115L	WT	12,0	0,9	46	0,23
HBC34-V19	M115L/FR124GL	WT	18,9	1,4	37	0,19
HBC34-V20	M115L/FR124GL	WT	31,8	2,4	145	0,73
HBC34-V21	M115L/FR124GL	W107F	607	45,6	28	0,14
HBC34-V22	M115L/FR1234GL	W107F	419	31,4	110	0,56
HBC34-V23	WT	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	20,1	1,5	184	0,93
HBC34-V24	M115L	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	24,0	1,8	27	0,14
HBC34-V25	M115L/FR124GL	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	492	36,9	26	0,13
HBC34-V26	M115L/FR1234GL	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	125	9,4	93	0,47
HBC34-V27	WT	W107F/FR1234GL	2022	151,8	270	1,37
HBC34-V28	M115L	W107F/FR1234GL	2037	152,9	29	0,15
HBC34-V29	M115L/FR124GL	W107F/FR1234GL	>10000	ND	36	0,18
HBC34-V30	M115L/FR1234GL	W107F/FR1234GL	>10000	ND	101	0,51

А



Б

Фиг. 24



Фиг. 25