

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290683 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.09

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

(22) Дата подачи заявки
2020.08.28

(54) КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В

(31) 62/893,742

(32) 2019.08.29

(33) US

(86) PCT/US2020/048649

(87) WO 2021/042000 2021.03.04

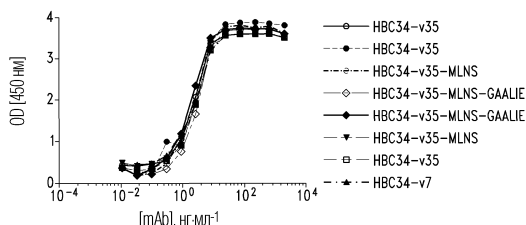
(71) Заявитель:
ВИР БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Пан Филлип С., Могалиан Эрик,
Коннолли Линн Е., Голл Джонатан
(US)

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

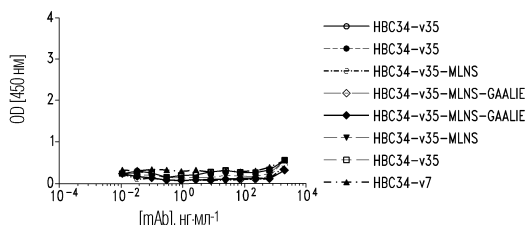
(57) Изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат антитело, которое нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В (HBV). Кроме того, настоящее изобретение относится к применению фармацевтических композиций для лечения инфекции HBV.

Связывание с HBsAg (adw), эксперимент 1



	EC50
HBC34-v35	2.43
HBC34-v35	2.799
HBC34-v35-MLNS	2.565
HBC34-v35-MLNS-GAALIE	3.186
HBC34-v35-MLNS-GAALIE	1.982
HBC34-v35-MLNS	2.309
HBC34-v35	2.662

Связывание с непокрытыми планшетами, эксперимент 1



202290683

A1

A1

202290683

**КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ
ГЕПАТИТА В****ЗАЯВЛЕНИЕ, КАСАЮЩЕЕСЯ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Список последовательностей, прилагаемый к настоящей заявке, приведен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в настоящее описание в качестве ссылки. Название текстового файла, содержащего список последовательностей - 930285_412WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл имеет размер 109 кбайт, был создан 25 августа 2020 года и предоставлен в электронной форме через EFS-Web.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям антител и к способам профилактики и лечения инфекции вирусом гепатита В.

Уровень техники

HBV состоит из (i) оболочки, содержащей три родственных поверхностных белка (поверхностный антиген гепатита В, HBsAg) и липид, и (ii) икосаэдрического нуклеокапсида, в который заключен вирусный ДНК-геном и ДНК-полимераза. Капсид HBV образуется в цитозоле инфицированной клетки в ходе упаковывания репликационного комплекса РНК-прегенома и приобретает способность к почкованию в ходе синтеза вирусного ДНК-генома посредством обратной транскрипции прегенома в просвете частицы. Три белка оболочки HBV - S-HBsAg, М-HBsAg и L-HBsAg - формируют комплексную трансмембранную укладку на эндоплазматической сети и образуют связанные дисульфидной связью гомо- и гетеродимеры. В ходе почкования на внутриклеточной мембране короткий линейный домен в цитозольной области preS взаимодействует с участками связывания на поверхности капсида. Затем вирионы секретируются в кровь. Кроме того, поверхностные белки могут почковаться в отсутствие капсидов и формировать субвирусные частицы (SVP), которые также секретируются в избытке 3-4 log относительно вирионов. Высокий уровень HBsAg может приводить к угасанию HBsAg-специфического Т-клеточного ответа, и предполагается, что он является важным фактором вирусной иммунологической толерантности у пациентов с хроническим гепатитом В (CHB) (Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF, Pathologie Biologie, 2010; 58:258-66).

Вирус гепатита В вызывает потенциально угрожающие жизни острые и хронические инфекции печени. Острый гепатит В характеризуется вирусемией, с симптомами или без них, с риском возникновения молниеносного гепатита (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Epub до выхода в печать]). Несмотря на то, что эффективная вакцина против гепатита В доступна с 1982 года, ВОЗ сообщает, что 240 миллионов человек хронически инфицируются гепатитом В и более 780000 человек погибают каждый год вследствие осложнений гепатита В. Приблизительно у одной трети пациентов с хроническим гепатитом В (CHB) развивается цирроз, печеночная недостаточность и

печеночно-клеточная карцинома, насчитывая 600000 смертей в год (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present и future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. *Hepatology*. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Epub до выхода в печать]).

У пациентов, инфицированных HBV, серьезные осложнения могут развиваться в результате соинфекции или суперинфекции HDV. Согласно ВОЗ, гепатитом D инфицировано приблизительно 15 миллионов человек по всему миру. HDV считается субвирусным сателлитом, поскольку он может увеличиваться в количестве только в присутствии HBV. HDV является одним из наиболее мелких известных вирусов у животных (40 нм), причем его геном имеет размер только 1,6 т.п.н. и кодирует S и L HDAg. Все другие белки, необходимые для репликации генома HDV, включая РНК-полимеразу, предоставляются клеткой-хозяином, и оболочка HDV предоставляется HBV. При введении в перmissive клетки РНК-геном HDV реплицируется и ассоциирует с множеством копий HDV-кодируемых белков, собирая рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс. RNP экспортируется из клетки белками оболочки HBV, которые способны собирать липопротеиновые везикулы, которые почкуются в просвет компартмента пре-Гольджи перед секрецией. Более того, белки оболочки HBV также обеспечивают механизм нацеливания HDV на неинфицированную клетку, тем самым обеспечивая распространение HDV.

Осложнения, вызываемые HDV, включают более высокую вероятность печеночной недостаточности при острых инфекциях и быстрое прогрессирование в цирроз печени с повышенной вероятностью развития рака печени при хронических инфекциях. В комбинации с вирусом гепатита В, гепатит D имеет наиболее высокую частоту смертности из всех инфекций гепатитом, на уровне 20% (Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut*. 2000 Mar; 46(3):420-6). Единственной одобренной терапией хронической инфекции HDV является интерферон-альфа. Однако лечение HDV интерфероном-альфа является относительно неэффективным и плохо переносится. Лечение интерфероном-альфа приводит к длительному вирусологическому ответу через шесть месяцев после лечения у одной четверти пациентов. Также нуклеозидные(нуклеотидные) аналоги (NA) широко тестировались при гепатите-дельта, однако они оказались неэффективными. Комбинированное лечение NA с интерфероном также оказалось разочаровывающим (Zaigham Abbas, Minaam Abbas Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic Options. *World J Gastroenterol* 2015 August 28; 21(32): 9461-9465). Таким образом, необходимы новые терапевтические возможности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Чертежи, приведенные в настоящем описании, предназначены для более детальной иллюстрации объекта, включенного в настоящее описание. Чертежи не предназначены для ограничения изобретения каким-либо образом. На протяжении настоящего описания

иллюстративное антитело HBC34v35 (с мутациями Fc, такими как MLNS и GAALIE, или без них) также упоминается как HBC34-v35 и HBC34-V35. Таким образом, будет понятно, что HBC34v35, HBC34-v35 и HBC34-V35 имеют одинаковое значение. Аналогично, иллюстративное антитело HBC34v34 также обозначают как HBC34-v34 и HBC34-V34, и иллюстративное антитело HBC34v7 также обозначают как HBC34-v7 и HBC34-V7. Кроме того, будет понятно "MLNS-GAALIE" имеет то же значение, что "MLNS_GAALIE" (т.е. мутации M428L+N434S+G236A+A330L+I332E (нумерация EU) в Fc-части).

На фиг.1A-1B представлено связывание HBC34-v7 и двух модифицированных антител по настоящему изобретению ("HBC34-v34"; "HBC34-v35") в указанных концентрациях с adw HBsAg (1A) и adr HBsAg (1B), как определяют в прямом анализе ELISA на основе антигена. Все антитела были получены в качестве IgG1 (g1m17, 1 аллотип).

На фиг.2A-2K представлено связывание HBC34-v7, HBC34-v34 и HBC34-v35 со всеми известными генотипами HBsAg ((A)-(J), соответственно) и с имитирующим контролем (K). Использовали репрезентативные последовательности генотипа, отображающие антигенную внешнюю петлю HBsAg, как показано в примере 5 публикации PCT № WO 2017/060504. Окрашивание проводили посредством FACS. Концентрации антител были такими, как указано по оси у графиков.

На фиг.3A и 3B представлено связывание HBC34-v7 и HBC34-v35, имеющих Fc-области дикого типа и варианты Fc-областей, с adw HBsAg в прямом анализе ELISA на основе антигена (2 эксперимента; данные из "эксперимента 1" представлены на фиг.3A, и данные из "эксперимента 2" представлены на фиг.3B). Кривые связывания антигена представлены на верхней панели каждой фигуры. Значения EC50 (определенные посредством аппроксимации кривых с использованием Graphpad prism) представлены на средней панели каждой фигуры. Связывание с непокрытыми планшетами (контроль) представлено на нижней панели каждой фигуры. Fc-области: "HBC34v7" и "HBC34-v35"=дикий тип; "HBC34-v35-MLNS"=M428L/N434S. "HBC34-v35-MLNS-GAALIE"=M428L/N434S/G236A/A330L/I332E. Тестировали три партии HBC34-v35. Тестировали две партии HBC34-v35-MLNS и две партии HBC34-v35-MLNS-GAALIE. Использовали одну партию HBC34-v7.

На фиг.4-7 представлен эффект HBC34-v35 на сывороточные уровни HBsAg в модели инфекции HBV на мышах *in vivo*. Мышам SCID, инфицированным AAV/HBV, трансплантировали первичные гепатоциты человека и вводили HBC34-v35 в дозе 1, 5 или 15 мг/кг, или PBS (контроль), как описано в примере 5. На фиг.4 представлена сывороточная концентрация ДНК HBV до и после обработки. На фиг.5 представлена сывороточная концентрация HBsAg до и после обработки. На фиг.6 представлена сывороточная концентрация HBeAg до и после обработки. На фиг.7 представлена сывороточная концентрация HBcAg до и после обработки.

На фиг.8A-8E представлено связывание HBC34-v35-MLNS и HBC34-v35-MLNS-GAALIE с FcγR человека при оценке посредством интерферометрии в биослое (BLI). His-

меченные FcγR человека ((A) аллель FcγRIIa H131; (B) аллель FcγRIIa R131; (C) аллель FcγRIIa F158; (D) аллель FcγRIIa V158; (E) FcγRIIb) в дозе 2 мкг/мл иммобилизовывали на датчиках с антителами против пента-His в течение 6 минут. Затем нагруженные FcγR датчики подвергали воздействию в течение 5 минут раствора кинетического буфера для кинетического анализа (pH 7,1), содержавшего 2 мкг/мл каждого mAb (левая часть графика) в присутствии 1 мкг/мл affiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, специфичного к F(ab')₂ -фрагменту (для связывания mAb человека через Fab-фрагмент), с последующей стадией диссоциации в том же буфере в течение дополнительных 4 минут (правая часть графика). Профили ассоциации и диссоциации определяли в течение времени в качестве изменения паттерна интерференции с использованием Octet RED96 (FortéBio).

На фиг.9 представлено связывание HBC34-v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с C1q человека при определении посредством Octet. Датчики с антителом против Fab (CH1) человека использовали для улавливания через Fab-фрагмент полного IgG1 mAb HBC34-v35-MLNS и HBC34-v35-MLNS-GAALIE в количестве 10 мкг/мл в течение 10 минут. Затем нагруженные IgG датчики подвергали воздействию в течение 4 минут раствора буфера для кинетического анализа (pH 7,1), содержавшего 3 мкг/мл очищенного C1q человека (левая часть графика), после чего проводили стадию диссоциации в том же буфере в течение дополнительных 4 минут (правая часть графика). Профили ассоциации и диссоциации определяли в реальном времени в качестве изменения паттерна интерференции с использованием Octet RED96 (FortéBio).

На фиг.10А и 10В представлена активация *in vitro* FcγRIIa человека с использованием рецептор-связанной активации опосредуемого NFAT люциферазного репортера в модифицированных клетках Jurkat. Активацию FcγRIIa тестировали с использованием валидированного коммерчески доступного анализа с биорепортером, в котором в качестве антигена-мишени используют рекомбинантный HBsAg (Engerix B). Серийные разведения HBC34v35-MLNS и HBC34-v35-MLNS-GAALIE и контрольного (Ctr) mAb инкубировали с 0,2 мкг/мл HBsAg при 37°C в течение 25 мин. Эффекторные клетки Jurkat (Promega), экспрессирующие либо низкоаффинный аллель FcγRIIa F158 (A), либо высокоаффинный аллель FcγRIIa V158 (B), суспендировали в буфере для анализа, а затем добавляли в планшете для анализа. После инкубации при 37°C в течение 24 часов добавляли реагент для люциферазного анализа Bio-GloTM (Promega) и проводили количественное определение люминесценции с использованием люминометра (Bio-Tek).

На фиг.11А и 11В представлена активация *in vitro* FcγRIIa человека с использованием рецептор-связанной активации опосредуемого NFAT люциферазного репортера в модифицированных клетках Jurkat. Активацию FcγRIIa человека определяли с использованием валидированного коммерчески доступного анализа с биорепортером, в котором в качестве антигена-мишени используется рекомбинантный HBsAg (Engerix B). Серийные разведения HBC34-v35-MLNS и HBC34-v35-MLNS-GAALIE и контрольного mAb (Ctr) инкубировали с 2 (A) или 0,2 мкг/мл (B) HBsAg при 37°C в течение 25 мин.

Эффекторные клетки Jurkat (Promega), экспрессирующие высокоаффинный аллель H131 FcγRIIa, ресуспендировали в буфере для анализа, а затем добавляли в планшеты для анализа. После инкубации при 37°C в течение 23 часов добавляли реагент для люциферазного анализа Bio-Glo-™ (Promega) и проводили количественное определение люминесценции с использованием люминометра (Bio-Tek).

На фиг.12 представлена активация *in vitro* FcγRIIb человека с использованием рецептор-связанной активации опосредуемого NFAT люциферазного репортера в модифицированных клетках Jurkat. Активацию FcγRIIb человека тестировали с использованием валидированного коммерчески доступного анализа с биорепортером, в котором в качестве антигена-мишени используется рекомбинантный HBsAg (Engerix B). Серийные разведения HBC34-v35-MLNS и HBC34-v35-MLNS-GAALIE и контрольного mAb (Ctr) инкубировали с 1 мкг/мл HBsAg в концентрации 37°C в течение 15 мин. Эффекторные клетки Jurkat (Promega), экспрессирующие γRIIb, ресуспендировали в буфере для анализа, а затем добавляли в планшеты для анализа. После инкубации при 37°C в течение 20 часов добавляли реагент для люциферазного анализа Bio-Glo-™ (Promega) и проводили количественное определение люминесценции с использованием люминометра (Bio-Tek).

На фиг.13А и 13В представлено уничтожение *in vitro* клеток гепатомы человека PLC/PRF/5 первичными NK-клетками человека в присутствии HBC34-v35-MLNS и HBC34-v35-MLNS-GAALIE. (А) ADCC тестировали с использованием свежевыделенных NK-клеток от одного донора, для которого предварительно было проведено генотипирование в отношении экспрессии гетерозиготного высокоаффинного (V158) и низкоаффинного (F158) FcγRIIIa (F/V). Серийные разведения HBC34-v35, HBC34-v35-MLNS, HBC34-v35-MLNS-GAALIE, 17.1.41 и контрольного mAb добавляли к секретирующей HBsAg клеточной линии гепатомы PLC/PRF/5 (также называемой клетками Alexander). Клетки PLC/PRF/5 инкубировали вместе с антителами при комнатной температуре в течение 10 мин. NK-клетки добавляли в планшеты для анализа (соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней 10:1) и инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Клеточную смерть определяли путем измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). (В) Окрашивание клеток гепатомы человека PLC/PRF/5 посредством mAb HBC34v35 и 17.1.41 при оценке посредством проточной цитометрии. Клетки тщательно промывали, фиксировали формальдегидом (4%) или фиксировали и пермеабелизировали (сапонин 0,5%) перед окрашиванием различными концентрациями mAb HBC34-v35 и 17.1.41. Детекцию связывания этих mAb человека проводили посредством проточной цитометрии с использованием Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, специфичного к Fcγ-фрагменту.

На фиг.14А и 14В представлена активация *in vitro* первичных NK-клеток человека в присутствии HBC34v35-MLNS и HBC34-v35-MLNS-GAALIE и HBsAg. Активацию NK-клеток тестировали с использованием свежевыделенных клеток от двух доноров, для которых ранее было проведено генотипирование в отношении экспрессии (А)

гомозиготного высокоаффинного (V158) или (B) низкоаффинного (F158) FcγRIIIa. Серийные разведения mAb HBC34-V35, HBC34-v35-MLNS-GAALIE и HBC34-v35-LALA инкубировали с NK-клетками в течение 4 часов. Активацию NK-клеток определяли посредством проточной цитометрии путем окрашивания NK-клеток mAb против CD107a в качестве функционального маркера для идентификации активности NK-клеток. CD107a, также известный как LAMP-1, является маркером дегрануляции NK-клеток.

На фиг.15A-15C представлена схема оценки здоровых взрослых индивидуумов в иллюстративном клиническом испытании единичной возрастающей дозы (SAD) иллюстративной фармацевтической композиции, содержащей антитело HBC34-v35-MLNS-GAALIE, как описано в примере 9.

На фиг.16A-16E представлена схема оценки индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза и проходящих терапию нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (NRTI) в иллюстративном клиническом испытании, описанном в примере 9.

На фиг.17A-17C представлены моменты времени проведения фармакокинетических изменений у индивидуумов согласно иллюстративному клиническому испытанию, описанному в примере 9.

На фиг.18 представлена схема дозирования согласно иллюстративному клиническому испытанию, описанному в примере 9.

На фиг.19 представлена клиническая лабораторная оценка согласно иллюстративному клиническому испытанию, описанному в примере 9.

На фиг.20 представлено повышение уровня активирующих и костимулирующих маркеров на дендритных клетках моноцитарного происхождения (moDC), стимулированных посредством иммунных комплексов: HBC34-v35-MLNS+HBsAg или HBC34-v35-MLNS-GAALIE+HBsAg, как описано в примере 10.

На фиг.21 представлена секреция цитокинов посредством moDC, стимулированных иммунными комплексами: HBC34-v35-MLNS+HBsAg или HBC34-v35-MLNS-GAALIE+HBsAg, как описано в примере 10.

На фиг.22A и 22B представлено высвобождение IFN-γ в культурах цельной крови, стимулированных иммунными комплексами с: HBC34-v35-MLNS и HBsAg; или HBC34-v35-MLNS-GAALIE и HBsAg, как описано в примере 10. (A) Концентрация IFN-γ (log10); (B) кратное изменение IFN-γ (log10), нормализованное, как описано в примере 10.

На фиг.23A и 23B представлено высвобождение IL-2 в культурах цельной крови, стимулированных иммунными комплексами с: HBC34-v35-MLNS и HBsAg; или HBC34-v35-MLNS-GAALIE и HBsAg, как описано в примере 10. (A) концентрация IL-2 (log10); (B) кратное изменение IL-2 (log10), нормализованное, как описано в примере 10.

На фиг.24A и 24B представлен IFN-γ и IL-2 в культурах цельной крови, стимулированных иммунными комплексами с: HBC34-v35-MLNS и HBsAg; или HBC34-v35-MLNS-GAALIE и HBsAg, как описано в примере 10. (A) IFN-γ; 100 мкг/мл mAb; (B). IL-2; IL-2 мкг/мл mAb.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим антитела, которые нейтрализуют инфекцию вирусом гепатита В (HBV), и к способам применения этих композиций. В определенных вариантах осуществления антитела связывают HBsAg генотипа, выбранного из А, В, С, D, Е, F, G, H, I и J, или любой их комбинации. В определенных вариантах осуществления антитела включают мутации в тяжелой цепи, которые продлевают время полужизни антител *in vivo* (например, у человека), и мутации в тяжелой цепи, которые повышают аффинность связывания с FcγR (например, FcγRIIIa человека, FcγRIIIa человека или обоими из них).

В некоторых вариантах осуществления антитело и фармацевтическая композиция хорошо переносятся индивидуумом при введении в количествах, которые являются терапевтически эффективными. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем описании, включают введение антитела или фармацевтической композиции согласно настоящему описанию индивидууму, инфицированному HBV.

Хотя антитела, которые нейтрализуют HBV, фармацевтические композиции, включающие эти антитела, и способы применения таких фармацевтических композиций подробно описаны ниже, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными методологиями, протоколами и реагентами, описанными в настоящем описании, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевает специалист в данной области.

Ниже описаны аспекты настоящего изобретения. Описаны определенные варианты осуществления, однако следует понимать, что варианты осуществления изобретения можно комбинировать любым образом и в любом количестве с получением дополнительных вариантов осуществления. Различные описанные примеры и варианты осуществления не следует истолковывать как ограничивающие настоящее изобретение только явно описанными вариантами осуществления. Должно быть понятно, что настоящее изобретение обосновывает и охватывает варианты осуществления, которые сочетают в себе прямо описанные варианты осуществления с любым раскрытым объектом. Более того, любые перестановки и комбинации всех описанных объектов в настоящей заявке следует считать раскрытыми посредством описания настоящей заявки, если контекст не указывает на иное.

На протяжении настоящего описания, если контекстом не требуется иное, термин "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий" используются в качестве синонимов, например, с "имеющий", "имеет", "включающий", "включает" и т.п., и подразумевается, что они включают указанный представитель, соотношение, целое число (включая, когда это целесообразно, его долю; например, одну десятую и одну сотую

целого числа), концентрацию или стадию, но не исключают какой-либо другой не указанный представитель, соотношение, целое число, концентрацию или стадию. Термин "по существу состоящий из" не эквивалентен термину "содержащий", и он относится к указанным материалам или стадиям в пункте формулы изобретения, или к материалам или стадиям, которые не оказывают значительного влияния на основные характеристики заявленного объекта. Например, белковый домен, область или модуль (например, связывающий домен) или белок "состоит по существу из" конкретной аминокислотной последовательности, когда аминокислотная последовательность домена, области, модуля или белка включает удлинения, делеции, мутации или их комбинацию (например, аминокислоты на N- или C-конце или между доменами), которые совместно вносят вклад не более чем в 20% (например, не более чем в 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) длины домена, области, модуля или белка, и по существу не влияют (т.е. не снижают активность более чем на 50%, как например, не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%) на активность домена(ов), области(ей), модуля(ей) или белка (например, аффинность связывания с мишенью у белка-мишени).

Термин "состоит из" является конкретным вариантом осуществления термина "содержит", где любой другой неуказанный представитель, целое число или стадия исключены. В контексте настоящего изобретения термин "содержать" охватывает термин "состоять из". Термин "содержащий", таким образом, охватывает термин "включающий", а также "состоящий", например, композиция "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может включать что-то дополнительное, например, X+Y.

Кроме того, следует понимать, что индивидуальные соединения, или группы соединений, образованные из различных комбинаций структур и заместителей, описанных в настоящем описании, описаны в настоящей заявке в той же степени, как если бы каждое соединение или группа соединений были указаны индивидуально. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных заместителей входит в объем настоящего изобретения.

Форму единственного числа, используемую в контексте описания изобретения (в том числе в контексте формулы изобретения), следует истолковывать как охватывающую как единственное, так и множественное число, если в настоящем описании нет иных указаний или если контекст явно этому не противоречит. Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как означающее либо одну, либо обе, либо любую комбинацию альтернатив. Подразумевается, что приведение диапазонов величин в настоящем описании служит в качестве сокращенного способа указания индивидуально каждой отдельной величины, входящей в данный диапазон. Если в настоящем описании нет иных указаний, каждая индивидуальная величина включена в описание, как если бы она индивидуально была указана в настоящем описании. Никакие формулировки в описании не следует истолковывать как указывающие на то, что какой-либо не заявленный элемент является необходимым для применения на практике объекта, описанного в настоящем описании.

Слово "по существу" не исключает "полностью"; например, композиция, которая "по существу свободна" от Y, может быть полностью свободна от Y. В определенных вариантах осуществления "по существу" относится к данному количеству, эффекту или активности композиции, способа или применения по настоящему изобретению по сравнению с эталонной композицией, способом или применением, и оно описывает уменьшение количества, эффекта или активности не более чем на 50%, как например, не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%, или менее, от количества, эффекта или активности эталонной композиции, способа или применения.

Термин "приблизительно" в отношении числовой величины x означает $x \pm 10\%$, например, $x \pm 5\%$, или $x \pm 7\%$, или $x \pm 10\%$, или $x \pm 12\%$, или $x \pm 15\%$, или $x \pm 20\%$. Например, в определенных вариантах осуществления "приблизительно" означает $\pm 20\%$ от указанного диапазона, величины или структуры.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что описанный после него элемент, компонент, событие или обстоятельство может произойти или может не произойти, и что описание включает случаи, когда элемент, компонент, событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит.

Термин "заболевание", как используют в рамках изобретения, в основном является синонимом и используется взаимозаменяемо с терминами "нарушение" и "состояние" (как в медицинском состоянии), в том, что все они отражают аномальное состояние организма человека или животного, или одной из его частей, которое нарушает нормальное функционирование, обычно проявляется характерными признаками и симптомами, и вызывает уменьшение продолжительности или качества жизни страдающего человека или животного.

Как используют в рамках изобретения, термин "терапевтически эффективный" относится к природе или количеству фармацевтической композиции или антитела, как описано в настоящем описании, которое является достаточным для обеспечения пользы для индивидуума. В контексте настоящего изобретения, пользой для индивидуума является лечение инфекции вирусом гепатита В. Как используют в рамках изобретения, подразумевается, что указание на "лечение" индивидуума или пациента включает предупреждение, профилактику, ослабление, облегчение и терапию. Польза лечения включает улучшение клинического исхода; уменьшение или облегчение симптомов, ассоциированных с заболеванием; уменьшение встречаемости симптомов; улучшение качества жизни; более длительный статус свободы от заболевания; уменьшение степени заболевания; стабилизацию болезненного состояния; замедление прогрессирования заболевания; ремиссию; выживание; более длительное выживание или любую их комбинацию. Термины "индивидуум" или "пациент" используются в настоящем описании взаимозаменяемо для указания на людей, которые являются предрасположенными к инфекции HBV или уже инфицированы HBV.

Дозы часто выражают относительно массы тела (т.е. индивидуума). Таким образом, доза, которую выражают в качестве [г, мг или другой единицы]/кг (или г, мг и т.д.), может

относиться к [г, мг или другой единице] "на кг (или г, мг и т.д.) массы тела", даже если термин "масса тела" явно не упоминается.

Как используют в рамках изобретения, "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, которые модифицированы позднее, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют сходную химическую структуру со встречающейся в природе аминокислотой, т.е. α -углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосерином, норлейцином, метионинсульфоксидом, метионинметилсульфонием. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же базовую химическую структуру, что и у встречающейся в природе аминокислоты. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от основной химической структуры аминокислоты, но которые функционируют аналогично встречающейся в природе аминокислоте.

Как используют в рамках изобретения, термины "пептид", "полипептид" и "белок", и варианты этих терминов, относятся к молекуле, которая содержит по меньшей мере две аминокислоты, соединенных друг с другом (нормальной или модифицированной) пептидной связью. Например, пептид, полипептид или белок может состоять из множества аминокислот, выбранных из 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом, каждая из которых связана по меньшей мере с одной другой пептидной связью. Пептид, полипептид или белок может состоять из L-аминокислот и/или D-аминокислот. Термины "пептид", "полипептид", "белок" также включают "пептидомиметики", которые определяют как пептидные аналоги, содержащие непептидные структурные элементы, которые способны имитировать или противодействовать биологическому действию(ям) природного родительского пептида. В определенных вариантах осуществления пептидомиметик лишен характеристик, таких как ферментативно расщепляемые пептидные связи.

Пептид, полипептид или белок может содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом, в дополнение к этим аминокислотам, или он может содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом. В определенных вариантах осуществления пептид, полипептид или белок в контексте настоящего изобретения может содержать аминокислоты, которые модифицированы посредством природных процессов, таких как процессы посттрансляционного созревания, или посредством химических процессов (например, процессов синтеза), которые известны в данной области и включают процессы, описанные в настоящем описании. Такие модификации могут присутствовать в любом месте

полипептида; например, в пептидном скелете; в аминокислотной цепи или на N- или C-концах. Пептид или полипептид может быть разветвленным, например, после убиквитинилирования, или он может быть циклическим с ветвлением или без него. Термины "пептид", "полипептид", "белок" также включают модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Например, модификации пептида, полипептида или белка могут включать ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидацию, ковалентную фиксацию нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентную фиксацию липида или липидного производного, ковалентную фиксацию фосфатидилинозитола, ковалентное или нековалентное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, гликозилирование включая пегилирование, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, сенолоилирование, сульфатацию, присоединение аминокислот, такое как аргинилирование или убиквитинилирование. Такие модификации описаны в литературе (см. Protein Structure and Molecular Properties (1993) 2nd Ed., T. E. Creighton, New York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York; Seifter et al. (1990) Analysis for белок modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182: 626-646 и Rattan et al., (1992) Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663: 48-62). Таким образом, термины "пептид", "полипептид", "белок" могут включать, например, липопептиды, липопротеины, гликопептиды, гликопротеины и т.п. Также предусматриваются варианты белков, пептидов и полипептидов по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления варианты белков, пептидов и полипептидов включают или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентична определенной или эталонной аминокислотной последовательности, как описано в настоящем описании.

Как используют в рамках изобретения, "(поли)пептид" и "белок" могут использоваться взаимозаменяемо в отношении полимера из аминокислотных остатков, таких как множество аминокислотных мономеров, связанных пептидными связями.

"Молекула нуклеиновой кислоты", или "полинуклеотид", или "нуклеиновая кислота" относится к полимерному соединению, включающему ковалентно связанные нуклеотиды, которые могут состоять из природных субъединиц (например, пуриновые или пиримидиновые основания) или неприродных субъединиц (например, морфолиновое кольцо). Пуриновые основания включают аденин, гуанин, гипоксантин и ксантин, и пиримидиновые основания включают урацил, тимин и цитозин. Мономеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфоранилидат, фосфорамидат и т.п.

Молекулы нуклеиновых кислот включают полирибонуклеиновую кислоту (РНК),

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

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, включает все нуклеотидные последовательности, которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Некоторые версии нуклеотидных последовательностей также могут включать интрон(ы) так, чтобы интрон(ы) мог быть удален посредством котранскрипционных или посттранскрипционных механизмов. Иными словами, различные нуклеотидные последовательности могут кодировать одинаковую аминокислотную последовательность в результате избыточности или вырожденности генетического кода, или в результате сплайсинга, или обоих из них.

Также предусматриваются варианты молекул нуклеиновой кислоты. Варианты молекул нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичны молекуле нуклеиновой кислоты определенного или эталонного полинуклеотида, как описано в настоящем описании, или гибридизуются с данным полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при приблизительно 65-68°C или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия и 50% формамида при приблизительно 42°C. Варианты молекулы нуклеиновой кислоты сохраняют способность кодировать слитый белок или его связывающий домен, обладающий функциональностью, описанной в настоящем описании, такой как специфическое связывание с молекулой-мишенью.

Как используют в рамках изобретения, термин "вариант последовательности" относится к любой последовательности, имеющей одно или несколько изменений по сравнению с эталонной последовательностью, причем эталонная последовательность представляет собой любую опубликованную последовательность и/или имеет последовательность, приведенную в "Таблице последовательностей и SEQ ID номеров" (список последовательностей), т.е. с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 120. Таким образом, термин "вариант последовательности" включает варианты нуклеотидной последовательности и варианты аминокислотной последовательности. В определенных вариантах осуществления для варианта последовательности в контексте нуклеотидной последовательности, эталонная последовательность также представляет собой нуклеотидную последовательность, в то время как в определенных вариантах осуществления для варианта последовательности в контексте аминокислотной последовательности, эталонная последовательность также представляет собой аминокислотную последовательность. "Вариант последовательности", как используют в

рамках изобретения, может быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен эталонной последовательности.

"Процентная идентичность последовательностей" относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями при определении путем сравнения последовательностей. Способы определения идентичности последовательностей могут быть предназначены для обеспечения наилучшего соответствия между сравниваемыми последовательностями. Например, последовательности могут быть выровнены для целей оптимального сравнения (например, пропуски могут быть внесены в одну или несколько из первой и второй аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания). Кроме того, для целей сравнения негомологичные последовательности могут игнорироваться. Процентную идентичность последовательностей, упоминаемую в настоящем описании, вычисляют на протяжении длины эталонной последовательности, если нет иных указаний. Способы определения идентичности и сходства последовательностей могут быть найдены в общедоступных компьютерных программах. Выравнивание последовательностей и вычисление процентной идентичности можно проводить с использованием программы BLAST (например, BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN или BLASTX). Математический алгоритм, используемый в программах BLAST, может быть найден в Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997. В контексте настоящего изобретения будет понятно, что, когда для анализа используют программное обеспечение для анализа последовательностей, результаты анализа основываются на "величинах по умолчанию" упоминаемой программы. "Величины по умолчанию" означают любой набор величин или параметров, которые изначально загружаются с программным обеспечением, когда его впервые запускают.

"Вариант последовательности" в контексте последовательности нуклеиновой кислоты (нуклеотидной последовательности) имеет измененную последовательность, где один или несколько нуклеотидов в эталонной последовательности удалены или заменены, или один или несколько нуклеотидов встроены в последовательность эталонной нуклеотидной последовательности. Нуклеотиды обозначаются в настоящем описании посредством стандартного однобуквенного обозначения (A, C, G или T). Вследствие вырожденности генетического кода "вариант последовательности" для нуклеотидной последовательности может либо приводить к изменению соответствующей эталонной аминокислотной последовательности, т.е. к "варианту последовательности" аминокислот, либо нет. В определенных вариантах осуществления вариант нуклеотидной последовательности не приводит к варианту аминокислотной последовательности (например, молчащая мутация). В некоторых вариантах осуществления предусматривается вариант нуклеотидной последовательности, который приводит к

"немолчащим" мутациям. В некоторых вариантах осуществления вариант нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична эталонной аминокислотной последовательности. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности, как описано в настоящем описании, также относятся к кодон-оптимизированным версиям эталонной нуклеотидной или аминокислотной последовательности или нуклеотидной или аминокислотной последовательности дикого типа. В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, полинуклеотид по настоящему изобретению может быть кодон-оптимизированным для клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид (см., например, Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135-145 (2006)).

"Вариант последовательности" в контексте аминокислотной последовательности имеет измененную последовательность, в которой одна или несколько из аминокислот удалена, заменена или встроена по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью. В результате изменений такой вариант последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична эталонной аминокислотной последовательности. Например, на 100 аминокислот эталонной последовательности последовательность варианта, которая имеет не более 10 изменений, т.е. любую комбинацию делеций, инсерций или замен, является "по меньшей мере на 90% идентичной" эталонной последовательности.

"Консервативная замена" относится к аминокислотным заменам, которые не влияют в значительной степени или не изменяют характеристики связывания конкретного белка. Как правило, консервативные замены представляют собой замены, в которых заменяемый аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Консервативные замены включают замену, встречающуюся в одной из следующих групп: группа 1: аланин (Ala или A), глицин (Gly или G), серин (Ser или S), треонин (Thr или T); группа 2: аспарагиновая кислота (Asp или D), глутаминовая кислота (Glu или Z); группа 3: аспарагин (Asn или N), глутамин (Gln или Q); группа 4: аргинин (Arg или R), лизин (Lys или K), гистидин (His или H); группа 5: изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), метионин (Met или M), валин (Val или V); и группа 6: фенилаланин (Phe или F), тирозин (Tyr или Y), триптофан (Trp или W). Дополнительно или альтернативно, аминокислоты могут быть сгруппированы в группы консервативных замен по сходной функции, химической структуре или составу (например, кислотные, основные, алифатические, ароматические или содержащие серу). Например,

алифатические группы могут включать для целей замены Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы консервативных замен включают содержащие серу: Met и цистеин (Cys или C); кислотные: Asp, Glu, Asn и Gln; малые алифатические, неполярные или слабополярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; полярные положительно заряженные: His, Arg и Lys; крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и крупные ароматический остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительная информация может быть найдена в Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company.

Инсерции в аминокислотную последовательность могут включать N- и/или C-концевые слияния, длина которых находится в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают слияние N- или C-конца аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

Как правило, изменения вариантов последовательности не устраняют или не снижают значительно желаемую функциональность соответствующей эталонной последовательности. Например, предпочтительно, чтобы последовательность варианта по настоящему изобретению не снижала в значительной степени или не устраняла полностью функциональность последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в отношении связывания с тем же эпитопом и/или достаточной нейтрализации инфекции HBV и HDV по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом имеющим эталонную последовательность (или кодируемым ей). Руководство по определению того, какие нуклеотиды и аминокислотные остатки, соответственно, могут быть замещены, встроены или удалены без устранения желаемой структуры или функциональности, могут быть найдены с использованием известных компьютерных программ.

Как используют в рамках изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, "происходящая из" указанной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, относится к источнику нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая происходит из конкретной последовательности, может иметь аминокислотную последовательность, которая по существу идентична этой последовательности или ее части, из которой она происходит, причем "по существу идентичный" включает варианты последовательности, как определено выше. Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая происходит из конкретного пептида или белка, может происходить из соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. В этом контексте, "соответствующий" относится к наличию одной и той же функциональности или представляющей интерес характеристики. Например, "внеклеточный домен" соответствует другому "внеклеточному домену" (другого белка) или "трансмембранный

домен" соответствует другому "трансмембранному домену" (другого белка). "Соответствующие" части пептидов, белков и нуклеиновых кислот, таким образом, способен легко идентифицировать специалист в данной области. Аналогично, последовательность, "происходящая из" другой последовательности (например, "источника"), может быть идентифицирована специалистом в данной области как происходящая из последовательности-источника.

Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, происходящая из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентична исходной нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (из которых она происходит). Однако последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, происходящая из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, также может иметь одну или несколько мутаций относительно исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которого она происходит), в частности, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, происходящая из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может представлять собой функциональный вариант последовательности, как описано выше, исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которого ни происходят). Например, в пептиде/белке, один или несколько аминокислотных остатков могут быть замещены другими аминокислотными остатками, или может происходить инсерция или делеция одного или нескольких аминокислотных остатков.

Как используют в рамках изобретения, термин "мутация" относится к изменению последовательности нуклеиновой кислоты и/или аминокислотной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью, последовательностью дикого типа или эталонной последовательностью. Мутация, например, по сравнению с эталонной геномной последовательностью, может представлять собой, например, (встречающуюся в природе) соматическую мутацию, спонтанную мутацию, индуцированную мутацию, например, индуцированную ферментами, химическими веществами или радиацией, или мутацию, полученную сайт-направленным мутагенезом (способы молекулярной биологии для внесения специфических и намеренных изменений в последовательность нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотную последовательность). Таким образом, также следует понимать, что термины "мутация" или "внесение мутации" включают физическое внесение мутации, например, в последовательность нуклеиновой кислоты или в аминокислотную последовательность. Мутация включает замену, делецию или инсерцию одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот, а также инверсию нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Для достижения мутации аминокислотной последовательности мутацию можно вносить в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную аминокислотную последовательность, для экспрессии (рекомбинантного) мутантного полипептида. Мутация может быть

достигнута, например, путем изменения (например, посредством сайт-направленного мутагенеза) кодона (например, путем изменения одного, двух или трех нуклеотидных оснований в нем) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну аминокислоту, с получением кодона, который кодирует другую аминокислоту или который кодирует ту же аминокислоту, или путем синтеза варианта последовательности.

Термин "введенный" в контексте внедрения молекулы нуклеиновой кислоты в клетку, означает "трансфекцию", или "трансформацию", или "трансдукцию", и включает указание на включение молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где молекула нуклеиновой кислоты может быть включена в геном клетки (например, хромосома, плаزمид, пластидная или митохондриальная ДНК), конвертирована в автономный репликон или временно экспрессирована (например, трансфицированная мРНК).

Термин "рекомбинантный", как используют в рамках изобретения (например, рекомбинантное антитело, рекомбинантный белок, рекомбинантная нуклеиновая кислота и т.п., относится к любой молекуле (антитело, белок, нуклеиновая кислота и т.п.), которая получена, экспрессирована, создана или выделена рекомбинантными способами и которая не является встречающейся в природе. "Рекомбинантный" можно использовать в качестве синонима с "модифицированным" или "неприродным" и он может относиться к организму, микроорганизму, клетке, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, которые включают по меньшей мере одно генетическое изменение или модифицированы путем введения экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, где такие изменения или модификации вносят способами генной инженерии (т.е. посредством вмешательства человека). Генетические изменения включают, например, модификации, вносящие экспрессируемые молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие белки или ферменты, или другие вставки, делеции, замены в нуклеиновой кислоте или другое функциональное нарушение генетического материала клетки. Дополнительные модификации включают, например, некодирующие регуляторные области, в которых модификации изменяют экспрессию полинуклеотида, гена или оперона.

Как используют в рамках изобретения, "гетерологичный", или "неэндогенный", или "экзогенный" относится к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которые не являются нативными для клетки-хозяина или индивидуума, или к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, являющимся нативными для клетки-хозяина или индивидуума, которые изменены. Гетерологичный, неэндогенный или экзогенный включает гены, белки, соединения или молекулы нуклеиновых кислот, в которые были внесены мутации или которые были иным образом изменены, так чтобы структура, активность или обе из них отличались между нативными и измененными генами, белками, соединениями или молекулами нуклеиновых кислот. В определенных вариантах осуществления гетерологичные, неэндогенные или экзогенные гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот (например, рецепторы, лиганды и т.д.) могут не быть эндогенными для клетки-

хозяина или индивидуума, а вместо этого нуклеиновые кислоты, кодирующие такие гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот могут быть добавлены в клетку-хозяина путем конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации и т.п., где добавленная молекула нуклеиновой кислоты может встраиваться в геном клетки-хозяина или может существовать в качестве внехромосомного генетического материала (например, в качестве плазмиды или другого самореплицирующегося вектора). Термин "гомологичный" или "гомолог" относится к гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, встречающихся в или происходящих из являющейся хозяином клетки, вида или штамма. Например, гетерологичный или экзогенный полинуклеотид или ген, кодирующий полипептид может быть гомологичным для нативного полинуклеотида или гена и кодировать гомологичный полипептид или активность, однако полинуклеотид или полипептид может иметь измененную структуру, последовательность, уровень экспрессии или любую их комбинацию. Неэндогенный полинуклеотид или ген, а также кодируемый полипептид или активность, могут быть из того же вида, другого вида или их комбинации.

Как используют в рамках изобретения, термин "эндогенный" или "нативный" относится к полинуклеотиду, гену, белку, соединению, молекуле или активности, которые в норме присутствуют в являющейся хозяином клетке или у индивидуума.

Как используют в рамках изобретения, термины "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используют взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство. Таким образом, слова "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную клетку индивидуума и культуры, происходящие из нее, независимо от количества переносов. Также понятно, что все потомство может не быть точно идентичным по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или неумышленных мутаций. Эти термины включают варианты потомства, которые имеют ту же или по существу ту же функцию, фенотип или биологическую активность, в отношении которых проводят скрининг в первоначально трансформированной клетке. Когда предполагаются особые определения, это очевидно из контекста.

Настоящее изобретение основано, частично, на конструкции антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые способны нейтрализовывать вирусы гепатита В и гепатита дельта. Варианты осуществления антител и антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему описанию могут использоваться в способах предупреждения, лечения или ослабления HBV и HDV. В конкретных вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, могут связываться с двумя или более различными генотипами поверхностного антигена вируса гепатита В и с двумя или более различными инфекционными мутантами поверхностного антигена вируса гепатита В. В конкретных вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем описании, связываются со всеми известными в настоящее время генотипами поверхностного антигена вируса гепатита В и со всеми известными в настоящее время инфекционными мутантами поверхностного антигена вируса гепатита В.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в фармацевтической композиции и способе, как описано в настоящем описании, которые связываются с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализуют инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

Как используют в рамках изобретения, и если контекст явно не указывает на иное, "антитело" относится к интактному антителу, содержащему по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенных между собой дисульфидными связями (хотя понятно, что антитела с тяжелыми цепями, которые лишены легких цепей, все еще охватываются термином "антитело"), а также к любой антигенсвязывающей части или фрагменту интактного антитела, которая имеет или сохраняет способность связываться с молекулой антигена-мишени, распознаваемой интактным антителом, например, таким как фрагмент scFv, Fab или F(ab')₂. Таким образом, термин "антитело" в настоящем описании используется в наиболее широком значении и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и их функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты, включая антигенсвязывающие фрагменты (Fab), F(ab')₂-фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты рекомбинантных IgG (rIgG), фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv) и однодоменные антитела (например, sdAb, sdFv, наноантитела). Термин охватывает генно-модифицированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгатные антитела, мультиспецифические, например биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетратела, тендемный ди-scFv, тендемный три-scFv. Если нет иных указаний, следует понимать, что термин "антитело" охватывает его функциональные фрагменты. Также термин охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или любого подкласса, включая IgG и его подклассы: IgM, IgE, IgA и IgD.

Таким образом, антитела по изобретению могут быть любого изотипа (например, IgA, IgG, IgM, также называемые тяжелыми цепями α , γ и μ , соответственно). Например, в определенных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG-типа. В пределах изотипа IgG, антитела могут представлять собой антитела подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность двух различных изотипов (например, замена аминокислотной последовательности константного домена), как например, антитело, содержащее константную область, которая содержит аминокислотную последовательность из IgA-антитела и аминокислотную последовательность из IgG-антитела. Антитела по изобретению могут содержать легкую цепь κ или λ . В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело типа IgG1 и содержит легкую цепь κ .

Как используют в рамках изобретения, термины "антигенсвязывающий фрагмент,"

"фрагмент" и "фрагмент антитела" используются взаимозаменяемо для указания на любой фрагмент антитела по изобретению, который сохраняет активность антитела в отношении связывания антигена. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Кроме того, термин "антитело", как используют в рамках изобретения, включает как антитела, так и их антигенсвязывающие фрагменты. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты дополнительно описаны в настоящем описании.

Антитела человека известны (van Dijk, M. A. и van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Антитела человека могут продуцироваться у трансгенных животных (например, мышей), которые способны при иммунизации продуцировать полный репертуар или набор антител человека в отсутствие продуцирования эндогенных иммуноглобулинов. Перенос набора генов иммуноглобулинов зародышевого типа человека у таких мышей с мутантными генами зародышевой линии приводит к продуцированию антител человека при антигенной нагрузке (см., например, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 3340). Антитела человека также могут продуцироваться в библиотеках фагового дисплея (Hoogenboom, H. R., and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J. D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Также для получения моноклональных антител человека доступны способы Cole et al. и Boerner et al. (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); и Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Моноклональные антитела человека могут быть получены с использованием усовершенствованной иммортализации В-клеток посредством EBV, как описано в Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med.* 10(8):871-5. Термин "антитело человека", как используют в рамках изобретения, также включает такие антитела, которые модифицированы, например, в вариательной области, для обеспечения свойств в соответствии с антителами и фрагментами антител по настоящему изобретению. Как используют в рамках изобретения, термин "вариательная область" (вариательная область легкой цепи (V_L), вариательная область тяжелой цепи (V_H)) означает область каждой пары тяжелой и легкой цепей, которая вовлечена непосредственно в связывание антитела с антигеном.

Как используют в рамках изобретения, термин "вариательная область" (например, вариательная область легкой цепи (V_L), вариательная область тяжелой цепи (V_H)) относится к вариательной области легкой цепи антитела или тяжелой цепи антитела, которая вовлечена непосредственно в связывание антитела с антигеном. Иными словами, термины "V_L" или "VL" и "V_H" или "VH" относятся к вариательной связывающей области легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела, соответственно.

Вариательные связывающие области состоят из обособленных точно определенных подобластей, известных как "определяющие комплементарность области"

(CDR) и "каркасные области" (FR). Термины "определяющая комплементарность область" и "CDR" являются синонимами "гипервариабельной области" или "HVR", и в данной области их относят к непрерывным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые обычно сообщают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, в каждой вариабельной области антитела присутствует три CDR; области VH и VL вместе содержат шесть CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3; LCDR1, LCDR2, LCDR3; также обозначаемые в настоящем описании как CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно). CDR тяжелой и/или легкой цепи могут быть разделены в первичной аминокислотной последовательности каркасными областями, причем каркасная область (FR) представляет собой область в вариабельном домене, которая является менее вариабельной (т.е. в одном антителе относительно другого (например, в одном антителе относительно другого, кодируемого тем же аллелем или аллелями)), чем CDR. Например, цепь (или каждая цепь, соответственно) может состоять из четырех каркасных областей, разделенных тремя CDR. В определенных вариантах осуществления VH антитела содержит четыре FR и три CDR, организованных следующим образом: FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4; и VL антитела содержит четыре FR и три CDR следующим образом: FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4. Как правило, VH и VL вместе образуют антигенсвязывающий центр через их соответствующие CDR, хотя будет понятно, что в некоторых случаях участок связывания может быть образован или может содержать одну, две, три, четыре или пять CDR.

Как используют в рамках изобретения, "вариант" CDR относится к функциональному варианту последовательности CDR, имеющему вплоть до 1-3 аминокислотных замен, делеций или их комбинаций. Последовательности иммуноглобулинов могут быть выровнены согласно схеме нумерации (например, Kabat, EU, International Immunogenetics Information System (IMGT) и Aho), что может позволить аннотацию эквивалентных положений остатков и сравнение различных молекул с использованием инструмента программного обеспечения Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI) (2016, Bioinformatics 15:298-300). Будет понятно, что в определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может содержать всю или часть тяжелой цепи (HC), легкой цепи (LC) или обеих из них. Например, мономер полноразмерного интактного IgG-антитела обычно включает VH, CH1, CH2, CH3, VL и CL. Компоненты Fc дополнительно описаны в настоящем описании.

В рамках настоящего изобретения положение аминокислот CDR определено в соответствии с системной нумерацией IMGT (IMGT: www.imgt.org/; cf. Lefranc, M.-P. et al. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37, D1006-D1012).

В **таблице 1** представлены аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи (VH), вариабельных областей легкой цепи (VL), CDR, тяжелых цепей (HC) и легких цепей (LC) определенных иллюстративных антител согласно

настоящему изобретению.

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
VH HBC34-V35; VH HBC34-V34; VH HBC23-LC40A; VH HBC23-LC40S; VH HBC34-LC40A; VH HBC34-LC40S	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASG RIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQ DGSEKLYVDSVKGRFTISRDNANKNSLF LQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGG MDVWGQGTTVSVSS
VH HBC34v31_LC40A VH HBC34v31_LC40S VH HBC34v32_LC40A VH HBC34v32_LC40S VH HBC34v33_LC40A VH HBC34v32_LC40S	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR IFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVANINQ DGSEKLYVDSVKGRFTISRDNANKNSLF LQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGG MDVWGQGTTVTVSS
VL HBC34-V35	89	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL
VL HBC34-V34	90	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL
HBC34-V23-VL_C40S	110	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLG NKNASWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA DYCYCQTFDSTTVVFGGGTKLTVL
HBC34-V23-VL_C40A	111	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLG NKNAAWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDE ADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLTVL
HBC34-V31-VL_C40S	112	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTDSTTVVFGGGTRLTVL

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
HBC34-V31-VL_C40A	113	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTDSTTVVFGGGTRLTVL
HBC34-V32-VL_C40S	114	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL
HBC34-V32-VL_C40A	115	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL
HBC34-V33-VL_C40S	116	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLG NKNASWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA DYCYCQTFDSTTVVFGGGTKLTVL
HBC34-V33-VL_C40A	117	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLG NKNAAWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDE ADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLTVL
HBC34-VL_C40S	118	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTDSTTVVFGGGTRLTVL
HBC34-VL_C40A	119	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTDSTTVVFGGGTRLTVL
CDRH1 HBC34-V35; CDRH1 HBC34-V34; CDRH1 HBC34-V23_LC40S; CDRH1 HBC34-V23_LC40A;	34	GRIFRSFY

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
CDRH1 HBC34-V31_LC40S; CDRH1 HBC34-V31_LC40A; CDRH1 HBC34-V32_LC40S; CDRH1 HBC34-V32_LC40A; CDRH1 HBC34-V33_LC40S; CDRH1 HBC34-V33_LC40A; CDRH1 HBC34_LC40S; CDRH1 HBC34_LC40A		
CDRH2 HBC34-V35; CDRH2 HBC34-V34; CDRH2 HBC34-V23_LC40S; CDRH2 HBC34-V23_LC40A; CDRH2 HBC34-V31_LC40S; CDRH2 HBC34-V31_LC40A; CDRH2 HBC34-V32_LC40S; CDRH2 HBC34-V32_LC40A; CDRH2 HBC34-V33_LC40S; CDRH2 HBC34-V33_LC40A; CDRH2 HBC34_LC40S; CDRH2 HBC34_LC40A (короткая CDRH2)	35	NQDGSEK
CDRH2 HBC34-V35; CDRH2 HBC34-V34; CDRH2 HBC34-V23_LC40S; CDRH2 HBC34-V23_LC40A; CDRH2 HBC34-V31_LC40S; CDRH2 HBC34-V31_LC40A; CDRH2 HBC34-V32_LC40S; CDRH2 HBC34-V32_LC40A; CDRH2 HBC34-V33_LC40S; CDRH2 HBC34-V33_LC40A; CDRH2 HBC34_LC40S; CDRH2 HBC34_LC40A	66	INQDGSEK

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
(длинная CDRH2)		
CDRH3 HBC34-V35; CDRH3 HBC34-V34; CDRH3 HBC34-V23_LC40S; CDRH3 HBC34-V23_LC40A; CDRH3 HBC34-V31_LC40S; CDRH3 HBC34-V31_LC40A; CDRH3 HBC34-V32_LC40S; CDRH3 HBC34-V32_LC40A; CDRH3 HBC34-V33_LC40S; CDRH3 HBC34-V33_LC40A; CDRH3 HBC34_LC40S; CDRH3 HBC34_LC40A	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1 HBC34-V35; CDRL1 HBC34-V34; CDRL1 HBC34-V23_LC40S; CDRL1 HBC34-V23_LC40A; CDRL1 HBC34-V31_LC40S; CDRL1 HBC34-V31_LC40A; CDRL1 HBC34-V32_LC40S; CDRL1 HBC34-V32_LC40A; CDRL1 HBC34-V33_LC40S; CDRL1 HBC34-V33_LC40A; CDRL1 HBC34_LC40S; CDRL1 HBC34_LC40A	37	KLGKNK
CDRL2 HBC34-V35; CDRL2 HBC34-V34; CDRL2 HBC34-V23_LC40S; CDRL2 HBC34-V23_LC40A; CDRL2 HBC34-V31_LC40S; CDRL2 HBC34-V31_LC40A; CDRL2 HBC34-V32_LC40S; CDRL2 HBC34-V32_LC40A;	38	EVK

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
CDRL2 HBC34-V33_LC40S; CDRL2 HBC34-V33_LC40A; CDRL2 HBC34_LC40S; CDRL2 HBC34_LC40A (короткая CDRL2)		
CDRL2 HBC34-V35; CDRL2 HBC34-V34; CDRL2 HBC34-V23_LC40S; CDRL2 HBC34-V23_LC40A; CDRL2 HBC34-V31_LC40S; CDRL2 HBC34-V31_LC40A; CDRL2 HBC34-V32_LC40S; CDRL2 HBC34-V32_LC40A; CDRL2 HBC34-V33_LC40S; CDRL2 HBC34-V33_LC40A; CDRL2 HBC34_LC40S; CDRL2 HBC34_LC40A (длинная LCDR2)	39	VIYEVKYRP
CDRL3 HBC34-V35; CDRL3 HBC34-V34; CDRL3 HBC34-V23_LC40S; CDRL3 HBC34-V23_LC40A; CDRL3 HBC34-V32_LC40S; CDRL3 HBC34-V32_LC40A; CDRL3 HBC34-V33_LC40S; CDRL3 HBC34-V33_LC40A;	58	QTFDSTTVV
CDRL3 HBC34_LC40S; CDRL3 HBC34_LC40A; CDRL3 HBC34-V31_LC40S; CDRL3 HBC34-V31_LC40A;	40	QTDWSTTVV
HC HBC34-V35-MLNS-GAALIE и HBC34-V34-MLNS-GAALIE (g1M17, 1)	91	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASG RIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQ DGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLF

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
		LQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGG MDVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLH EALHSHYTQKSLSLSPGK
HC HBC34-V35-MLNS и HBC34-V34-MLNS	92	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASG RIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQ DGSEKLYVDSVKGRFTISRDNANKSLF LQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGG MDVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLH EALHSHYTQKSLSLSPGK
LC HBC34-V35	93	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
		GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
LC HBC34-V34	94	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLG NKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA AYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
VH HBC24	95	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGS TFTKYAMSWVRQAPGKGLEWVASISG SVPFGIDTYYADSVKGRFTISRDTSKN TLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDVGV GSYYYYAMDVWGQGTAVTVSS
VL HBC24	96	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQGL SSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYSA STRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYAYSPRWTFGQGTKVEIK
CDRH1 HBC24	97	GSTFTKYA
CDRH2 HBC24	98	ISGSVPGF
CDRH3 HBC24	99	LYYCAKDVGVIGSYYYYYAMDV
CDRL1 HBC24	100	QGLSSSY
CDRL2 HBC24	101	SAS
CDRL3 HBC24	102	QQYAYSPRWT
HC HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35	129	ELQLVESGGGWVQP GGSQLRLSCAASG RIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQ DGSEKLYVDSVKGRFTISRDN AKNSLF

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
(VH-шарнирная область-CH1-CH2-CH3) (дикий тип)		LQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGG MDVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
Fc hIgG1 WT	137	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC HBC34v7, HBC34v23, HBC34v34, HBC34v35, HBC34_C40S, HBC34_C40A, HBC34v23_C40S, HBC34v23_C40A с мутацией GAALIE в Fc hIgG1	138	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASG RIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQ DGSEKLYVDSVKGRFTISRDNANKSLF LQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGG MDVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

Описание последовательности антитела	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
		EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

Фрагменты антител, описанных в настоящем описании, могут быть получены из антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей путем химического восстановления. Альтернативно фрагменты антител могут быть получены путем клонирования и экспрессии части последовательностей тяжелой и легкой цепей. "Фрагменты" антитела включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты. Настоящее изобретение также охватывает одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), происходящие из тяжелых и легких цепей антитела, как описано в настоящем описании, включая, например, scFv, содержащие CDR из антитела согласно настоящему описанию, мономеры и димеры тяжелых и легких цепей, однодоменные антитела на основе тяжелых цепей, однодоменные антитела на основе легких цепей, а также одноцепочечные антитела, в которых переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены пептидным линкером.

В определенных вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент включает очищенное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть мультиспецифическими (например, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и т.п.), и могут быть предоставлены в любом мультиспецифическом формате, как описано в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое или триспецифическое антитело. Форматы биспецифических антител описаны, например, в Spiess et al., Mol. Immunol. 67(2):95 (2015), и Brinkmann and Kontermann, mAbs 9(2):182-212 (2017), и эти биспецифические форматы и способы из получения включены в настоящее описание в качестве ссылок и включают, например, привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы (BiTEs), DART, системы типа "выступы в полостях" (KIH), системы scFv-CH3-KIH, обычные антитела с легкими цепями KIH, TandAb, тройные антитела, минитела TriBi, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂-scFv₂, четырехвалентные HCab, интратела, CrossMab, Fab двойного действия (DAF) (два в одном или четыре в одном), DutaMab, DT-IgG, антитела с заряженными парами, антитела с обменом Fab-плечами, SEEDbody, Triomab, системы

LUZ-Y, Fcab, $\kappa\lambda$ -тела, ортогональные Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody и DVI-IgG (четыре в одном). Биспецифическое или мультиспецифическое антитело может содержать HBV- и/или HDV-специфический связывающий домен по настоящему изобретению в комбинации с другим HBV- и/или HDV-специфическим связывающим доменом по настоящему изобретению, или в комбинации с отличающимся связывающим доменом, который специфически связывается с HBV и/или HDV (например, в том же или отличающемся эпитопе), или со связывающим доменом, который специфически связывается с отличающимся антигеном.

Фрагменты антител по изобретению могут осуществлять одновалентные или мультивалентные взаимодействия и содержаться в различных структурах, как описано выше. Например, молекулы scFv можно синтезировать для получения трехвалентного "триатела" или четырехвалентного "тетратела". Молекулы scFv могут включать домен Fc-области, приводящий к двухвалентным минителам. Кроме того, последовательности по изобретению могут быть компонентом мультиспецифических молекул, в которых последовательности по изобретению нацеливаются на эпитопы по изобретению, а другие области молекулы связываются с другими мишенями. Иллюстративные молекулы включают, но не ограничиваются ими, биспецифические Fab2, триспецифические Fab3, биспецифические scFv и диатела (Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 9: 1126-1136).

В некоторых вариантах осуществления антитело может присутствовать в фармацевтической композиции, которая по существу свободна от других полипептидов, например, где менее 90% (по массе), обычно менее 60% и чаще менее 50% фармацевтической композиции состоят из других полипептидов.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть иммуногенными у человека и/или у не являющихся человеком (или гетерологичных) хозяев; например, у мышей. Например, антитело может иметь идиотоп, который является иммуногенным у не являющихся человеком хозяев, но не у хозяина-человека. Антитела по настоящему изобретению для применения у человека включают антитела, которые, как правило, не являются выделенными от хозяев, таких как мыши, козы, кролики, крысы, не являющиеся приматами млекопитающие и т.п., и в некоторых случаях не являются полученными путем гуманизации или из ксеномышей. В определенных вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению является неиммуногенным или является по существу неиммуногенным у человека.

Также в рамках настоящего изобретения предусматриваются формы вариантов описанных антител, которые модифицированы для снижения известной или потенциальной иммуногенности и/или других потенциальных способностей.

Как используют в рамках изобретения, "нейтрализующее антитело" представляет собой антитело, которое может нейтрализовать, т.е. предотвращать, ингибировать, снижать, тормозить или препятствовать способности патогена иницировать и/или

поддерживать инфекцию у хозяина (например, в организме-хозяине или клетке-хозяине). Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Эти антитела могут использоваться отдельно или в комбинации (например, два или более из описанных в настоящем описании антител в комбинации или антитело по настоящему изобретению в комбинации с другим средством, которое может представлять собой или может не представлять собой антительное средство, включая антитело, которое способно нейтрализовывать инфекцию HBV В и/или D), в качестве профилактических или терапевтических средств при надлежащем составлении в ассоциации с активной вакцинацией.

Как используют в рамках изобретения, "специфически связывает" или "специфичный к" относится к ассоциации или объединению связывающего белка (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) или связывающего домена с молекулой-мишенью с аффинностью или K_a (т.е. равновесная константа ассоциации конкретного связывающего взаимодействия с единицами $1/M$), равной или превышающей $10^5 M^{-1}$ (что равно соотношению константы скорости ассоциации $[K_{on}]$ и константы скорости диссоциации $[K_{off}]$ для этой реакции ассоциации), без значительной ассоциации или объединения с любыми другими молекулами или компонентами в образце. Антитела или связывающие домены можно классифицировать как "высокоаффинные" связывающие белки или связывающие домены или как "низкоаффинные" связывающие белки или связывающие домены. "Высокоаффинные" связывающие белки или связывающие домены относятся к связывающим белкам или связывающим доменам, имеющим K_a по меньшей мере $10^7 M^{-1}$, по меньшей мере $10^8 M^{-1}$, по меньшей мере $10^9 M^{-1}$, по меньшей мере $10^{10} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{11} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{12} M^{-1}$ или по меньшей мере $10^{13} M^{-1}$. "Низкоаффинные" связывающие белки или связывающие домены относятся к связывающим белкам или связывающим доменам, имеющим K_a вплоть до $10^7 M^{-1}$, вплоть до $10^6 M^{-1}$ или вплоть до $10^5 M^{-1}$. Альтернативно аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_d) конкретного связывающего взаимодействия с единицами M (например, от $10^{-5} M$ до $10^{-13} M$). Термины "связывающийся" и "специфически связывающийся" и сходные упоминания не охватывают неспецифическое соединение.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут связываться с областью антигенной петли HBsAg. Оболочка вируса гепатита В, как правило, содержит три "белка оболочки HBV" (также известные как "HBsAg", "поверхностный антиген гепатита В"): S-белок (от "small (малый)", также обозначаемый как S-HBsAg), М-белок (от "middle (средний)", также обозначаемый как М-HBsAg) и L-белок (от "large (большой)", также обозначаемый как L-HBsAg). S-HBsAg, М-HBsAg и L-HBsAg обладают одинаковой С-концевой частью (также обозначаемой как "S-домен", 226 аминокислот), которая соответствует S-белку (S-HBsAg) и которая является ключевой для сборки и инфекционности вируса. S-HBsAg, М-HBsAg и L-HBsAg синтезируются в

эндоплазматической сети (ER), собираются и секретируются в качестве частиц через аппарат Гольджи. S-домен содержит четыре спрогнозированных трансмембранных домена (TM), причем как N-конец, так и C-конец S-домена экспонированы в просвет. Полагают, что оба из трансмембранных доменов TM1 и TM2 являются необходимыми для котрансляционной интеграции белка в ER-мембрану, и трансмембранные домены TM3 и TM4 находятся в C-концевой трети S-домена. "Область антигенной петли" HBsAg находится между спрогнозированными трансмембранными доменами TM3 и TM4 S-домена HBsAg, причем область антигенной петли содержит аминокислоты 101-172 S-домена, который содержит всего 226 аминокислот (Salisse J. and Sureau C., 2009, Journal of Virology 83: 9321-9328). Детерминанта инфекционности находится в области антигенной петли белков оболочки HBV. В частности, остатки 119-125 HBsAg содержат CXXC-мотив, который считается важным для инфекционности HBV и HDV (Jaoude GA, Sureau C, Journal of Virology, 2005;79:10460-6).

Когда положения в аминокислотной последовательности S-домена HbsAg упоминаются в настоящем описании, такие положения указываются относительно аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 3 (показано ниже), или природного или искусственного варианта этой последовательности.

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSP
TSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLLILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTG
PCRTCMTTAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVP
FVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI

(SEQ ID NO: 3; аминокислоты 101-172 показаны подчеркиванием)

Например, выражение "аминокислоты 101-172 S-домена" относится к аминокислотным остаткам в положениях 101-172 полипептида согласно SEQ ID NO: 3. Однако специалисту в данной области понятно, что мутации или изменения (включая, но не ограничиваясь ими, замену, делецию и/или вставку, например в HBsAg, отличающийся генотип или отличающийся мутант HBsAg, как описано в настоящем описании) могут встречаться в природе в аминокислотной последовательности S-домена HBsAg или могут быть внесены искусственным образом в аминокислотную последовательность S-домена HBsAg без влияния на его биологические свойства. Таким образом, как используют в рамках изобретения, термин "S-домен HBsAg" охватывает все такие полипептиды, включая, например, полипептид согласно SEQ ID NO: 3 и его природные или искусственные мутанты. Кроме того, когда в настоящем описании описываются 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 последовательности ее природных или искусственных мутантов. Например, выражение "аминокислотные остатки положений 101-172 S-домена HBsAg" охватывает аминокислотные остатки положений 101-172 SEQ ID NO: 3 и соответствующие фрагменты ее мутантов (природных или искусственных мутантов). Как используют в

рамках изобретения, выражения "соответствующие фрагменты последовательности" и "соответствующие фрагменты" относятся к фрагментам, которые находятся в одинаковых положениях последовательностей, когда последовательности подвергают оптимизированному выравниванию, а именно, последовательности выравнивают с получением наиболее высокого процента идентичности.

М-белок (М-НВsAg) соответствует S-белку, удлиненному на N-концевой домен из 55 аминокислот, называемый "пре-S2". L-белок (L-НВsAg) соответствует М-белку, удлиненному на N-концевой домен из 108 аминокислот, называемый "пре-S1" (генотип D). Домены пре-S1 и пре-S2 L-белка могут присутствовать либо на внутренней поверхности вирусных частиц (на цитоплазматической стороне ER), и полагают, что они играют ключевую роль в сборке вируса, либо на наружной поверхности (на обращенной в просвет стороне ER), доступной для взаимодействия с клетками-мишенями и важной для инфекционности вируса. Более того, поверхностные белки HBV (НВsAg) не только включены в оболочки вирионов, но также могут спонтанно отпочковываться от промежуточных мембран компартментов ER-Гольджи с образованием пустых "субвирусных частиц" (SVP), которые высвобождаются из клетки путем секреции.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с областью антигенной петли НВsAg и способны связываться со всеми из S-НВsAg, М-НВsAg и L-НВsAg.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент снижает инфекционность вируса гепатита В и вируса гепатита дельта.

Для исследования и количественного определения инфекционности вируса (или "нейтрализации") в лаборатории можно использовать стандартный "анализ нейтрализации". Для анализа нейтрализации вирусы животных, как правило, увеличивают в количестве в клетках и/или клеточных линиях. Можно использовать анализ нейтрализации, где культивируемые клетки инкубируют с фиксированным количеством HBV или HDV в присутствии (или в отсутствии) антитела (или антигенсвязывающего фрагмента), подлежащего тестированию. В таком анализе можно использовать уровни поверхностного антигена гепатита В (НВsAg) или антигена е гепатита В (НВеAg), секретируемые в супернатант клеточной культуры, и/или можно оценивать окрашивание НВsAg для обеспечения считывания данных. Например, для HDV можно оценивать иммунофлуоресцентное окрашивание дельта-антигена.

В конкретном варианте осуществления анализа нейтрализации HBV культивируемые клетки, например, клетки НераRG, такие как дифференцированные клетки НераRG, инкубируют с фиксированным количеством HBV в присутствии или в отсутствии подлежащего тестированию антитела. В таком варианте осуществления инкубацию можно проводить, например, в течение 16 часов при 37°C. Эту инкубацию можно проводить в среде (например, дополненной 4% ПЭГ 8000). После инкубации

клетки можно промывать и далее культивировать. Для определения инфекционности вируса уровни поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) и антигена е гепатита В (HBeAg), секретируемого в культуральный супернатант, например, с 7 суток по 11 сутки после инфекции, можно определять посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Кроме того, окрашивание HBsAg можно оценивать посредством иммунофлуоресцентного анализа. В одном варианте осуществления анализа нейтрализации HDV можно использовать по существу тот же анализ, что для HBV, с отличием в том, что сыворотки носителей HDV можно использовать в качестве инфекционного инокулята HDV для дифференцированных клеток HeparG (вместо HBV). Для детекции в качестве считываемых данных можно использовать иммунофлуоресценцию дельта-антигена.

Варианты осуществления антител по изобретению обладают высокой эффективностью нейтрализации (например, *in vitro*). Например, в определенных вариантах осуществления концентрация антитела, как описано в настоящем описании, требуемая для 50% нейтрализации вируса гепатита В (HBV) и вируса гепатита дельта (HDV), составляет, например, приблизительно 10 мкг/мл или менее. В других вариантах осуществления концентрация антитела, требуемая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет приблизительно 5 мкг/мл. В других вариантах осуществления концентрация антитела, как описано в настоящем описании, требуемая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет приблизительно 1 мкг/мл. В других вариантах осуществления концентрация антитела, требуемая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет приблизительно 750 нг/мл. В других вариантах осуществления концентрация антитела, как описано в настоящем описании, требуемая для 50% нейтрализации HBV и HDV (например, *in vitro*), составляет 500 нг/мл или менее. В таких вариантах осуществления концентрация антитела, как описано в настоящем описании, требуемая для 50% нейтрализации HBV и HDV, может быть выбрана из 450 нг/мл или менее, 400 нг/мл или менее, 350 нг/мл или менее, 300 нг/мл или менее, 250 нг/мл или менее, 200 нг/мл или менее, 175 нг/мл или менее, 150 нг/мл или менее, 125 нг/мл или менее, 100 нг/мл или менее, 90 нг/мл или менее, 80 нг/мл или менее, 70 нг/мл или менее, 60 нг/мл или менее или 50 нг/мл или менее.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению, которые могут нейтрализовывать как HBV, так и HDV, являются пригодными для предупреждения и лечения гепатита В и гепатита D. Инфекция HDV, как правило, происходит одновременно с или после инфекции HBV (например, инокуляция HDV в отсутствие HBV не вызывает гепатит D, поскольку для HDV требуется поддержка HBV для его собственной репликации) и гепатит D, как правило, наблюдается у хронических носителей HBV.

Варианты осуществления описанных антител способствуют выведению HBsAg и HBV. В конкретных вариантах осуществления антитела способствуют выведению как HBV, так и субвирусных частиц вируса гепатита В (SVP). Выведение HBsAg или

субвирусных частиц можно оценивать путем измерения уровня HBsAg, например, в образце крови, например, от пациента с гепатитом В. Аналогично, выведение HBV можно оценивать путем измерения уровня HBV, например, в образце крови, например, от пациента с гепатитом В.

В сыворотке пациентов, инфицированных HBV, в дополнение к инфекционным частицам (HBV), как правило, существует избыток (как правило, 1000-100000-кратный) пустых субвирусных частиц (SVP), состоящих только из белков оболочки HBV (HBsAg) в форме относительно меньших сфер и филаментов переменной длины. Было показано, что субвирусные частицы значительно усиливают внутриклеточную репликацию вируса и экспрессию генов HBV (Bruns M. et al. 1998 J Virol 72(2): 1462-1468). Это также имеет значение в контексте инфекционности сывороток, содержащих HBV, поскольку инфекционность зависит не только от количества вирусов, но также и от количества SVP (Bruns M. et al. 1998 J Virol 72(2): 1462-1468). Более того, избыток субвирусных частиц может служить в качестве ловушки путем адсорбции нейтрализующих антител и, таким образом, замедления выведения инфекции. Достижение потери поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в некоторых случаях считается конечной точкой лечения и наиболее близким исходом к излечению хронического гепатита В (CHB).

Варианты осуществления антител по настоящему изобретению могут способствовать выведению HbsAg. В определенных вариантах осуществления антитела способствуют выведению субвирусных частиц вируса гепатита В. В некоторых вариантах осуществления антитела (например, в описанной в настоящем описании фармацевтической композиции) могут использоваться для лечения хронического гепатита В.

В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает HBsAg генотипа, выбранного из генотипов HBsAg: A, B, C, D, E, F, G, H, I и J, или любой их комбинации.

В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 из генотипов HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. Примеры различных генотипов HBsAg включают следующие: номер доступа GenBank J02203 (HBV-D, ayw3); номер доступа GenBank FJ899792.1 (HBV-D, adw2); номер доступа GenBank AM282986 (HBV-A); номер доступа GenBank D23678 (HBV-B1 Japan); номер доступа GenBank AB117758 (HBV-C1 Cambodia); номер доступа GenBank AB205192 (HBV-E Ghana); номер доступа GenBank X69798 (HBV-F4 Brazil); номер доступа GenBank AF160501 (HBV-G USA); номер доступа GenBank AY090454 (HBV-H Nicaragua); номер доступа GenBank AF241409 (HBV-I Vietnam); и номер доступа GenBank AB486012 (HBV-J Borneo). Иллюстративные аминокислотные последовательности области антигенной петли S-домена HBsAg различных генотипов описаны в настоящем описании (например, SEQ ID NO: 5-15).

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающийся фрагмент связывается по меньшей мере с 6 из 10 генотипов HBsAg: A, B, C, D, E, F, G, H,

I и J. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с 8 из 10 генотипов HBsAg: A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающийся фрагмент связывается со всеми 10 из 10 генотипов HBsAg: A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. Для HBV выделяют несколько генотипов в зависимости от геномной последовательности. На сегодняшний день определено восемь хорошо известных генотипов (A-H) генома HBV. Более того, также идентифицировано два других генотипа, I и J (Sunbul M., 2014, World J Gastroenterol 20(18): 5427-5434). Известно, что генотип влияет на прогрессирование заболевания, и определены различия между генотипами в отношении ответа на противовирусное лечение.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению связывается с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 из мутантов HBsAg, имеющих мутации в антигенной петле, причем такой мутант(ы) выбран из одного или нескольких из HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R и HBsAg N146A. Эти мутанты представляют собой встречающиеся в природе мутанты на основе S-домена HBsAg генотипа D, номер доступа Genbank № FJ899792 (SEQ ID NO: 4). Мутантный аминокислотный остаток(и) в каждом из мутантов, указанных в настоящем описании, указан в наименовании.

SEQ ID NO: 4:

MENVTSGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQS
 PTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTGT
GPCRTCTTPAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVP
 FVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCLWVYI

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

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

В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с 12 инфекционными мутантами HbsAg, выбранными из HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R и HBsAg N146A. В некоторых таких вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с 15 инфекционными мутантами HbsAg, выбранными из HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg

M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R и HBsAg N146A. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с каждым из следующих инфекционных мутантов HBsAg: HBsAg Y100C/P120T; HBsAg P120T; HBsAg P120T/S143L; HBsAg C121S; HBsAg R122D; HBsAg R122I; HBsAg T123N; HBsAg Q129H; HBsAg Q129L; HBsAg M133H; HBsAg M133L; HBsAg M133T; HBsAg K141E; HBsAg P142S; HBsAg S143K; HBsAg D144A; HBsAg G145R и HBsAg N146A.

В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическая композиция, содержащая его, снижает сывороточную концентрацию ДНК HBV у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическая композиция, содержащая его, снижает сывороточную концентрацию HBsAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция антитела, содержащая его, снижает сывороточную концентрацию HBsAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическая композиция, содержащая его, снижает сывороточную концентрацию HBcrAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Термин "эпитоп" или "антигенный эпитоп" включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или белковую детерминанту, которая распознается и специфически связывается распознающей ее связывающей молекулой, такой как иммуноглобулин, химерный рецептор антигена или другая связывающая молекула, домен или белок. Эпитопные детерминанты, как правило, содержат химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики, а также определенные зарядовые характеристики.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре аминокислоты в области антигенной петли HbsAg. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает по меньшей мере две аминокислоты, выбранных из аминокислот 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает по меньшей мере три аминокислоты, выбранных из аминокислоты 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg, или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает по меньшей мере четыре аминокислоты, выбранных из аминокислот 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. Как используют в рамках изобретения, положение аминокислот (например, 115-133, 120-133, 120-130) относится к S-домену HBsAg, как описано выше, который присутствует во

всех трех белках оболочки HBV: S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg, причем S-HBsAg, как правило, соответствует S-домену HBsAg.

Термин "образован посредством", как используют в рамках изобретения, в контексте эпитопа, означает, что эпитоп, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть линейным (непрерывным) или конформационным (прерывающимися). Линейный или последовательный эпитоп представляет собой эпитоп, который распознается антителом в соответствии с его линейной последовательностью аминокислот или первичной структурой. Конформационный эпитоп может распознаваться в соответствии с трехмерной формой и структурой белка. Таким образом, если эпитоп представляет собой линейный эпитоп и содержит более одной аминокислоты, находящейся в положениях, выбранных из положений аминокислот 115-133 или из положений аминокислот 120-133 S-домена HBsAg, аминокислоты, содержащиеся в эпитопе, могут находиться в соседних положениях первичной структуры (например, представляют собой последовательно расположенные аминокислоты в аминокислотной последовательности). В случае конформационного эпитопа (3D-структура), аминокислотная последовательность, как правило, формирует 3D-структуру в качестве эпитопа и, таким образом, аминокислоты, формирующие эпитоп, могут находиться или могут не находиться в соседних положениях первичной структуры (т.е. могут представлять собой или могут не представлять собой последовательно расположенные аминокислоты в аминокислотной последовательности).

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

Аминокислоты, с которыми связывается описанное в настоящем описании антитело или антигенсвязывающий фрагмент (т.е. аминокислоты, формирующие эпитоп), которые не находятся в соседних положениях первичной структуры, в некоторых случаях

разделены одной или несколькими аминокислотами, с которыми антитело или антигенсвязывающий фрагмент не связываются. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять аминокислот могут находиться между двумя из аминокислот, не находящимися в соседних положениях в эпитопе.

В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере аминокислоты P120, C121, R122 и C124 S-домена HBsAg. В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 88:

PCRXC

где X представляет собой любую аминокислоту или отсутствие аминокислоты; X представляет собой любую аминокислоту; X представляет собой T, Y, R, S или F; X представляет собой T, Y или R; или X представляет собой T или R.

В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 80:

TGPCRTC

или с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 80.

В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 85:

STTSTGPCRTC

или с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 85.

В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере аминокислоты 145-151 S-домена HBsAg:

GNCTCIP

(SEQ ID NO: 81).

В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 80 и аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 81.

В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную

последовательность согласно SEQ ID NO: 85 и/или аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 87.

Как описано выше, эпитоп, с которым связывается антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, может быть линейным (непрерывным) или конформационным (прерывающимся). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с конформационным эпитопом и в определенных таких вариантах осуществления конформационный эпитоп присутствует только в невосстанавливающих условиях.

В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с линейным эпитопом. В определенных таких вариантах осуществления линейный эпитоп присутствует как в невосстанавливающих, так и в восстанавливающих условиях.

В конкретных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом в антигенной петле HBsAg, образованной аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 1:

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

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

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

В конкретных вариантах осуществления X_1 SEQ ID NO: 1 X_1 представляет собой небольшую аминокислоту. "Небольшая" аминокислота, как используют в рамках изобретения, относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, цистеина, глицина, пролина, серина, треонина и валина. В определенных таких вариантах осуществления X_1 представляет собой пролин, серин или треонин.

В определенных вариантах осуществления для X_2 SEQ ID NO: 1 X_2 представляет собой небольшую аминокислоту. В определенных вариантах осуществления X_2 может быть выбран из цистеина или треонина.

В некоторых вариантах осуществления X_3 SEQ ID NO: 1 представляет собой заряженную аминокислоту или алифатическую аминокислоту. "Заряженная" аминокислота, как используют в рамках изобретения, относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и гистидина. "Алифатическая" аминокислота, как используют в рамках изобретения, относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина, глицина, изолейцина, лейцина и валина. В определенных вариантах осуществления X_3 выбран из аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты или изолейцина.

В некоторых вариантах осуществления X_4 SEQ ID NO: 1 представляет собой небольшую аминокислоту и/или гидрофобную аминокислоту. "Гидрофобная" аминокислота, как используют в рамках изобретения, относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, валина, триптофана, тирозина, метионина, пролина и глицина. В определенных вариантах осуществления X_4 выбран из метионина или треонина.

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

В некоторых вариантах осуществления для X_6 SEQ ID NO: 1 X_6 представляет собой небольшую аминокислоту и/или гидрофобную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления X_6 выбран из треонина, пролина или лейцина.

В некоторых вариантах осуществления X_7 SEQ ID NO: 1 представляет собой полярную аминокислоту или алифатическую аминокислоту. "Полярная" аминокислота, как используют в рамках изобретения, относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты, аспарагина, аргинина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, глутамина, триптофана, тирозина, серина и треонина. В определенных таких вариантах осуществления X_7 представляет собой глутамин, гистидин или лейцин.

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

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

где X_1 представляет собой P, T или S,

X_2 представляет собой C или S,

X_3 представляет собой R, K, D или I,

X_4 представляет собой M или T,

X_5 представляет собой T, A или I,

X_6 представляет собой T, P или L, и

X_7 представляет собой Q, H или L

(SEQ ID NO: 2).

Что касается эпитопов, образованных аминокислотными последовательностями согласно SEQ ID NO: 1 или 2, следует отметить, что термин "образованный посредством", как используют в рамках изобретения, не подразумевает, что описанный связывающий белок обязательно связывает каждую аминокислоту SEQ ID NO: 1 или 2. В частности, связывающий белок может связывать только некоторые из аминокислот SEQ ID NO: 1 или 2, а другие аминокислотные остатки могут выступать в качестве "спейсеров".

В конкретных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с эпитопом в антигенной петле HBsAg, образованным одной или несколькими, двумя или более, тремя или более, или

четырьмя или более аминокислотами аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 5-33, показанных ниже в таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению связываются с областью антигенной петли HBsAg, имеющей аминокислотную последовательность согласно любой одной или нескольким из SEQ ID NO: 5-33, показанными ниже в таблице 3, или с их вариантами последовательностей. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению связывается со всеми вариантами антигенной петли HBsAg, имеющими аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 5-33, показанных ниже в таблице 3.

Таблица 3: Иллюстративные аминокислотные последовательности области антигенной петли S-домена HBsAg (остатки 101-172 S-домена HBsAg - за исключением SEQ ID NO: 16, которая относится к остаткам 100-172 S-домена HBsAg для включения соответствующей мутации) различных генотипов и мутантов, как используют в рамках изобретения.

Наименование	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
J02203 (D, ayw3)	5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
FJ899792 (D, adw2)	6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
AM282986 (A)	7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNS MFPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFAYLWE WASVRFSW
D23678 (B1)	8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSM FPSCCCTKPTDGNCTCIIPSSWAFAYLWEW ASVRFSW
AB117758 (C1)	9	QGMLPVCPLLPSTTTSTGPCKTCTIPAQGTSM FPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFARFLWEWA SVRFSW
AB205192 (E)	10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSM FPSCCCKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWA SARFSW
X69798 (F4)	11	QGMLPVCPLLPSTTTSTGPCKTCTTLAQGTS MFPSCCCKPSDGNCTCIIPSSWALGKYLWE

Наименование	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
		WASARFSW
AF160501 (G)	12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSM YPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFKYLWEW ASVRFSW
AY090454 (H)	13	QGMLPVCPLLPGSTTTTSTGPCKTCTTLAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKYLWE WASARFSW
AF241409 (I)	14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSM YPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFKYLWEW ASARFSW
AB486012 (J)	15	QGMLPVCPLLPGSTTTTSTGPCRTCTTITAQGTSM FPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFKFLWEWA SVRFSW
HBsAg Y100C/P120T	16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg P120T	17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg P120T/S143L	18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPLDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg C121S	19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg R122D	20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg R122I	21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg T123N	22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWE

Наименование	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
		WASARFSW
HBsAg Q129H	23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg Q129L	24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg M133H	25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSH YPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg M133L	26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSL YPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg M133T	27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTST YPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg K141E	28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTEPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWA SARFSW
HBsAg P142S	29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKSSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg S143K	30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPKDGNCTCIPISSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg D144A	31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSAGNCTCIPISSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg G145R	32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDRNCTCIPISSWAFGKFLWEWA SARFSW
HBsAg N146A	33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDGACTCIPISSWAFGKFLWEW

Наименование	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
		ASARFSW

Таким образом, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, пригодным для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, которые содержат: (i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:41 или 67; и (ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно любой из SEQ ID NO: 42; 59; 65; 89, 90 или 110-120 при условии, что аминокислота в положении 40 V_L согласно нумерации IMGT не является цистеином, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

В следующих вариантах осуществления (i) V_H обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:41 или 67; и/или (ii) V_L обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно любой из SEQ ID NO: 42, 59, 65, 89, 90 или 110-120.

В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 40 V_L представляет собой аланин. В других вариантах осуществления аминокислота в положении 40 V_L представляет собой серин. В других вариантах осуществления аминокислота в положении 40 V_L представляет собой глицин.

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, могут содержать последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 согласно SEQ ID NO: (i) 34-36, 37, 38 и 40, соответственно; (ii) 34, 66, 36, 37, 38 и 40, соответственно; (iii) 34-36, 37, 39 и 40, соответственно; (iv) 34, 66, 36, 37, 39 и 40, соответственно; (v) 34-36, 37, 38 и 58, соответственно; (vi) 34, 66, 36, 37, 38 и 58, соответственно; (vii) 34-36, 37, 39 и 58, соответственно; или (viii) 34, 66, 36, 37, 39 и 58, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления V_L антитела или антигенсвязывающего фрагмента, пригодного для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:89. В некоторых вариантах осуществления V_L антитела или антигенсвязывающего фрагмента, пригодная для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:90. В других вариантах осуществления V_L антитела или антигенсвязывающего фрагмента, пригодная для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 109-120. В определенных вариантах осуществления V_H содержит или состоит из

аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41. В других вариантах осуществления V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:67.

В конкретных вариантах осуществления V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41 и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:89. В других вариантах осуществления V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41 и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:90. В определенных вариантах осуществления V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41 и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO:109-120. В других вариантах осуществления V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:67 и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO:109-120.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, пригодным для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, которые содержат: (i) переменную область тяжелой цепи (V_H), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:95; и (ii) переменную область легкой цепи (V_L), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:96, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

В следующих вариантах осуществления (i) V_H обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:95; и/или (ii) V_L обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:96. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 согласно SEQ ID NO:97-102, соответственно.

В конкретных вариантах осуществления V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:95; и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:96.

Fc-часть

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержат Fc-часть. В определенных вариантах осуществления Fc-часть может происходить из человека, например, из IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4 человека. В конкретных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать Fc-часть, происходящую из IgG1 человека.

Как используют в рамках изобретения, термин "Fc-часть" относится к

последовательности, содержащей или происходящей из части тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирной области непосредственно выше участка расщепления папаином (например, остаток 216 в нативном IgG, принимая за первый остаток константной области тяжелой цепи остаток 114) и оканчивающейся на С-конце тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, Fc-часть может представлять собой полную Fc-часть или ее часть (например, домен). В определенных вариантах осуществления полная Fc-часть содержит шарнирный домен, CH2-домен и CH3-домен (например, положения аминокислот согласно EU 216-446). Иногда непосредственно на С-конце Fc-части присутствует дополнительный остаток лизина (K), однако он часто отщепляется от зрелого антитела.

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

В некоторых вариантах осуществления Fc-часть содержит по меньшей мере одно из следующих: шарнирный (например, верхний, средний и/или нижний шарнирный) домен, CH2-домен, CH3-домен или его вариант, часть или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-часть содержит по меньшей мере шарнирный домен, CH2-домен или CH3-домен. В следующих вариантах осуществления Fc-часть представляет собой полную Fc-часть. Аминокислотная последовательность иллюстративной Fc-части IgG1-изотипа человека приведена в SEQ ID NO:137. Fc-часть также может содержать одну или несколько аминокислотных инсерций, делеций или замен относительно встречающейся в природе Fc-части. Например, по меньшей мере один из шарнирного домена, CH2-домена или CH3-домена, или его части может быть удален. Например, Fc-часть может содержать или состоять из: (i) шарнирного домена (или его части), слитого с CH2-доменом (или его частью), (ii) шарнирного домена (или его части), слитого с CH3-доменом (или его частью), (iii) CH2-домена (или его части), слитого с CH3-доменом (или его частью), (iv) шарнирного домена (или его части), (v) CH2-домена (или его части), или (vi) CH3-домена или его части.

Fc-часть по настоящему изобретению может быть модифицирована так, чтобы ее аминокислотная последовательность отличалась от полной Fc-части встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина при сохранении или усилении по меньшей мере одной желаемой функции, сообщаемой встречающейся в природе Fc-частью. Такие функции включают, например, связывание Fc-рецептора (FcR), модулирование времени полужизни антитела (например, посредством связывания с FcRn), функцию ADCC, связывание белка А, связывание белка G и связывание комплемента. Части встречающихся в природе Fc-частей, которые вовлечены в такие функции, описаны в соответствующей литературе.

Например, для активации каскада комплемента комплекс белка C1q может связываться по меньшей мере с двумя молекулами IgG1 или одной молекулой IgM, когда молекула(ы) иммуноглобулина связана с антигенной мишенью (Ward, E. S., and Ghetie, V., *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94). Burton, D. R. описал (*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206), что область тяжелой цепи, содержащая аминокислотные остатки 318-337, вовлечена в фиксацию комплемента. Duncan, A. R. и Winter, G. (*Nature* 332 (1988) 738-740), используя сайт-направленный мутагенез, сообщили, что Glu318, Lys320 и Lys322 формируют участок связывания с C1q. Роль остатков Glu318, Lys320 и Lys 322 в связывании C1q была подтверждена на основе способности короткого синтетического пептида, содержащего эти остатки, ингибировать опосредуемый комплементом лизис.

Например, связывание FcR может опосредоваться взаимодействием Fc-части (антитела) с Fc-рецепторами (FcR), которые представляют собой специализированные рецепторы клеточной поверхности на клетках, включающих кроветворные клетки. Fc-рецепторы принадлежат суперсемейству иммуноглобулинов, и показано, что они опосредуют как удаление покрытых антителом патогенов посредством фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, посредством антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичности (ADCC; Van de Winkel, J. G., and Anderson, C. L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). FcR определяются их специфичностью в отношении классов иммуноглобулинов; Fc-рецепторы для IgG-антител обозначают как FcγR, для IgE как FcεR, для IgA как FcαR и т.д., и неонатальные Fc-рецепторы обозначают как FcRn. Связывание Fc-рецептора описано, например, в Ravetch, J. V. and Kinet, J. P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P. J., et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M., et al., *J Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341 и Gessner, J. E., et al., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

Связывание рецепторов Fc-доменом нативных IgG-антител (FcγR) запускает широкое множество эффекторных функций, включая фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность и высвобождение медиаторов воспаления, а также выведение иммунных комплексов и регуляцию продуцирования антител. В рамках настоящего изобретения предусматриваются Fc-части, обеспечивающие связывание рецепторов (например, FcγR). У человека на сегодняшний день охарактеризовано три класса FcγR, которые представляют собой: (i) FcγRI (CD64), который связывает мономерный IgG с высокой аффинностью и экспрессируется на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и эозинофилах; (ii) FcγRII (CD32), который связывает находящийся в комплексе IgG с аффинностью от средней до низкой, в частности, на лейкоцитах, предположительно является центральным участником антитело-опосредуемого иммунитета и может быть подразделен на FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIC, которые выполняют разные функции в иммунной системе, но связываются со сходной низкой аффинностью с IgG-Fc, и эктодомены этих рецепторов являются в высокой степени гомологичными; и (iii) FcγRIII (CD16), который связывает IgG с аффинностью от средней до низкой и обнаружен в двух

формах: FcγRIIA, который встречается на NK-клетках, макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и Т-клетках и предположительно опосредует ADCC; и FcγRIIB, который на высоком уровне экспрессируется на нейтрофилах.

FcγRIIA встречается на многих клетках, вовлеченных в уничтожение (например, макрофаги, моноциты, нейтрофилы) и, по-видимому, способен активировать процесс уничтожения. FcγRIIB, по-видимому, играет роль в ингибиторных процессах и встречается на В-клетках, макрофагах и на тучных клетках и эозинофилах. Важно, что было показано, что 75% всего FcγRIIB встречается в печени (Ganesan, L. P. et al., 2012: "FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes", *Journal of Immunology* 189: 4981-4988). FcγRIIB широко экспрессируется на синусоидальном эндотелии печени, называемом LSEC, и в купферовых клетках в печени и LSEC являются основным центром выведения небольших иммунных комплексов (Ganesan, L. P. et al., 2012: FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Immunology* 189: 4981-4988).

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, и их антигенсвязывающие фрагменты содержат Fc-часть для связывания с FcγRIIb, в частности, Fc-область, как например, антитела IgG-типа. Более того, является возможным конструирование Fc-части для усиления связывания FcγRIIB путем внесения мутаций S267E и L328F, как описано Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933. Таким образом, может быть усилено выведение иммунных комплексов (Chu, S., et al., 2014: Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xma7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor FcγRIIb. *Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts*). В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты содержат модифицированную Fc-часть с мутациями S267E и L328F, в частности, как описано Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933.

На В-клетках, FcγRIIB, по-видимому, функционирует, подавляя дальнейшее продуцирование иммуноглобулинов и переключение изотипов, например, на IgE-класс. На макрофагах FcγRIIB, как полагают, ингибирует фагоцитоз, опосредуемый FcγRIIA. На эозинофилах и тучных клетках b-форма может помочь подавить активацию этих клеток через связывание IgE с его отдельным рецептором.

Что касается связывания FcγRI, модификация в нативном IgG по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329 снижает связывание с FcγRI. Остатки IgG2 в положениях 233-236, которые встроены для замены соответствующих положений IgG1 и IgG4, снижают связывание IgG1 и IgG4 с Fcγ RI в 10^3 раз и устраняют ответ моноцитов человека на сенсibilизированные антителами эритроциты (Armour, K.

L., et al. *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624).

Что касается связывания FcγRII, сниженное связывание FcγRIIA встречается, например, в случае мутации IgG по меньшей мере в одном из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 и K414.

Две аллельных формы FcγRIIA человек представляют собой вариант "H131", который связывается с Fc IgG1 с высокой аффинностью, и вариант "R131", который связывается с Fc IgG1 с низкой аффинностью. См., например, Bruhns et al., *Blood* 113:3716-3725 (2009).

Что касается связывания FcγRIII, сниженное связывание с Fcγ RIIA встречается, например, в случае мутации по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 и D376. Картирование участков связывания на IgG1 человека для Fc-рецепторов, вышеупомянутые участки мутации и способы определения связывания с FcγRI и FcγRIIA описаны в Shields, R. L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604.

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

Что касается связывания с FcγRII, две области нативного Fc IgG, по-видимому, вовлечены во взаимодействия между FcγRII и IgG, а именно (i) нижняя шарнирная область Fc IgG, в частности, аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, нумерация EU), и (ii) соседняя область с CH2-доменом Fc IgG, в частности, петля, и цепи в верхнем CH2-домене, соседние с нижней шарнирной областью, например, в области P331 (Wines, B.D., et al., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313-5318). Более того, FcγRI, по-видимому, связывается с тем же участком на Fc IgG, в то время как FcRn и белок A связываются с отличающимся участком на Fc IgG, который, по-видимому, находится на поверхности контакта CH2-CH3 (Wines, B.D., et al., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313-5318).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержат Fc-часть, содержащую мутации, которые повышают аффинность связывания Fc-части с (т.е. одним или несколькими) Fcγ-рецептором, таким как FcγRIIA человека, FcγRIIIa человека или оба из них (например, по сравнению с эталонной Fc-частью или антителом, содержащим ее, которые не содержат такую мутацию(и)). См., например, Delillo and Ravetch, *Cell* 161(5):1035-1045 (2015) и Ahmed et al., *J. Struc. Biol.* 194(1):78 (2016), Fc-мутации и способы которых включены в настоящее описание в качестве ссылок. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержат Fc-часть, содержащую мутацию, выбранную из G236A; S239D; A330L и I332E; или комбинацию, содержащую их; например, S239D/I332E; S239D/A330L/I332E; G236A/S239D/I332E;

G236A/A330L/I332E (также обозначаемую в настоящем описании как "GAALIE"); или G236A/S239D/A330L/I332E.

В определенных вариантах осуществления Fc-часть может содержать или состоять по меньшей мере из фрагмента Fc-части, который вовлечен в связывание с FcRn (например, с FcRn человека). В определенных вариантах осуществления Fc-часть содержит одну или несколько модификаций аминокислот, которые повышают аффинность связывания с FcRn и в некоторых вариантах осуществления тем самым продлевают время полужизни *in vivo* молекулы, содержащей Fc-часть (например, по сравнению с эталонной Fc-частью или антителом, которое не содержит модификацию(и)). В определенных вариантах осуществления Fc-часть содержит или происходит из Fc IgG и мутация, продлевающая время полужизни, включает любую одну или несколько из: M428L; N434S; N434H; N434A; N434S; M252Y; S254T; T256E; T250Q; P257I Q311I; D376V; T307A; E380A (нумерация EU). В определенных вариантах осуществления мутация, продлевающая время полужизни, включает M428L/N434S (также обозначаемая как "MLNS"). В определенных вариантах осуществления мутация, продлевающая время полужизни, включает M252Y/S254T/T256E. В определенных вариантах осуществления мутация, продлевающая время полужизни, включает T250Q/M428L. В определенных вариантах осуществления мутация, продлевающая время полужизни, включает P257I/Q311I. В определенных вариантах осуществления мутация, продлевающая время полужизни, включает P257I/N434H. В определенных вариантах осуществления мутация, продлевающая время полужизни, включает D376V/N434H. В определенных вариантах осуществления мутация, продлевающая время полужизни, включает T307A/E380A/N434A.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, которая содержит мутации с заменой M428L/N434S. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок включает Fc-часть, которая содержит мутации с заменой G236A/A330L/I332E. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, которая содержит мутацию G236A, мутацию A330L и мутацию I332E (GAALIE), и не содержит мутацию S239D. В некоторых вариантах осуществления Fc-часть содержит Ser в положении 239. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, которая содержит мутации с заменами: M428L/N434S и G236A/A330L/I332E. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, которая содержит мутации с заменами: M428L/N434S и G236A/S239D/A330L/I332E. В

определенных следующих вариантах осуществления Fc-часть не содержит никаких мутаций с заменами за исключением M428L/N434S и G236A/S239D/A330L/I332E.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержат: CDR, и/или вариабельный домен, и/или тяжелую цепь, и/или легкую цепь согласно любому из иллюстративных антител против HBV, описанных в настоящем описании и/или в публикации PCT № WO 2017/060504 (включая антитела HBC34, HBC34v7, HBC34v23, HBC34v31, HBC34v32, HBC34v33, HBC34v34, HBC34v35 (включая описанные в настоящем описании варианты антител HBC, которые содержат мутацию с заменой в положении 40 легкой цепи (например, замена нативного остатка цистеина на аланин, серин и т.п.)); и Fc-часть, содержащую мутацию G236A, мутацию A330L и мутацию I332E (GAALIE), где Fc-часть необязательно дополнительно содержит мутацию M428L/N434S (MLNS). В определенных вариантах осуществления Fc-часть не содержит S239D.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержат: аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO:34, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO:35 или 66, аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO:36, аминокислотную последовательность CDRL1 согласно SEQ ID NO:37, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно SEQ ID NO:38 или 39 и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO:58 или 40; и Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE. В определенных вариантах осуществления Fc-часть дополнительно содержит мутацию MLNS.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержат: аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (VH) согласно любой из SEQ ID NO:41 или 67 и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи (VL) согласно любой из SEQ ID NO:42, 59, 65, 89, 90 и 111-120; и Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE. В определенных вариантах осуществления Fc-часть дополнительно включает мутацию MLNS.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:138 или 91.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, содержат: аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO:97, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID

NO:98, аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO:99, аминокислотную последовательность CDRL1 согласно SEQ ID NO:100, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно SEQ ID NO:100, и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO:102; и Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE. В определенных вариантах осуществления Fc-часть дополнительно содержит мутацию MLNS.

В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления связывающий белок по настоящему изобретению включает Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и обладает усиленным связыванием с FcγRIIa человека и/или FcγRIIIa человека по сравнению с эталонным полипептидом (т.е. полипептид, который может представлять собой связывающий белок, который включает Fc-часть, которая не содержит мутацию GAALIE).

В определенных вариантах осуществления эталонный полипептид включает Fc-часть, которая представляет собой Fc-часть дикого типа или представляет собой Fc-часть, которая содержит одну или несколько мутаций с заменами (или инсерцию или делецию), при условии, что мутация с заменой не является GAALIE. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают антитело HBC34v35 с мутациями GAALIE и MLNS, и эталонный полипептид представляет собой HBC34v35 (включая Fc-часть дикого типа того же изотипа, что и Fc-часть антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, пригодного для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению). В определенных вариантах осуществления эталонный полипептид не содержит мутацию с заменой, о которой известно или предполагают, что она влияет на связывание с FcγRIIa человека и/или FcγRIIIa человека.

Связывание между полипептидами, такое как связывание между Fc-частью (или связывающим белком, содержащим ее) и рецептором Fcγ человека, таким как FcγRIIa человека, FcγRIIIa человека или FcγRIIb человека, или белком комплемента, таким как C1q, может быть определено или обнаружено с использованием способов, известных в данной области. Например, можно проводить анализ посредством интерферометрии в биослое (BLI) с использованием устройства Octet® RED96 (ForteBio, Fremont, California, США) в соответствии с инструкциями изготовителя для определения ассоциации и диссоциации в реальном времени между первым представляющим интерес полипептидом (например, HBC34v35, содержащий мутацию GAALIE) и вторым представляющим интерес полипептидом (например, FcγRIIa (H131), FcγRIIa (R131), FcγRIIIa (F158), FcγRIIIa (V158) или FcγRIIb), который иммобилизован на сенсорной подложке.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и имеют усиленное связывание с FcγRIIa человека (H131), FcγRIIa человека (R131), FcγRIIIa

человека (F158), FcγRIIIA человека (V158) или любой их комбинацией по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-часть, которая не содержит мутацию GAALIE. В определенных вариантах осуществления усиленное связывание определяют по повышению (например, одно или несколько из: более высокого сигнала пика; более высокой скорости ассоциации; более низкой скорости диссоциации или большей площади под кривой) сдвига сигнала против эталонного связывающего белка в анализе BLI. В определенных вариантах осуществления анализ BLI включает использование устройства Octet^(R) RED96 (ForteBio, Fremont, California, США). В следующих вариантах осуществления анализ BLI включает меченный FcγR человека, иммобилизованный на датчике с антителом против пента-метки и подвергнутый воздействию связывающего белка. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок включает Fab IgG и анализ BLI дополнительно включает воздействие на иммобилизованный FcγR человека антитела или антигенсвязывающего фрагмента в присутствии связывающего фрагмента против Fab IgG для связывания связывающих белков через Fab-фрагмент.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и имеют усиленное связывание с FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (R131), FcγRIIA человека (F158) и/или FcγRIIA человека (V158) по сравнению с эталонным полипептидом, где усиленное связывание включает сдвиг сигнала (нанометры) в анализе BLI, в 1,5, 2, 2,5, 3 или более раз превышающий сдвиг сигнала, наблюдаемый с использованием эталонного антитела.

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE и имеют усиленное связывание с FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (R131), FcγRIIA человека (F158) и FcγRIIA человека (V158) по сравнению с эталонным полипептидом.

В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и имеют сниженное связывание с FcγRIIB человека по сравнению с эталонным полипептидом. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и не связываются с FcγRIIB человека при определении, например, по отсутствию статистически значимого сдвига сигнала относительно исходного уровня в анализе BLI.

В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, содержащую

мутацию GAALIE, и имеют сниженное связывание с C1q человека (белок комплемента) по сравнению с эталонным полипептидом. В определенных вариантах осуществления связывающий белок включает Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и не связывается с C1q человека при определении по отсутствию статистически значимого сдвига сигнала относительно исходного уровня в анализе BLI.

В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пригодные для применения в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению, включают Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и активируют FcγRIIA человека, FcγRIIA человека или оба из них, в большей степени, чем эталонный полипептид (т.е. полипептид, который может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые включают Fc-часть, которая не содержит мутацию GAALIE). В определенных вариантах осуществления эталонный полипептид включает Fc-часть, которая представляет собой Fc-часть дикого типа или которая содержит одну или несколько мутаций с заменами при условии, что мутация с заменой не является GAALIE. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает антитело HBC34v35 с мутацией GAALIE (и необязательно другими мутациями с заменой, например, такими как MLNS) и эталонный полипептид представляет собой HBC34v35 с Fc-частью дикого типа.

Активация FcγR человека может быть определена или обнаружена с использованием способов, известных в данной области. Например, хорошо валидированный коммерчески доступный анализ с биорепортером вовлекает инкубацию HBsAg-специфического связывающего белка с рекомбинантным HBsAg (Engerix B, GlaxoSmithKline) в присутствии эффекторных клеток Jurkat (Promega; каталожный номер: G9798), стабильно экспрессирующих (i) представляющий интерес FcγR и (ii) репортер люциферазы светлячка под контролем элемента ответа NFAT. Связывание Fc с экспрессируемым на клеточной поверхности FcγR запускает NFAT-опосредуемую экспрессию репортерного гена люциферазы. Затем измеряют люминесценцию посредством люминометра (например, Bio-Tek) с использованием реагента для анализа с люциферазой Bio-GloTM (Promega) в соответствии с инструкциями изготовителя. Активацию выражают в качестве среднего значения относительных единиц люминесценции (RLU) относительно фонового уровня по следующей формуле: (RLU для концентрации [x] связывающего белка (например, mAb) - RLU фонового уровня).

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, которая активирует FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (F158) и/или FcγRIIA человека (V158) в большей степени, чем эталонный полипептид. В определенных вариантах осуществления более высокая степень активации относится к более высокой пиковой люминесценции и/или более высокой площади под кривой люминесценции при определении с использованием анализа с люминесцентным биорепортером, как описано в настоящем описании. В

определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и активирует FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (R131) и FcγRIIA человека (F158) в большей степени, чем эталонный полипептид, где более высокая степень активации может отображаться пиковым значением RLU, которое в 1,5, 2, 2,5, 3 или более раз превышает пиковое значение RLU, наблюдаемое с использованием эталонного полипептида.

В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, которая не активирует FcγRIIB человека при определении по отсутствию статистически значимой и/или поддающейся измерению величины RLU в анализе с люминесцентным биорепортером, как описано выше.

В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE, и активирует натуральные киллеры (NK) человека в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный полипептид. В определенных вариантах осуществления активацию NK-клеток определяют по экспрессии CD107a (например, посредством проточной цитометрии). В определенных вариантах осуществления NK-клетка включает клетку, которая имеет гомозиготный V158/V158, гомозиготный F158/F158 или гетерозиготный V158/F158 генотип FcγRIIA.

Будет понятно, что любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие Fc-часть, содержащую мутацию GAALIE согласно настоящему изобретению, могут выполнять или обладать любым одним или несколькими из признаков, описанных в настоящем описании; например, усиленным связыванием с FcγRIIA человека и/или FcγRIIA человека по сравнению с эталонным полипептидом; сниженным связыванием с FcγRIIB человека по сравнению с эталонным полипептидом (и/или отсутствием связывания с FcγRIIB человека); сниженным связыванием с C1q человека по сравнению с эталонным полипептидом (и/или отсутствием связывания с C1q человека); активацией FcγRIIA, FcγRIIA человека, или обоих из них в большей степени, чем у эталонного полипептида; отсутствием активации FcγRIIB человека; и/или активацией натуральных киллеров (NK) человека в присутствии HBsAg в большей степени, чем у эталонного полипептида (например, антитело, которое является специфичным в отношении HBsAg и включает Fc-часть, которая не содержит мутацию GAALIE).

Альтернативно или дополнительно, Fc-часть антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению может содержать по меньшей мере фрагмент, известный в данной области тем, что он необходим для связывания с белком А; и/или Fc-часть антитела по изобретению содержит по меньшей мере фрагмент молекулы Fc, известный в данной области тем, что он необходим для связывания белка G. В некоторых вариантах осуществления сохраненная функция включает выведение HBsAg и HBVg. Таким образом, в определенных вариантах осуществления Fc-часть содержит по

меньшей мере фрагмент, известный в данной области тем, что он необходим для связывания FcγR. Как описано выше, Fc-часть, таким образом, может по меньшей мере содержать (i) нижнюю шарнирную область нативного Fc IgG, в частности, аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, нумерация EU), и (ii) соседнюю область с CH2-доменом Fc IgG, в частности, петлю, и цепи в верхнем CH2-доме, соседние с нижней шарнирной областью, например, в области P331, например, область из по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательно расположенных аминокислот в верхнем домене CH2 нативного Fc IgG вокруг P331, например, между аминокислотами 320 и 340 (нумерация EU) нативного Fc IgG.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержат Fc-область. Как используют в рамках изобретения, термин "Fc-область" относится к части иммуноглобулина, образованной двумя или более частями Fc тяжелых цепей антитела. Например, Fc-область может представлять собой мономерную или "одноцепочечную" Fc-область (т.е. область scFc). Одноцепочечные Fc-области состоят из Fc-частей, связанных в пределах одной полипептидной цепи (например, кодируемых одной непрерывной последовательностью нуклеиновой кислоты). Иллюстративные scFc-области описаны в WO 2008/143954 A2 и включены в настоящее описание в качестве ссылок. Fc-область может представлять собой или может включать димерную Fc-область. "Димерная Fc-область" или "dcFc" относится к димеру, образованному Fc-частями двух отдельных тяжелых цепей иммуноглобулинов. Димерная Fc-область может представлять собой гомодимер двух идентичных Fc-частей (например, Fc-область встречающегося в природе иммуноглобулина) или гетеродимер двух неидентичных Fc-частей (например, один мономер Fc димерной Fc-области содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты (например, замену, делецию, инсерцию или химическую модификацию), которая не присутствует в другом мономере Fc, или один мономер Fc может быть укорочен по сравнению с другим).

Конкретные варианты осуществления включают антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие тяжелую цепь (например, VH-шарнирная область-CH1-CH2-CH3) согласно SEQ ID NO:91 или SEQ ID NO:92, и антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие легкую цепь (т.е. VL-CL) согласно SEQ ID NO:93 или SEQ ID NO:94. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь согласно SEQ ID NO:91 и легкую цепь согласно SEQ ID NO:93. В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь согласно SEQ ID NO:92 и легкую цепь согласно SEQ ID NO:94. В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь согласно SEQ ID NO:91 и легкую цепь согласно SEQ ID NO:94. В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь согласно SEQ ID NO:92 и легкую цепь согласно SEQ ID NO:93. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:129. В некоторых вариантах

осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:138. Эти последовательности приведены в списке последовательностей.

Описанные в настоящем описании Fc-части могут содержать последовательности Fc или их области отличающегося класса и/или подкласса. Например, Fc-части могут происходить из иммуноглобулина (например, иммуноглобулин человека) подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или из любой их комбинации. В определенных вариантах осуществления Fc-части Fc-области относятся к одному и тому же классу или подклассу. Однако Fc-область (или одна или несколько Fc-частей Fc-области) также может быть химерной, причем химерная Fc-область может содержать Fc-части, происходящие из отличающихся классов и/или подклассов иммуноглобулинов. Например, по меньшей мере две из Fc-частей димерной или одноцепочечной Fc-области могут быть из отличающихся классов и/или подклассов иммуноглобулинов. В определенных вариантах осуществления димерная Fc-область может содержать последовательности из двух или более различных изотипов или подклассов; например, SEEDbody ("сконструированные домены с заменой цепей"), см. Davis et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 23(4):195 (2010).

Дополнительно или альтернативно, химерные Fc-области могут содержать одну или несколько химерных Fc-частей. Например, химерная Fc-область или часть может содержать одну или несколько частей, происходящих из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3), в то время как остальная часть Fc-области или части принадлежит отличающемуся подклассу. Например, Fc-область или часть полипептида Fc может содержать домен CH2 и/или CH3, происходящий из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG4) и шарнирную область из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG3). Например, Fc-область или часть может содержать шарнирную область и/или CH2-домен, происходящие из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG4) и CH3-домен из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Например, химерная Fc-область может содержать Fc-часть (например, полную Fc-часть) из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG4) и Fc-часть из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Например, Fc-область или часть может содержать домен CH2 из иммуноглобулина IgG4 и домен CH3 из иммуноглобулина IgG1. Например, Fc-область или часть может содержать домен CH1 и домен CH2 из молекулы IgG4 и домен CH3 из молекулы IgG1. Например, Fc-область или часть может содержать часть CH2-домена из конкретного подкласса антител, например, положения EU 292-340 домена CH2. Например, Fc-область или часть может содержать аминокислоты положений 292-340 CH2, происходящие из части IgG4, и остальную часть CH2, происходящую из части IgG1 (альтернативно 292-340 CH2 могут происходить из части IgG1 и оставшаяся часть CH2 происходит из части IgG4).

Также будет понятно, что любое антитело, антигенсвязывающий фрагмент или Fc-область или часть по настоящему изобретению могут быть любого аллотипа и/или

гаплотипа. Например, аллотипы иммуноглобулина G человека включают аллотипы, описанные Jefferis and LeFranc, mAbs 1(4):1-7 (2009), и эти аллотипы (включая G1m (1(a); 2(x); 3(f); и 17(z)); G2m (23(n)); G3m (21(g1); 28(g5); 11(b0); 5(b2); 13(b3); 14(b4); 10(b5); 15(s); 16(t); 6(c3); 24(c5); 26(u); и 27(v)); A2m (1 и 2); и Km (1; 2; и 3) и гаплотипы, и соответствующие им аминокислотные последовательности, и их комбинации, включены в настоящее описание в качестве ссылок. В определенных вариантах осуществления антитела, антигенсвязывающий фрагмент или Fc-область или часть по настоящему изобретению содержит аллотип IgG1 g1m17, k1.

Более того, Fc-область или часть может (дополнительно или альтернативно), например, содержать химерную шарнирную область. Например, химерная шарнирная область может происходить, например, частично из молекулы IgG1, IgG2 или IgG4 (например, верхняя и нижняя последовательность средней шарнирной области) и частично из молекулы IgG3 (например, последовательность средней шарнирной области). В другом примере Fc-область или часть может содержать химерную шарнирную область, происходящую, частично, из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4. В другом примере химерная шарнирная область может содержать верхний и нижний домены из молекулы IgG4 и средний шарнирный домен из молекулы IgG1. Такая химерная шарнирная область может быть получена, например, путем внесения замены на пролин (Ser228Pro) в положении EU 228 в среднем шарнирном домене шарнирной области IgG4. В другом варианте осуществления химерная шарнирная область может содержать аминокислоты в положениях EU 233-236 из IgG2-антитела и/или мутацию Ser228Pro, где остальные аминокислоты шарнирной области происходят из IgG4-антитела (например, химерная шарнирная область последовательности ESKYGPPCPPCPAPPVAGP). Дополнительные химерные шарнирные области, которые могут использоваться в Fc-части антитела согласно настоящему изобретению, описаны в US 2005/0163783 A1.

В некоторых вариантах осуществления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем описании, Fc-часть или Fc-область содержит или состоит из аминокислотной последовательности, происходящей из последовательности иммуноглобулина человека (например, из Fc-области или Fc-части молекулы IgG человека). Однако полипептиды могут содержать одну или несколько аминокислот из другого вида млекопитающих. Например, в рассматриваемые полипептиды может быть включена Fc-часть примата или участок связывания примата. Альтернативно в Fc-части или в Fc-области может присутствовать одна или несколько аминокислот мыши.

Молекула нуклеиновой кислоты

В другом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению.

В таблице 4 представлены иллюстративные кодирующие V_H, V_L, C_H, C_L, C_H и C_L нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению:

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
V _H HBC34-V7, HBC34-V35 и HBC34-V34 (кодон- оптимизированная)	103	gagctgcagctggtggagtccggcggcggtgggtgcagcctggc ggctcccagaggctgagctgtgccgttctggcaggatctccggctc ttttacatgtcttgggtgcggcaggctccaggcaagggcctggagtgg gtggctaccatcaaccaggacggctccgagaagctgtatgtggatag cgtgaagggcagattcacaatctctcgacacaacccaagaactccc tgtttctgcagatgaacaatctgagggtggaggataccgccgtgtact attgcgccgcttggcttggaatagcggcgcatggacgtgtgggga cagggcaccaccgtgtccgtgtccagc
V _L HBC34-V34 (кодон- оптимизированная)	104	agctacgagctgacacagcccccttccgtgtccgtgtcccctggaca gaccgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaac gtgtcctggtttcagcataagcctggccagtcccccgctgtgtcatct acgaggtgaagtatagggccagcggcatccctgagcggttctctggc tccaacagcggcaatacagccaccctgacaatctctggcacacaggc tatggacgagggccgcttatttctgccagaccttgattccaccacagtg gtgttcggcgggcgccaccagactgacagtgtg
V _L HBC34-V35 (кодон- оптимизированная)	105	agctacgagctgacacagcccccttccgtgtccgtgtcccctggaca gaccgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaac gtggcctggtttcagcataagcctggccagtcccccgctgtgtcatct acgaggtgaagtatagggccagcggcatccctgagcggttctctggc tccaacagcggcaatacagccaccctgacaatctctggcacacaggc tatggacgagggccgcttatttctgccagaccttgattccaccacagtg gtgttcggcgggcgccaccagactgacagtgtg
V _L HBC34-V7 (кодон- оптимизированная)	110	agctacgagctgacacagcccccttccgtgtccgtgtcccctggaca gaccgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaac gtgtgctggtttcagcataagcctggccagtcccccgctgtgtcatct acgaggtgaagtatagggccagcggcatccctgagcggttctctggc tccaacagcggcaatacagccaccctgacaatctctggcacacaggc tatggacgagggccgcttatttctgccagaccttgattccaccacagtg gtgttcggcgggcgccaccagactgacagtgtg
V _H HBC24 (дикий тип)	106	gagggtgcagttgttgagtctgggggaggcttggtacagcctggggg gtccctgagactctctgtgcagcctctGGATCCACTTTTA

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
		CCAAATATGCCatgagctgggtccgtcaggctccagggaagggtggagtggtcgcaagtATTAGTGGAAGTgttcctggtttGGTATTGACACAactacgcagactccgttaaggccggttcaccatctccagagacactccaagaacacctgtatctgaatgaacagcctgagagccgaggacacggccttatattactgtGCGAAAGATGTCGGGGTTATCGGGTCATACTATTACTACGCTATGGACGTCtggggtaa
V _L HBC24 (дикий тип)	107	aaattgtgtgacgcagctctccaggcaccctgtttgtctccagggaagagccaccctctctgcagggccagtCAGGGTCTTAGCAGCAGTTACtagcctggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatAGTGCGTCCaccagggccactggcatcccagacagggtcagtggtcagtggtctgggacagactcactctaccatcagcagactggagcctgaagatttgcagtgtattactgtCAACAGTATGCTTACTCACCTCGGTGGACGttcggccaagggaaccaagggtggagatcaaac
V _H HBC24 (кодон-оптимизированная)	108	GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTCTGGCAGCACCTTCACAAAGTATGCAATGTCTTGGGTGCGCCAGGCACCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCTCCATCTCTGGCAGCGTGCCTGGCTTCGGCATCGACACCTACTATGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTTACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACACACTGTATCTGCAGATGAATTCTCTGCGGGCCGAGGACACCGCCCTGTACTATTGTGCCAAGGATGTGGGCGTGATCGGCAGCTACTATTACTATGCAATGGACGTGTGGGGACAGGGAACAGCAGTGACAGTGAGCTCC
V _L HBC24 (кодон-оптимизированная)	109	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCACACTGTCCCTGTCCCCTGGAGAGAGAGCCA

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
		CCCTGTCCTGCAGAGCCTCTCAGGGCCTGA GCTCCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGA AGCCTGGACAGGCCCTCGGCTGCTGATCT ACTCTGCCTCCACCAGAGCAACAGGCATT CCTGACCGCTTCTCCGGATCTGGAAGCGGC ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCCGGCT GGAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTATTG TCAGCAGTACGCCTATTCCCCAAGGTGGA CCTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATC AAG
CH1-шарнирная область- CH2-CH3 HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 (кодон-оптимизированная)	130	GCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTTCC ACTGGCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCCGG CGGCACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGA AGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGT CTTGGAACCTCCGGCGCCCTGACCAGCGGA GTGCATACATTTCCAGCTGTGCTGCAGAGC TCTGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCTTCCAGCCTGGGCACCCAG ACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCC AAGCAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTG GAGCCCAAGTCTTGTGATAAGACCCATAC ATGCCCTCCATGTCCAGCTCCAGAGCTGCT GGGCGGCCCAAGCGTGTTTCTGTTTCCACC CAAGCCTAAGGATACCCTGATGATCTCCA GAACCCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAGGATCCTGAGGTGAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAG GAGCAGTACAACTCTACCTATCGGGTGGT GTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATT GGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAG

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
		GTGTCTAATAAGGCCCTGCCCCGCTCCTATC GAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCA GCCTAGAGAGCCACAGGTGTACACACTGC CTCCATCTCGCGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGG CTTCTATCCTTCCGACATCGCTGTGGAGTG GGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAATT ACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACAGC GATGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCTCGCTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTAGCTGTTCTGTGATGCATGA GGCCCTGCACAATCATTATACACAGAAGT CCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAG
HC HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 (VH-CH1- шарнирная область-CH2- CH3) (кодон- оптимизированная)	131	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGCGG CTGGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCAGAGGC TGAGCTGTGCCGCTTCTGGCAGGATCTTCC GGTCTTTTACATGTCTTGGGTGCGGCAGG CTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCT ACCATCAACCAGGACGGCTCCGAGAAGCT GTATGTGGATAGCGTGAAGGGCAGATTCA CAATCTCTCGCGACAACGCCAAGAAGTCC CTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGAGGGTG GAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGCCGCT TGGTCTGGCAATAGCGGCGGCATGGACGT GTGGGGACAGGGCACCACCGTGTCCGTGT CCAGCGCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTG TTTCCACTGGCTCCCTCTTCCAAGTCTACC TCCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGATGTCT GGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGA CCGTGTCTTGGAAGTCCGGCGCCCTGACCA GCGGAGTGCATACATTTCCAGCTGTGCTGC

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
		AGAGCTCTGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCTTCCAGCCTGGGCA CCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAAGCAATACAAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGTCTTGTGATAAGACC CATACATGCCCTCCATGTCCAGCTCCAGAG CTGCTGGGCGGCCCAAGCGTGTTCCTGTTT CCACCCAAGCCTAAGGATACCCTGATGAT CTCCAGAACCCCCGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCCTGAG GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCCA GGGAGGAGCAGTACAACTCTACCTATCGG GTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGT GCAAGGTGTCTAATAAGGCCCTGCCCCGCT CCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAA GGGCCAGCCTAGAGAGCCACAGGTGTACA CACTGCCTCCATCTCGCGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTG AAGGGCTTCTATCCTTCCGACATCGCTGTG GAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGA ACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTG GACAGCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCTCGCTGGCA GCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTTCTGTGAT GCATGAGGCCCTGCACAATCATTATACAC AGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGT GATGAGGTACCGTGCGACGGCCGGCAAGC CCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTTCGTACG AGGAAAGCTT

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
CL HBC34-V7 (кодон- оптимизированная)	132	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGAC CCTGTTTCCACCCTCTTCCGAGGAGCTGCA GGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGA TCTCTGACTTCTACCCTGGAGCTGTGACAG TGGCTTGGAAGGCTGATAGCTCTCCCGTGA AGGCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAGC AAGCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTC CAGCTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTG GAAGTCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGT GACCCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGA CAGTGGCCCCCACCAGAGTGTTCT
LC HBC34-V7 (VL-CL) (кодон-оптимизированная)	133	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGT GTCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCAT CCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGCAACA AGAACGTGTGCTGGTTTCAGCATAAGCCT GGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAG GTGAAGTATAGGCCCAGCGGCATCCCTGA GCGGTTCTCTGGCTCCAACAGCGGCAATA CAGCCACCCTGACAATCTCTGGCACACAG GCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCAG ACCTTTGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGC GGCGGCACCAGACTGACAGTGCTGGGACA GCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTT TCCACCCTCTTCCGAGGAGCTGCAGGCCA ACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCTG ACTTCTACCCTGGAGCTGTGACAGTGGCTT GGAAGGCTGATAGCTCTCCCGTGAAGGCT GGCGTGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCA GTCTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAGCTA TCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAAGT CCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGACCC

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
		ATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGACAGTG GCCCCACCGAGTGTCT
CL HBC34-V34, HBC34-V35 (кодон-оптимизированная)	134	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGAC CCTGTTTCCACCCTCTTCCGAGGAGCTGCA GGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGA TCTCTGACTTCTACCCTGGAGCTGTGACAG TGGCTTGGAAGGCTGATAGCTCTCCCGTGA AGGCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAGC AAGCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTC CAGCTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTG GAAGTCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGT GACCCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGA CAGTGGCCCCCACCAGTGTCT
LC HBC34-V34 (VL-CL) (кодон-оптимизированная)	135	agctacgagctgacacagccccctccgtgtccgtgtcccctggaca gaccgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaac gtgtcctggtttcagcataagcctggccagtccccctgtgtgtcatct acgaggtgaagtataggcccagcggcatccctgagcggttctctggc tccaacagcggcaatacagccacctgacaatctctggcacacaggc tatggacgagggcgcttatttctgccagaccttgattccaccacagt gtgttcggcgggcgaccagactgacagtgtgggacagccaaag gtgtgtccatctgtgacctgtttccacctcttccgaggagctgcagg ccaacaaggccacctggtgtgcctgatctctgacttaccttgag ctgtgacagtggcttggaggctgatagctctccgtgaaggctggc gtggagacaacaaccctagcaagcagttaacaataagtacggcgc ttccagctatctgtctctgacaccagagcagtggaagtccaccgctct tattctgccaggtgacctatgaggcgacaccgtggagaagacagt ggccccaccgagtggtct
LC HBC34-V35 (VL-CL) (кодон-оптимизированная)	136	agctacgagctgacacagccccctccgtgtccgtgtcccctggaca gaccgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaac gtggcctggtttcagcataagcctggccagtccccctgtgtgtcatct acgaggtgaagtataggcccagcggcatccctgagcggttctctggc

Описание последовательности нуклеиновой кислоты антитела	SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
		tccaacagcggcaatacagccaccctgacaatctctggcacacaggc tatggacgagggcgccttatttctgccagacctttgattccaccacagtg gtgttcggcggcgccaccagactgacagtgtgggacagccaaag gctgtccatctgtgaccctgtttccaccctctccgaggagctgcagg ccaacaaggccaccctgggtgtgcctgatctctgacttctaccctggag ctgtgacagtggcttgaaggctgatagctctcccgtgaaggctggc gtggagacaacaaccctagcaagcagctacaataagtacgccgc ttccagctatctgtctctgacaccagagcagtggaagtcccaccgctct tattcctgccaggtgacccatgagggcagcaccgtggagaagacagt ggccccaccgagtgttct

Вследствие избыточности генетического кода настоящее изобретение также относится к вариантам последовательностей этих последовательностей нуклеиновых кислот и, в частности, к таким вариантам последовательностей, которые кодируют одни и те же аминокислотные последовательности.

В определенных вариантах осуществления полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с нуклеотидной последовательностью согласно любой из SEQ ID NO: 103-110 и 130-136, где нуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии клеткой-хозяином.

В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты согласно любой из SEQ ID NO: 103-110 и 130-136.

В определенных вариантах осуществления полинуклеотид содержит кодирующую V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:103 и кодирующую V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:105. В других вариантах осуществления а полинуклеотид содержит кодирующую V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:103 и кодирующую V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:104. В других вариантах осуществления полинуклеотид содержит кодирующую V_H нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 108 и кодирующую V_L нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 109.

Также в рамках настоящего изобретения предусматриваются полинуклеотиды, которые кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где полинуклеотид содержит или состоит из кодирующей V_H нуклеотидной последовательности согласно

SEQ ID NO:103 и кодирующей V_L нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO:110, где кодируемое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления полинуклеотид может содержать кодирующую CH1-шарнирную область-CH2-CH3 нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:130 и/или содержит кодирующую HC (VH-CH1-шарнирная область-CH3-CH3) нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:131. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит кодирующую CL нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:132 и/или содержит кодирующую LC (VL-CL) нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:133. В других вариантах осуществления полинуклеотид содержит кодирующую CL нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:134 и/или содержит кодирующую LC (VL-CL) нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO:135 или SEQ ID NO:136.

Векторы

Кроме того, в объем изобретения включены векторы, например, экспрессирующие векторы, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

Термин "вектор" относится к конструкции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты. Вектор в контексте настоящего изобретения является пригодным для включения или содержания желаемой последовательности нуклеиновой кислоты. Такие векторы могут представлять собой векторы для хранения, экспрессирующие векторы, клонирующие векторы, векторы для переноса и т.д. Вектор для хранения представляет собой вектор, который обеспечивает удобное хранение молекулы нуклеиновой кислоты. Таким образом, вектор может содержать последовательность, соответствующую, например, желаемому антителу или его фрагменту согласно настоящему описанию.

Как используют в рамках изобретения, "экспрессирующий вектор" относится к конструкции ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая функционально связана с подходящей последовательностью контроля, способной обеспечивать экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие последовательности контроля включают промотор (например, гетерологичный промотор) для обеспечения транскрипции, необязательную последовательность оператора для контроля такой транскрипции и последовательность, кодирующую подходящие участки связывания рибосом с мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Любой из элементов экспрессирующего вектора, который участвует в транскрипции представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты, может быть гетерологичным для вектора. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто потенциальную геномную вставку. После трансформации подходящего хозяина вектор может реплицироваться и функционировать

независимо от генома хозяина или в некоторых случаях может встраиваться непосредственно в геном. В настоящем описании "плазмида", "экспрессирующая плазмида", "вирус" и "вектор" часто используются взаимозаменяемо.

Клонирующий вектор, как правило, представляет собой вектор, который содержит участок клонирования, который может использоваться для включения последовательностей нуклеиновых кислот в вектор. Клонирующий вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор или вектор на основе бактериофага.

Вектор для переноса может представлять собой вектор, который является пригодным для переноса молекул нуклеиновых кислот в клетки или организмы, как например, вирусные векторы. Вектор в контексте настоящего изобретения может представлять собой, например, РНК-вектор или ДНК-вектор. Вектор может представлять собой молекулу ДНК. Например, вектор в рамках настоящей заявки содержит участок клонирования, маркер селекции, такой как фактор резистентности к антибиотику, и последовательность, пригодную для увеличения вектора в количестве, такую как ориджин репликации. В некоторых вариантах осуществления вектор в контексте настоящей заявки представляет собой плазмидный вектор. В определенных таких вариантах осуществления вектор включает лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.

Клетки

В следующем аспекте настоящее изобретение также относится к клетке (также обозначаемой как "клетка-хозяин"), экспрессирующей антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению; или содержащей вектор или полинуклеотид согласно настоящему изобретению.

Примеры таких клеток включают, но не ограничиваются ими, эукариотические клетки, например, клетки дрожжей, клетки животных, клетки насекомых, клетки растений; и прокариотические клетки, включая *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающих. В определенных таких вариантах осуществления клетки представляют собой клеточную линию млекопитающих, такую как клетки CHO (например, клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., PNAS 77:4216 (1980))), клетки почки эмбриона человека (например, клетки HEK293T), клетки PER.C6, клетки Y0, клетки Sp2/0, клетки NS0, клетки печени человека, например, клетки Нера RG, миеломные клетки или гибридомные клетки. Другие примеры линий клеток-хозяев млекопитающих включают клетки Сертоли мыши (например, клетки TM4); линию почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7); клетки почки детеныша хомячка (BHK); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки почки обезьяны (CV1); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Нер G2); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы буффало (BRL 3A); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI; клетки MRC 5 и клетки FS4. Линии клеток-хозяев млекопитающих, пригодные для продуцирования антител, также включают линии, описанные, например, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press,

Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, такую как *E. coli*. Экспрессия пептидов в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, является надежно отработанной (см., например, Pluckthun, A. *Bio/Technology* 9:545-551 (1991)). Например, антитела можно продуцировать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не являются необходимыми. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях, см., например, патенты США № 5648237; 5789199 и 5840523.

Клетки насекомых, пригодные для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, известны в данной области и включают, например, клетки *Spodoptera frugiperla* Sf9, клетки *Trichoplusia ni* BTI-TN5B1-4 и клетки *Spodoptera frugiperla* SfSWT01 "MimicTM". См., например, Palmberger et al., *J. Biotechnol.* 153(3-4):160-166 (2011). Были идентифицированы многочисленные штаммы бакуловирусов, которые могут использоваться совместно с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, также являются пригодными хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих белок векторов, и включают штаммы грибов или дрожжей с "гуманизированными" каскадами гликозилирования, обеспечивающие продуцирование антитела с частично или полностью человеческим паттерном гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Также в качестве хозяев для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению могут использоваться клетки растений. Например, в технологии PLANTIBODIESTM (описанной, например, в патентах США № 5959177; 6040498; 6420548; 7125978 и 6417429) используются трансгенные растения для продуцирования антител.

Для получения описанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента можно использовать любую систему экспрессии белка, подходящую в рамках изобретения. Подходящие экспрессирующие системы включают трансгенных животных, описанных в *Gene Expression Systems*, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999.

В конкретных вариантах осуществления клетка может быть трансфицирована экспрессирующим вектором, описанным в настоящем описании. Термин "трансфекция" относится к введению молекул нуклеиновых кислот, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, например, в эукариотические клетки. В контексте настоящего описания термин "трансфекция" охватывает любой способ, известный специалисту в данной области, для внесения молекул нуклеиновых кислот в клетки, например, в эукариотические клетки, в том числе в клетки млекопитающих. Такие способы охватывают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основе катионных липидов и/или липосом, преципитацию с фосфатом кальция, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вируса или трансфекцию на основе катионных

полимеров, таких как DEAE-декстран или полиэтиленимин и т.д. В определенных вариантах осуществления введение является невирусным.

Более того, клетки по настоящему изобретению можно трансфицировать стабильно или временно вектором, описанным в настоящем описании, например, для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему описанию. В таких вариантах осуществления клетки стабильно трансфицируют вектором, как описано в настоящем описании, кодирующим связывающий белок. Альтернативно клетки могут быть временно трансфицированы вектором согласно настоящему изобретению, кодирующим связывающий белок согласно настоящему описанию. В любом из описанных в настоящем описании вариантов осуществления полинуклеотид может быть гетерологичным для клетки-хозяина.

В родственном аспекте настоящее изобретение относится к способам продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где способы включают культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях и в течение периода времени, достаточных для продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам-хозяевам с гетерологичной экспрессией антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Например, клетка может представлять собой клетку вида, отличного от вида, из которого антитело было полностью или частично получено (например, клетки СНО, экспрессирующие антитело человека или модифицированное антитело человека). В некоторых вариантах осуществления тип клеток-хозяев не экспрессирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент в природе. Более того, клетка-хозяин может обеспечивать посттрансляционную модификацию (РТМ; например, гликозилирование или фукозилирование) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которая не присутствует в нативных антителах или антигенсвязывающих фрагментах (или в нативном родительском антителе, на основе которого антитело или антигенсвязывающий фрагмент были сконструированы или из которого они происходят). Такая РТМ может приводить к функциональному отличию (например, сниженная иммуногенность). Таким образом, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, которые продуцируются клеткой-хозяином, как описано в настоящем описании, могут включать одну или несколько посттрансляционных модификаций, которые отличаются от антитела (или родительского антитела) в его нативном состоянии (например, антитело человека, продуцируемое клеткой СНО, может содержать посттрансляционные модификации, которые отличаются от антитела, полученного от человека и/или продуцированного нативной В-клеткой или плазматитом человека).

Необязательные дополнительные признаки антител или антигенсвязывающих фрагментов

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут быть связаны,

например, с лекарственным средством для доставки в область лечения или связаны с поддающейся детекцией меткой для облегчения визуализации области, содержащей представляющие интерес клетки. Способы связывания антител с лекарственными средствами и поддающимися детекции метками хорошо известны в данной области, также как и способы визуализации с использованием поддающихся детекции меток. Меченые антитела могут использоваться в широком множестве анализов, в которых используется широкое множество меток. Детекцию формирования комплекса антитело-антиген между антителом (или антигенсвязывающим фрагментом или слитым белком) по изобретению и представляющим интерес эпитопом HBsAg, в частности, на области антигенной петли HBsAg, можно облегчать путем присоединения поддающегося детекции вещества к антителу. Подходящие способы детекции включают использование меток, таких как радионуклиды, ферменты, коферменты, флуоресцентные агенты, хемилюминесцентные агенты, хромогены, субстраты или кофакторы ферментов, ингибиторы ферментов, комплексы простетических групп, свободные радикалы, частицы, красители и т.п. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; примером люминесцентного материала является люминол; примеры биoluminesцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящего радиоактивного материала включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H . Такие меченые реагенты могут использоваться в различных хорошо известных способах анализа, таких как радиоиммунный анализ, иммуноферментный анализ, например, ELISA, флуоресцентный иммуноанализ и т.п. Таким образом, меченые антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут использоваться в таких способах анализа, как описано в US 3766162; US 3791932; US 3817837 и US 4233402.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтической частью, такой как цитотоксин, терапевтическое средство или ион радиоактивного металла или радиоизотоп. Примеры радиоизотопов включают, но не ограничиваются ими, I-131 , I-123 , I-125 , Y-90 , Re-188 , Re-186 , At-211 , Cu-67 , Bi-212 , Bi-213 , Pd-109 , Tc-99 , In-111 и т.п. Такие конъюгаты антител могут использоваться для модификации данного биологического ответа; лекарственную часть не следует считать ограниченной классическими химическими терапевтическими средствами. Например, лекарственная часть может представлять собой белок или полипептид, обладающие желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *pseudomonas* или дифтерийный токсин.

Способы конъюгации такой терапевтической части с антителами хорошо известны.

См., например, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy " в *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery" в *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" в *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; и Thorpe et al. (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-158.

Альтернативно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы со вторым антителом или его фрагментом (или вторым слитым белком) с получением гетероконъюгата, как описано в US 4676980. Кроме того, линкеры могут использоваться между метками и описанными антителами, например, как описано в US 4831175. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки могут быть прямо мечены радиоактивным йодом, индием, иттрием или другими радиоактивными частицами, известными в данной области, например, как описано в US 5595721. Лечение может состоять из комбинированного лечения конъюгированными и неконъюгированными антителами и/или антигенсвязывающими фрагментами, вводимыми одновременно или последовательно, например, как описано в WO00/52031; WO00/52473.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, как описано в настоящем описании, также могут быть связаны с твердой подложкой. Кроме того, антитела по настоящему изобретению или их функциональные фрагменты могут быть химически модифицированы путем ковалентной конъюгации с полимером, например, для повышения их времени полужизни в кровотоке. Примеры полимеров и способов связывания их с пептидами представлены в US 4766106; US 4179337; US 4495285 и US 4609546. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть выбраны из полиоксиэтилированных полиолов и полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ является растворимым в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R может представлять собой водород или защитную группу, такую как группа алкила или алканола. В определенных вариантах осуществления защитная группа может иметь от 1 до 8 атомов углерода. Например, защитная группа может представлять собой метил. Символ n обозначает положительное целое число. В одном варианте осуществления n составляет от 1 до 1000. В другом варианте осуществления n составляет от 2 до 500. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ имеет среднюю молекулярную массу, выбранную из от 1000 до 40000, от 2000 до 20000, и от 3000 до 12000. Более того, ПЭГ может иметь по меньшей мере одну гидроксигруппу, например, ПЭГ может иметь концевую гидроксигруппу. Например, она представляет собой концевую гидроксигруппу, которую активируют для реакции со свободной аминогруппой на ингибиторе. Однако будет понятно, что тип и количество реакционноспособных групп можно варьировать для

получения конъюгированного ПЭГ/антитела по настоящему изобретению.

Также в контексте антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем описании, можно использовать растворимые в воде полиоксиэтилированные полиолы. Они включают полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу, полиоксиэтилированный глицерин (POG) и т.п. В одном варианте осуществления используют POG. Без связи с какой-либо теорией, поскольку глицериновый остов полиоксиэтилированного глицерина представляет собой тот же остов, который встречается в природе, например, у животных и людей в моно-, ди-, триглицеридах, это ветвление не обязательно будет распознаваться в качестве чужеродного агента в организме. POG может иметь молекулярную массу в том же диапазоне, что и ПЭГ. Другой системной доставки лекарственных средств, которая может использоваться для повышения времени полужизни в кровотоке, является липосома. Способы получения липосомальных систем доставки известны специалисту в данной области. Другие системы доставки лекарственных средств известны в данной области и описаны, например упоминаются, в Poznansky et al. (1980) и Poznansky (1984).

Главным образом, антитело или антигенсвязывающий фрагмент будут присутствовать в композиции, которая по существу свободна от других полипептидов, например, где менее 90% (по массе), обычно менее 60% и чаще менее 50% композиции состоят из других полипептидов.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут быть иммуногенными у не являющихся человеком (или гетерологичных) хозяев, например, у мышей. В частности, антитела, антигенсвязывающие фрагменты или слитые белки могут иметь идиотоп, который является иммуногенным у не являющихся человеком хозяев, но не у хозяина-человека. В частности, такие молекулы по изобретению для применения у человека включают молекулы, которые не могут быть без труда выделены из хозяев, таких как мыши, козы, кролики, крысы, не являющиеся приматами млекопитающие и т.д., и, как правило, они не могут быть получены посредством гуманизации или от ксеномышей.

Продуцирование антител, антигенсвязывающих фрагментов и слитых белков

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть получены любым способом, известным в данной области. Например, общая методология получения моноклональных антител с использованием технологии гибридом хорошо известна (Kohler, G. and Milstein, C., 1975; Kozbar et al. 1983). В одном варианте осуществления используют альтернативный способ иммортализации посредством EBV, описанный в WO2004/076677.

В одном варианте осуществления антитела получают с использованием способа, описанного в WO 2004/076677. В таких способах В-клетки, продуцирующие антитела, трансформируют EBV и поликлональным активатором В-клеток. Для дальнейшего повышения эффективности можно необязательно добавлять дополнительные стимуляторы клеточного роста и дифференцировки. Эти стимуляторы могут представлять

собой цитокины, такие как IL-2 и IL-15. В одном аспекте IL-2 добавляют в ходе стадии иммортализации для дальнейшего повышения эффективности иммортализации, однако его применение не является необходимым. Затем иммортализованные В-клетки, полученные с использованием этих способов, можно культивировать с использованием способов, известных в данной области, и из них выделять антитела.

Другой способ продуцирования антител описан в WO 2010/046775. В таком способе плазматиты культивируют в ограниченном количестве или в качестве единичных плазматитов в планшетах для культивирования Microwell. Из культур плазматитов можно выделять антитела. Кроме того, из культур плазматитов можно экстрагировать РНК и можно проводить ПЦР с использованием способов, известных в данной области. Области VH и VL антител можно амплифицировать посредством ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскриптазой), секвенировать и клонировать в экспрессирующий вектор, которым затем трансфицируют клетки НЕК293Т или другие клетки-хозяева. Клонирование нуклеиновой кислоты в экспрессирующие векторы, трансфекцию клеток-хозяев, культивирование трансфицированных клеток-хозяев и выделение продуцированного антитела можно проводить с использованием любых способов, известных специалисту в данной области.

Антитела можно далее очищать, если желательно, с использованием фильтрования, центрифугирования и различных хроматографических способов, таких как ВЭЖХ или аффинная хроматография. Способы очистки антител, например, моноклональных антител, включая способы продуцирования антител фармацевтической категории, хорошо известны в данной области.

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих антитела, фрагменты антител или слитые белки по настоящему изобретению, можно использовать стандартные способы молекулярной биологии. Желаемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично с использованием способа синтеза олигонуклеотидов. В соответствующих случаях можно использовать способы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антитела или слитого белка по настоящему изобретению, или их фрагменты, может использоваться любая подходящая клетка-хозяин/векторная система. Можно частично использовать бактериальные, например, *E. coli*, и другие микробные системы, для экспрессии фрагментов антител, таких как Fab- и F(ab')₂-фрагменты, и особенно Fv-фрагменты и одноцепочечные фрагменты антител, например, одноцепочечные Fv. Для продуцирования более крупных молекул антител, включая молекулы полных антител, можно использовать системы экспрессии в клетках-хозяевах эукариот, например, млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки CHO, НЕК293Т, PER.C6, NS0, миеломные или гибридомные клетки.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту

по настоящему изобретению, в условиях, пригодных для экспрессии белка с ДНК, кодирующей молекулу антитела, описанную в настоящем описании, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела или фрагмент антитела может содержать полипептид тяжелой или легкой цепи, в случае которого для трансфекции клеток-хозяев необходимо использовать только последовательность, кодирующую полипептид тяжелой цепи или легкой цепи. Для продуцирования продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, клеточную линию можно трансфицировать двумя векторами: первый вектор, кодирующий полипептид легкой цепи, и второй вектор, кодирующий полипептид тяжелой цепи. Альтернативно можно использовать один вектор, включающий последовательности, кодирующие полипептид легкой цепи и полипептид тяжелой цепи.

Альтернативно антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению можно получать путем (i) экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению в клетке-хозяине, например, с использованием вектора, описанного в настоящем описании, и (ii) выделения экспрессированного желаемого продукта. Кроме того, способ может включать (iii) очистку выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Трансформированные В-клетки и культивированные клетки плазмы можно подвергать скринингу в отношении клеток, продуцирующих антитела и антигенсвязывающие фрагменты с желаемой специфичностью или функцией.

Скрининг можно проводить посредством иммуноанализа, например, ELISA, посредством окрашивания тканей или клеток (включая трансфицированные клетки), посредством анализа нейтрализации с использованием одного из ряда других способов, известных в данной области для идентификации желаемой специфичности или функции. Анализ может быть выбран на основе простого распознавания одного или нескольких антигенов, или может быть выбран, дополнительно основываясь на желаемой функции, например, для отбора нейтрализующих антител вместо только антигенсвязывающих антител, для отбора антител, которые могут изменять характеристики клеток-мишеней, таких как их сигнальные каскады, их форма, их скорость роста, их способность влиять на другие клетки, их ответ на влияние других клеток или на другие реагенты, или посредством изменения условий, их статуса дифференцировки и т.п.

Затем из положительной трансформированной культуры В-клеток можно получать индивидуальные трансформированные клоны В-клеток. Стадию клонирования для отделения отдельных клонов от смеси положительных клеток можно проводить с использованием лимитирующего разведения, микроманипуляции, депонирования единичных клеток посредством сортировки клеток или другого способа, известного в данной области.

Нуклеиновую кислоту из культивируемых клеток плазмы можно выделять, клонировать и экспрессировать в клетках НЕК293Т или других известных клетках-хозяевах с использованием способов, известных в данной области.

Клоны иммортализованных В-клеток или трансфицированные клетки-хозяева,

описанные в настоящем описании, можно использовать различным образом, например, в качестве источника моноклональных антител, в качестве источника нуклеиновой кислоты (ДНК или мРНК), кодирующей представляющее интерес моноклональное антитело, для научных целей, и т.д.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело, которое нейтрализует вирус гепатита В и фармацевтически приемлемый водный носитель. Под носителем, как правило, понимают материал, который является пригодным для хранения, транспортировки, составления и/или введения соединения, такого как фармацевтически активное соединение, в частности, антитела согласно настоящему изобретению. Например, носитель может представлять собой физиологически приемлемую жидкость, которая является пригодной для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтически активного соединения, в частности, антитела согласно настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, получают для инъекции или инфузии пациенту. В некоторых вариантах осуществления композицию можно получать для внутривенной ("ВВ" или "в/в"), внутриартериальной или внутривенной инфузии. В других вариантах осуществления композиция может быть получена для внутривенной, внутриартериальной, внутривенной, интрамедуллярной, внутривенной, интратекальной, внутривенной инъекции. В конкретных вариантах осуществления композицию получают для подкожной ("ПК" или "п/к") инъекции. В конкретных вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем описании, представляют собой фармацевтически приемлемые стерильные водные растворы, демонстрирующие подходящее значение pH, изотоничность и стабильность, для введения человеку. Водные носители, пригодные для составления композиций, описанных в настоящем описании, включают воду (например, стерильная вода, вода USP для инъекций), а также изотонические носители, такой как инъекционный хлорид натрия, раствор Рингера инъекционный, лактатный раствор Рингера инъекционный.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, включают антитело, выбранное из нейтрализующих HBV антител, описанных в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, включают (выделенное) антитело, содержащее (i) вариabельную область тяжелой цепи (VH), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:41; и (ii) вариabельную область легкой цепи (VL), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно любой из SEQ ID NO: 59, 89 или 90, при условии, что аминокислота в положении 40 VL согласно нумерации IMGT не является цистеином, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом

гепатита В и вирусом гепатита дельта.

В определенных вариантах осуществления: (i) VH обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:41; и/или (ii) VL обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно любой из SEQ ID NO: 59, 89 или 90.

В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 40 VL представляет собой аланин. В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 40 VL представляет собой серин. В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 40 VL представляет собой глицин.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 согласно SEQ ID NO: (i) 34-36, 37, 38 и 40, соответственно; (ii) 34, 66, 36, 37, 38 и 40, соответственно; (iii) 34-36, 37, 39 и 40, соответственно; (iv) 34, 66, 36, 37, 39 и 40, соответственно; (v) 34-36, 37, 38 и 58, соответственно; (vi) 34, 66, 36, 37, 38 и 58, соответственно; (vii) 34-36, 37, 39 и 58, соответственно; или (viii) 34, 66, 36, 37, 39 и 58, соответственно.

В определенных вариантах осуществления VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:89.

В определенных вариантах осуществления VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:90.

В определенных вариантах осуществления VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41.

В определенных вариантах осуществления VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41 и VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:89.

В определенных вариантах осуществления VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41 и VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:90.

В определенных вариантах осуществления антитело включает антитело человека и/или моноклональные антитело.

В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой мультиспецифическое антитело. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит Fc-часть.

В определенных вариантах осуществления Fc-часть содержит мутацию, которая усиливает связывание с FcRn (например, человека) по сравнению с эталонной Fc-частью, которая не содержит мутацию.

В определенных вариантах осуществления Fc-часть содержит мутацию, которая усиливает связывание с FcγR (например, человека) (например, таким как FcγRIIa, FcγRIIIa или оба из них) по сравнению с эталонной Fc-частью, которая не содержит мутацию.

В определенных вариантах осуществления Fc-часть имеет изотип IgG или

происходит из изогиа IgG.

В определенных вариантах осуществления мутация, которая усиливает связывание с FcRn, включает: M428L; N434S; N434H; N434A; N434S; M252Y; S254T; T256E; T250Q; P257I; Q311I; D376V; T307A; E380A или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления мутация, которая усиливает связывание с FcRn, включает: (i) M428L/N434S; (ii) M252Y/S254T/T256E; (iii) T250Q/M428L; (iv) P257I/Q311I; (v) P257I/N434H; (vi) D376V/N434H; (vii) T307A/E380A/N434A или (viii) любую комбинацию (i)-(vii).

В определенных вариантах осуществления мутация, которая усиливает связывание с FcRn, включает M428L/N434S.

В определенных вариантах осуществления мутация, которая усиливает связывание с FcγR, включает S239D; I332E; A330L; G236A или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления мутация, которая усиливает связывание с FcγR, включает: (i) S239D/I332E; (ii) S239D/A330L/I332E; (iii) G236A/S239D/I332E или (iv) G236A/A330L/I332E.

В определенных вариантах осуществления мутация, которая усиливает связывание с FcγR, включает или состоит в G236A/A330L/I332E. В некоторых вариантах осуществления мутация, которая усиливает связывание с FcγR, не включает S239D. В некоторых вариантах осуществления Fc-часть содержит нативный Ser (S) в положении 239.

В определенных вариантах осуществления Fc-часть содержит мутации аминокислот с заменами: M428L; N434S; G236A; A330L и I332E. В определенных следующих вариантах осуществления Fc-часть не содержит дополнительную мутацию.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) согласно SEQ ID NO: 91.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) согласно SEQ ID NO: 92.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) согласно SEQ ID NO:93.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) согласно SEQ ID NO:94.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность HC согласно SEQ ID NO:91 и аминокислотную последовательность LC согласно SEQ ID NO:93.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность HC согласно SEQ ID NO:92 и аминокислотную последовательность LC согласно SEQ ID NO:94.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность HC согласно SEQ ID NO:91 и аминокислотную последовательность LC согласно SEQ ID NO:94.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность HC согласно SEQ ID NO:92 и аминокислотную последовательность LC согласно SEQ ID NO:93.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, включают (выделенное) антитело, содержащее: (i) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:91; и (ii) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:93, где антитело связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывает HBsAg генотипа, выбранного из генотипов HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическая композиция снижает сывороточную концентрацию ДНК HBV у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическая композиция снижает сывороточную концентрацию HBsAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическая композиция снижает сывороточную концентрацию HBeAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В некоторых вариантах осуществления антитело или фармацевтическая композиция снижает сывороточную концентрацию HBcrAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, включают антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO:34, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO:35 или 66, аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO:36; и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность CDRL1 согласно SEQ ID NO:37, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно SEQ ID NO:38 или 39, и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO:58 или 40; и Fc-часть, где Fc-часть содержит G236A/A330L/I332E.

В определенных вариантах осуществления Fc-часть не содержит S239D. В определенных вариантах осуществления Fc-часть содержит Ser (S) в положении 239.

В определенных вариантах осуществления Fc-часть дополнительно содержит M428L/N434S.

В определенных вариантах осуществления V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO:41 или 67 и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO:42, 59, 65, 89, 90 и 111-120.

В других вариантах осуществления предусматривается фармацевтическая композиция, которая содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: (i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную

последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO:97, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO:98, аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO:99; (ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность CDRL1 согласно SEQ ID NO:100, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно SEQ ID NO:100, и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO:102; и (iii) Fc-часть, где Fc-часть содержит G236A/A330L/I332E.

В конкретных таких вариантах осуществления антитела фармацевтической композиции, V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:95 и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:96.

В определенных вариантах осуществления Fc-часть не содержит S239D. В определенных вариантах осуществления Fc-часть дополнительно содержит M428L/N434S.

В некоторых вариантах осуществления антитело фармацевтической композиции имеет усиленное связывание с Fc γ RIIA человека, Fc γ RIIA человека или обоими из них по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E, где Fc γ RIIA человека необязательно представляет собой H131 или R131, и/или Fc γ RIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158; имеет сниженное связывание с Fc γ RIIB человека по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E; не связывается с Fc γ RIIB человека; имеет сниженное связывание с C1q человека по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E; не связывается с C1q человека; активирует Fc γ RIIA, Fc γ RIIA человека или оба из них в большей степени, чем эталонный полипептид, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E, где Fc γ RIIA человека необязательно представляет собой H131 или R131, и/или Fc γ RIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158; не активирует Fc γ RIIB человека; и/или активирует натуральные киллеры (NK) человека в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный пептид, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E.

Фармацевтические композиции включают достаточно антительного материала для обеспечения введения терапевтически эффективного количества антитела пациенту. В некоторых вариантах осуществления антитело включено в концентрации, выбранной из 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл и 200 мг/мл. В других вариантах осуществления антитело включено в композицию в концентрации, выбранной из более 50 мг/мл, более 75 мг/мл, более 100 мг/мл, более 125 мг/мл, более 150 мг/мл, более 175 мг/мл, более 200 мг/мл, более 225 мг/мл и более 250 мг/мл. В других вариантах осуществления композиция содержит антитело в концентрации, выбранной из диапазона от 50 мг/мл до 200 мг/мл, диапазона от 75 мг/мл до 225 мг/мл и диапазона от 100 мг/мл до 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело в концентрации в диапазоне от 125 мг/мл

до 150 мг/мл. В других вариантах осуществления композиция содержит антитело в концентрации 150 мг/мл.

Композиции, описанные в настоящем описании, могут включать одно или несколько из буфера, поверхностно-активного вещества или триблоксополимера, соли (например, хлорид натрия) и стабилизатора (такого как сахарный спирт, дисахаридный или полисахаридный стабилизатор, и/или стабилизирующая аминокислота (например, аргинин и/или глицин)). Кроме того, когда необходимо или желательно, композиции, описанные в настоящем описании, могут быть составлены так, чтобы они дополнительно включали один или несколько антиоксидантов (например, аскорбиновая кислота, метионин, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)).

Фармацевтические композиции по изобретению демонстрируют и поддерживают значение pH, которое сохраняет жизнеспособность антитела, также являясь пригодным для инъекции или инфузии. Композиции, описанные в настоящем описании, как правило, имеют pH в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 8,5. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5, например, в диапазоне от 5,5 до 6,5. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от 5,8 до 6,2, например, приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления pH может составлять 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет pH в диапазоне от 6 до 8, например, приблизительно 7. В определенных таких вариантах осуществления pH может составлять приблизительно 6, как например, 6.

Композиция может включать буферное вещество для достижения и поддержания желаемого значения pH. Буферы, пригодные для применения в композициях, описанных в настоящем описании, включают, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный, фосфатный и гидроксиметиламинометановый (Tris) буферы. В конкретных вариантах осуществления композиция включает буфер, выбранный из гистидинового буфера и фосфатного буфера. В конкретных вариантах осуществления композиция демонстрирует pH 6 и включает гистидиновый буфер. В таких вариантах осуществления гистидин может быть включен в композицию в концентрации в диапазоне от 10 mM до 40 mM (например, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM или 40 mM). Например, в конкретных вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению демонстрирует pH 6 и включает гистидин в концентрации, выбранной из 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM и 40 mM.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, также могут включать поверхностно-активное вещество или триблоксополимер. Поверхностно-активные вещества, иногда называемые "детергентами", могут выполнять одну или несколько функций. Например, в водных растворах антител поверхностно-активные вещества служат для сохранения функциональности антител, способствуют растворению антител или других эксципиентов и/или действуют, контролируя микробный рост.

Поверхностно-активные вещества, которые могут использоваться в композициях, описанных в настоящем описании, включают, например, полисорбат 80 (Tween 80), полисорбат 20 (Tween 20). Дополнительно или альтернативно, можно использовать триблоксополимер, такой как полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления композиция включает поверхностно-активное вещество в концентрации в диапазоне от 0,01% до 0,05% (масс./об.). В таких вариантах осуществления поверхностно-активное вещество может быть выбрано из полисорбата 80 (Tween 80), полисорбата 20 (Tween 20) и полоксамера 188. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в настоящем описании, включает полисорбат 80 (Tween 80) в концентрации в диапазоне от 0,01% до 0,05% (масс./об.). В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в настоящем описании, включает полисорбат 80 (Tween 80) в концентрации 0,02% (масс./об.).

Когда композиции согласно настоящему изобретению включают стабилизатор на основе сахарного спирта, дисахарида или полисахарида, стабилизатор может быть выбран, например, из маннита, сорбита, сахарозы, трегалозы и декстрана 40. В конкретных вариантах осуществления стабилизатор представляет собой дисахарид. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает дисахарид в концентрации, выбранной из от 4,0% до 10% (масс./об.). В определенных таких вариантах осуществления дисахарид представляет собой сахарозу. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает сахарозу в концентрации, выбранной из 4,0%, 4,1%, 4,2%, 4,3%, 4,4%, 4,5%, 4,6%, 4,7%, 4,8%, 4,9%, 5,0%, 5,1%, 5,2%, 5,3%, 5,4%, 5,5%, 5,6%, 5,7%, 5,8%, 5,9%, 6,0%, 6,1%, 6,2%, 6,3%, 6,4%, 6,5%, 6,6%, 6,7%, 6,8%, 6,9%, 7,0%, 7,1%, 7,2%, 7,3%, 7,4%, 7,5%, 7,6%, 7,7%, 7,8%, 7,9%, 8,0%, 8,1%, 8,2%, 8,3%, 8,4%, 8,5%, 8,6%, 8,7%, 8,8%, 8,9%, 9,0%, 9,1%, 9,2%, 9,3%, 9,4%, 9,5%, 9,6%, 9,7%, 9,8%, 9,9% или 10,0% (масс./об.) или находится в диапазоне, ограниченным и включающим любые две из этих величин. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает сахарозу в концентрации приблизительно 7%, такой как 7% (масс./об.).

В некоторых вариантах осуществления композиции адаптированы для введения млекопитающему, например, человеку. В таких вариантах осуществления композиция является стерильной и может быть специально получена так, чтобы она была свободной от пирогенов. Кроме того, композиция может быть изотонической для человека.

Композиции, описанные в настоящем описании, могут быть получены для прямого введения индивидууму (т.е. без стадии восстановления или смешения) или они могут быть получены в качестве лиофилизированного материала для восстановления в водном носителе перед инъекцией или инфузией пациенту. Для прямого введения индивидууму фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть предоставлена, например, в предварительно заполненном шприце или во флаконе, таком как стеклянный флакон. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению предоставляют в герметично закрытых контейнерах. В

некоторых вариантах осуществления композиция может быть в форме набора, организованного так, чтобы комбинированную композицию восстанавливали непосредственно перед введением индивидууму. Например, лиофилизированное антитело может быть предоставлено в форме набора со стерильной водой или стерильным буфером.

Введение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в способах и применениях согласно изобретению можно проводить отдельно или в комбинации с вспомогательным средством (также обозначаемым в настоящем описании как "дополнительный активный компонент"), которое может быть пригодным для предупреждения и/или лечения инфекции вирусом гепатита В.

Настоящее изобретение охватывает введение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, где ее вводят индивидууму до, одновременно или после вспомогательного средства или другого терапевтического режима, пригодного для лечения и/или предупреждения инфекции вирусом гепатита В. Указанную фармацевтическую композицию, вводимую в комбинации с указанным сопутствующим средством, можно вводить в одной и той же или в разных композиции(ях) и одним и тем же или разными путем(ями) введения. Как используют в рамках изобретения, выражения, такие как "комбинированная терапия", "комбинированное введение", "введенный в комбинации" и т.п. относятся к комбинированному действию лекарственных средств (которые намереваются вводить "в комбинации"). Для этого комбинированные лекарственные средства обычно присутствуют в области действия одновременно и/или в пределах перекрывающегося временного окна. Также может быть возможно, чтобы эффекты в результате одного из лекарственных средств все еще продолжались (даже если лекарственное средство само по себе может не присутствовать более в качестве поддающегося обнаружению), когда вводят другое лекарственное средство, так чтобы эффекты обоих лекарственных средств могли взаимодействовать. Однако лекарственное средство, которое вводили задолго до другого лекарственного средства (например, более чем за один, два, три или более месяцев или год), так чтобы оно более не присутствовало на поддающемся детекции уровне (или его эффекты не продолжались) при введении другого лекарственного средства, обычно не считается вводимым "в комбинации".

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором PD-1, например, PD-1-специфическим антителом или его связывающим фрагментом, таким как пидилизумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MEDI0680 (ранее AMP-514), AMP-224, BMS-936558 или любая их комбинация.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации со специфичным к PD-L1 антителом или его связывающим фрагментом, таким как BMS-936559, дурвалумаб (MEDI4736), атезолизумаб (RG7446), авелумаб (MSB0010718C), MPDL3280A или любая их комбинация.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по

настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором LAG3, таким как LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016 или любая их комбинация.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором CTLA4. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации со специфичным к CTLA4 антителом или его связывающим фрагментом, таким как ипилимумаб, тремелиумаб, слитые белки CTLA4-Ig (например, абатацепт, белатацепт) или любая их комбинация.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации со специфичным к B7-H3 антителом или его связывающим фрагментом, таким как эноблитузумаб (MGA271), 376.96 или оба из них. Связывающий фрагмент антитела против B7-H3 может представлять собой scFv или его слитый белок, как описано, например, в Dangaj et al., Cancer Res. 73:4820, 2013, а также фрагменты, описанные в патенте США № 9574000 и публикациях патента PCT № WO/201640724A1 и WO 2013/025779A1.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором CD244.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором BLTA, HVEM, CD160 или любой их комбинацией. Антитела против CD-160 описаны, например, в публикации PCT № WO 2010/084158.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором TIM3.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором Gal9.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором передачи сигнала аденозина, таким как рецептор-ловушка для аденозина.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором A2aR.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором KIR, таким как лирилумаб (BMS-986015).

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором ингибиторного цитокина (как правило, цитокин, отличный от TGFβ) или развития или активности Treg.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором IDO, таким как лево-1-метилтриптофан, эпакодостат (INCB024360; Liu et al., Blood 115:3520-30, 2010), эбселен (Terentis et al., Biochem. 49:591-600, 2010), индоксимод, NLG919 (Mautino et al., American

Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013), 1-метилтриптофан (1-МТ)-тирапазамин или любая их комбинация.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором аргиназы, таким как метиловый эфир N(омега)-нитро-L-аргинина (L-NAME), N- омега- гидрокснор- 1- аргинин (нор- NOHA), L-NOHA, 2(S)-амино-6-бороногексановая кислота (ABH), S-(2-бороноэтил)-L-цистеин (BEC) или любая их комбинация.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором VISTA, таким как CA-170 (Curis, Lexington, Mass.).

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором TIGIT, например, таким как COM902 (Compugen, Toronto, Ontario, Канада), ингибитор CD155, например, такой как COM701 (Compugen) или оба из них.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором PVRIG, PVRL2 или обоими из них. Антитела против PVRIG описаны, например, в публикации PCT № WO 2016/134333. Антитела против PVRL2 описаны, например, в публикации PCT № WO 2017/021526.

В определенных вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором LAIR1.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5 или любой их комбинацией.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации со средством, которое повышает активность (т.е. является агонистом) стимулирующей молекулы иммунной точки контроля. Например, композицию по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB) (например, таким как урелумаб), агонистом CD134 (OX-40) (например, таким как MEDI6469, MEDI6383 или MEDI0562), леналидомидом, помалидомидом, агонистом CD27 (например, такие как CDX-1127), агонистом CD28 (например, таким как TGN1412, CD80 или CD86), агонистом CD40 (например, таким как CP-870,893, rhuCD40L или SGN-40), агонистом CD122 (например, таким как IL-2), агонистом GITR (например, таким как гуманизированные моноклональные антитела, описанные в публикации патента PCT № WO 2016/054638), агонистом ICOS (CD278) (например, таким как GSK3359609, mAb 88,2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8 или любая их комбинация). В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, способ может включать введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению с одним или несколькими агонистами стимулирующей молекулы иммунной точки контроля, включая любой из вышеуказанных,

отдельно или в комбинации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с нуклеотидным(нуклеозидным) ингибитором обратной транскриптазы (NRTI), интерфероном (например, IFN α , IFN β или обоими из них) или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления NRTI включает одно или несколько из: тенофовира; тенофовира дисопроксила (например, тенофовир диспроксил фумарат); тенефовира алафенамида; энтекавира; ламивудина; адефовира и адефовира дипивоксила.

Медикаментозное лечение и применения

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения инфекции вирусом гепатита В. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения инфекции вирусом гепатита В способами, включающими: введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

В терапевтических условиях индивидуум инфицирован инфекцией вирусом гепатита В, у него диагностирована инфекция вирусом гепатита В и/или он проявляет симптомы инфекции вирусом гепатита В. Следует отметить, что термины "лечение" и "терапия"/"терапевтический" в отношении инфекции вирусом гепатита В включают (полное) излечение, а также ослабление/уменьшение инфекции вирусом гепатита В и/или связанных с ним симптомов (например, ослабление/уменьшение тяжести инфекции и/или симптомов, количества симптомов, длительности инфекции и/или симптомов, или любая их комбинация).

В определенных вариантах осуществления индивидуумом является взрослый. В определенных вариантах осуществления возраст индивидуума находится в диапазоне от 18 лет до 65 лет. В определенных вариантах осуществления масса индивидуума составляет от 40 кг до 125 кг.

В определенных вариантах осуществления индивидуум, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, имеет хроническую инфекцию HBV; например, определяемую положительным сывороточным HBsAg, ДНК HBV и/или HBeAg 2 раза с интервалом по меньшей мере 6 месяцев.

В определенных вариантах осуществления индивидуум, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, не имеет цирроза. Отсутствие цирроза определяют посредством: оценки с использованием Fibroscan (например, в пределах 6 месяцев перед введением однократной дозы фармацевтической композиции) или биопсии печени (например, в пределах 12 месяцев перед введением однократной дозы фармацевтической композиции), где предпочтительно отсутствие цирроза определяют по отсутствию фиброза Metavir F3 или отсутствию цирроза F4.

В определенных вариантах осуществления индивидууму, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, вводили

нуклеозидный(нуклеотидный) ингибитор обратной транскриптазы (NRTI), необязательно в пределах 120 суток, кроме того, необязательно в пределах 60 суток, перед введением однократной дозы фармацевтической композиции. Иными словами, индивидууму ранее вводили NRTI, например, в пределах 120 суток или в пределах 60 суток от введения фармацевтической композиции.

В определенных вариантах осуществления NRTI включает один или несколько из: тенофовира; тенофовира дисопроксила (например, тенофовир диспроксил фумарат); тенофовира алафенамида; энтекавира; ламивудина; адефовира и адефовира дипивоксила.

В определенных вариантах осуществления индивидуум, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, имеет сывороточную концентрацию ДНК HBV менее 100 МЕ/мл (например, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 80, 70, 60 и т.п.) не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

В определенных вариантах осуществления индивидуум, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, имеет сывороточную концентрацию HBsAg менее 1000 МЕ/мл до введения однократной дозы.

В определенных вариантах осуществления индивидуум, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, имеет сывороточную концентрацию поверхностного антигена HB (HBsAg), превышающую или равную 1000 МЕ/мл, не более чем за 28 суток до введения однократной дозы. Концентрацию HBsAg можно определять с использованием, например, анализа Abbott ARCHITECT.

В определенных вариантах осуществления индивидуум, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, является негативным по е-антигену HB (HBeAg) не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

В определенных вариантах осуществления индивидуум является негативным в отношении антител против HBs не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

В определенных вариантах осуществления индивидуум, которому вводят фармацевтическую композицию по настоящему изобретению: (i) не имеет фиброза и/или не имеет цирроза; и/или (ii) имеет уровень (сывороточной) аланинаминотрансферазы (ALT) $< 2 \times$ верхняя граница нормы (ULN).

В определенных вариантах осуществления способ включает введение однократной дозы фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в диапазоне от 2 до 18 мг/кг (массы тела индивидуума); например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 мг/кг.

В определенных вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 6 мг, вплоть до 18 мг, вплоть до 75 мг, вплоть до 90 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 900 мг или вплоть до 3000 мг антитела. В конкретных вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит приблизительно 10, приблизительно 25, приблизительно 50, приблизительно 75, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 125, приблизительно 150,

приблизительно 175, приблизительно 200, приблизительно 250, приблизительно 300, приблизительно 350, приблизительно 400, приблизительно 450, приблизительно 500, приблизительно 550, приблизительно 600, приблизительно 650, приблизительно 700, приблизительно 750, приблизительно 800, приблизительно 850, приблизительно 900, приблизительно 950, приблизительно 1000, приблизительно 1250, приблизительно 1500, приблизительно 1750, приблизительно 2000, приблизительно 2250, приблизительно 2500, приблизительно 2750, или приблизительно 3000 мг антитела.

В конкретных вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит приблизительно 75 мг антитела. В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит приблизительно 90 мг антитела. В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 300 мг антитела. В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 900 мг антитела. В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 3000 мг антитела.

В определенных вариантах осуществления однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в концентрации в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл, как например, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.

В любом из способов лечения инфекции вирусом гепатита В, описанных в настоящем описании, фармацевтическую композицию можно вводить посредством инъекции или инфузии. При введении посредством инфузии фармацевтические композиции можно вводить, например, посредством внутривенной, внутриартериальной или внутривенной инфузии. При введении путем инъекции фармацевтические композиции можно вводить, например, посредством внутривенной, внутриартериальной, внутривенной, интрамедуллярной, внутривенной, интратекальной, внутривенной или подкожной инъекции. В конкретных вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, фармацевтическую композицию вводят посредством подкожной ("п/к") инъекции или посредством внутривенной ("в/в") инъекции.

Даже когда множество инъекций или инфузий необходимо для введения определенной дозы, дозу называют "однократной дозой" и введение считается "однократным введением". Как правило, если требуется множество инъекций или инфузий для введения однократной определенной дозы, множество инъекций или инфузий вводят на протяжении периода приблизительно 5 минут или менее, приблизительно 15 минут или менее, приблизительно 30 минут или менее, приблизительно 1 час или менее, приблизительно 2 часа или менее, приблизительно 4 часа или менее, приблизительно 6 часа или менее, приблизительно 1 сутки или менее, приблизительно 1 неделя или менее или приблизительно 1 месяц или менее.

В определенных вариантах осуществления, где приблизительно через 56 суток

после введения однократной дозы индивидуум имеет > 2-кратное снижение сывороточного HBsAg (например, концентрация HBsAg в сыворотке, например, при определении с использованием анализа Abbott ARCHITECT) по сравнению с сывороточным HBsAg индивидуум за 0-28 суток до введения однократной дозы.

В определенных вариантах осуществления после введения однократной дозы фармацевтической композиции (например, через 56 суток после введения однократной дозы), индивидуум: (i) имеет сниженное или менее тяжелое внутрипеченочное распространение HBV по сравнению с референтным индивидуумом (например, индивидуум, имеющий инфекцию HBV сходной тяжести или сходного пола, возраста, массы тела и/или общего состояния здоровья с индивидуумом, которому вводят фармацевтическую композицию) на протяжении того же периода времени, которому вводили плацебо или не проводили терапию HBV; и/или (ii) имеет адаптивный иммунный ответ против HBV, например, включая Т-клеточный ответ, специфичный к HBV.

Настоящее изобретение также относится к следующим иллюстративным вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: (i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:41; и (ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно любой из SEQ ID NO: 59, 89 или 90, при условии, что аминокислота в положении 40 VL согласно нумерации IMGT не является цистеином, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

Вариант осуществления 2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 1, где: (i) V_H обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:41; и/или (ii) V_L обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно любой из SEQ ID NO: 59, 89 или 90.

Вариант осуществления 3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 1 или 2, где аминокислота в положении 40 VL представляет собой аланин.

Вариант осуществления 4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 1 или 2, где аминокислота в положении 40 VL представляет собой серин.

Вариант осуществления 5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 1 или 2, где аминокислота в положении 40 VL представляет собой глицин.

Вариант осуществления 6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-5, содержащие последовательности CDRH1,

CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 согласно SEQ ID NO: (i) 34-36, 37, 38 и 40, соответственно; (ii) 34, 66, 36, 37, 38 и 40, соответственно; (iii) 34-36, 37, 39 и 40, соответственно; (iv) 34, 66, 36, 37, 39 и 40, соответственно; (v) 34-36, 37, 38 и 58, соответственно; (vi) 34, 66, 36, 37, 38 и 58, соответственно; (vii) 34-36, 37, 39 и 58, соответственно; или (viii) 34, 66, 36, 37, 39 и 58, соответственно.

Вариант осуществления 7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-3 или 6, где VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:89.

Вариант осуществления 8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1, 2, 4 или 6, где VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:90.

Вариант осуществления 9. Выделенное антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-8, где VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41.

Вариант осуществления 10. Выделенное антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-3, 6, 7 или 9, где VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41, и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:89.

Вариант осуществления 11. Выделенное антитело согласно любому из вариантов осуществления 1, 2, 4, 6, 8 или 9, где VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:41, и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:90.

Вариант осуществления 12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:95; и
- (ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:96,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

Вариант осуществления 13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 12, где:

- (i) VH обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:95; и/или
- (ii) VL обладает по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:96.

Вариант осуществления 14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 12 или 13, содержащие последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 согласно SEQ ID NO:97-102, соответственно.

Вариант осуществления 15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает антитело человека, моноклональное антитело, очищенное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

Вариант осуществления 16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-15, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 16, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 18. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-17 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-часть.

Вариант осуществления 19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 18, где Fc-часть содержит мутацию, которая усиливает связывание с FcRn (например, человека) по сравнению с эталонной Fc-частью, которая не содержит мутацию.

Вариант осуществления 20. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 18 или 19, где Fc-часть содержит мутацию, которая усиливает связывание с FcγR (например, человека) по сравнению с эталонной Fc-частью, которая не содержит мутацию.

Вариант осуществления 21. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 18-20, где Fc-часть является Fc-частью IgG-изотипа или происходит из IgG-изотипа.

Вариант осуществления 22. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 21, где мутация, которая усиливает связывание с FcRn, включает: M428L; N434S; N434H; N434A; N434S; M252Y; S254T; T256E; T250Q; P257I; Q311I; D376V; T307A; E380A или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 23. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 21 или 22, где мутация, которая усиливает связывание с FcRn, включает: (i) M428L/N434S; (ii) M252Y/S254T/T256E; (iii) T250Q/M428L; (iv) P257I/Q311I; (v) P257I/N434H; (vi) D376V/N434H; (vii) T307A/E380A/N434A или (viii) любую комбинацию (i)-(vii).

Вариант осуществления 24. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 23, где мутация, которая усиливает связывание с FcRn, включает M428L/N434S.

Вариант осуществления 25. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 20-24, где мутация, которая усиливает связывание с FcγR, включает S239D; I332E; A330L; G236A или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 26. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 25, где мутация, которая усиливает связывание с FcγR, включает: (i) S239D/I332E; (ii) S239D/A330L/I332E; (iii) G236A/S239D/I332E или (iv) G236A/A330L/I332E.

Вариант осуществления 27. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 25 или 26, где мутация, которая усиливает связывание с FcγR, включает или состоит в G236A/A330L/I332E.

Вариант осуществления 28. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 18-27, где Fc-часть содержит мутации с заменой аминокислоты: M428L; N434S; G236A; A330L и I332E.

Вариант осуществления 29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:41; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:89,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

Вариант осуществления 30. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 29, дополнительно содержащие Fc-часть.

Вариант осуществления 31. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 30, где Fc-часть происходит из IgG-изотипа и содержит мутации с заменой M428L и N434S.

Вариант осуществления 32. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 30 или 31, где Fc-часть происходит из IgG-изотипа и содержит мутации с заменой G236A, A330L и I332E.

Вариант осуществления 33. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 32, где Fc-часть содержит мутации с заменой M428L, N434S, G236A, A330L и I332E.

Вариант осуществления 34. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-10, 15-33, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) согласно SEQ ID NO: 91.

Вариант осуществления 35. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-10 и 15-32, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) согласно SEQ ID NO: 92.

Вариант осуществления 36. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-3, 6, 7, 9, 10 и 15-35, содержащие аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) согласно SEQ ID NO:93.

Вариант осуществления 37. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно

любому из вариантов осуществления 1, 2, 4, 6, 8, 11 и 15-28, содержащие аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) согласно SEQ ID NO:94.

Вариант осуществления 38. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 34 или 36, содержащие аминокислотную последовательность HC согласно SEQ ID NO:91 и аминокислотную последовательность LC согласно SEQ ID NO:93.

Вариант осуществления 39. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 35 или 37, содержащие аминокислотную последовательность HC согласно SEQ ID NO:92 и аминокислотную последовательность LC согласно SEQ ID NO:94.

Вариант осуществления 40. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 34 или 37, содержащие аминокислотную последовательность HC согласно SEQ ID NO:91 и аминокислотную последовательность LC согласно SEQ ID NO:94.

Вариант осуществления 41. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 35 или 36, содержащие аминокислотную последовательность HC согласно SEQ ID NO:92 и аминокислотную последовательность LC согласно SEQ ID NO:93.

Вариант осуществления 42. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:91; и

(ii) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:93,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализует инфекцию вирусом гепатита В и вирусом гепатита дельта.

Вариант осуществления 43. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-42, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает HBsAg генотипа, выбранного из генотипов HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J, или любой их комбинации.

Вариант осуществления 44. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-43, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент снижает сывороточную концентрацию ДНК HBV у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Вариант осуществления 45. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-44, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент снижает сывороточную концентрацию HBsAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Вариант осуществления 46. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно

любому из вариантов осуществления 1-45, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент снижает сывороточную концентрацию HBeAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Вариант осуществления 47. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-46, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент снижает сывороточную концентрацию HBcrAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Вариант осуществления 48. Набор, содержащий:

(i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-47; и

(ii) инструкции по применению компонента для предупреждения, лечения, смягчения и/или диагностики инфекции гепатитом В и/или инфекции гепатитом D.

Вариант осуществления 49. Набор согласно варианту осуществления 48, дополнительно содержащий:

(i) ингибитор полимеразы, где ингибитор полимеразы необязательно включает ламивудин, адефовир, энтекавир, телбувидин, тенофовир или любую их комбинацию;

(ii) интерферон, где интерферон необязательно включает IFN-бета и/или IFN-альфа;

(iii) ингибитор точки контроля, где ингибитор точки контроля необязательно включает антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент и/или антитело против CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент;

(iv) агонист стимулирующей иммунной точки контроля; или

(v) любую комбинацию (viii)-(xii).

Вариант осуществления 50. Набор согласно варианту осуществления 49, где ингибитор полимеразы включает ламивудин.

Вариант осуществления 51. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-47 для производства лекарственного средства для предупреждения, лечения, смягчения и/или диагностики инфекции гепатитом В и/или инфекции гепатитом D у индивидуума.

Вариант осуществления 52. Способ лечения, предупреждения и/или смягчения инфекции гепатитом В и/или гепатитом D у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества: (i) антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-47.

Вариант осуществления 53. Способ согласно варианту осуществления 52, дополнительно включающий введение индивидууму одного или нескольких из: ингибитора полимеразы, где ингибитор полимеразы необязательно включает ламивудин, адефовир, энтекавир, телбувидин, тенофовир или любую их комбинацию; интерферон, где интерферон необязательно включает IFN-бета и/или IFN-альфа; ингибитор точки контроля, где ингибитор точки контроля необязательно включает антитело против PD-1

или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент и/или антитело против CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент; агонист стимулирующей молекулы иммунной точки контроля или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 54. Способ согласно варианту осуществления 52 или 53, где инфекция вирусом гепатита В представляет собой хроническую инфекцию вирусом гепатита В.

Вариант осуществления 55. Способ согласно любому из вариантов осуществления 52-54, где индивидууму проводят трансплантацию печени.

Вариант осуществления 56. Способ согласно любому из вариантов осуществления 52-55, где индивидуум не является иммунизированным против гепатита В.

Вариант осуществления 57. Способ согласно любому из вариантов осуществления 52-56, где индивидуумом является новорожденный.

Вариант осуществления 58. Способ согласно любому из вариантов осуществления 52-57, где индивидууму проводят или проводили гемодиализ.

Вариант осуществления 59. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO:34, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO:35 или 66, аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO:36;

вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность CDRL1 согласно SEQ ID NO:37, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно SEQ ID NO:38 или 39 и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO:58 или 40; и

Fc-часть, где Fc-часть содержит G236A/A330L/I332E.

Вариант осуществления 60. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 59, где Fc-часть не содержит S239D.

Вариант осуществления 61. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 59 или 60, где Fc-часть дополнительно содержит M428L/N434S.

Вариант осуществления 62. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 59-61, где V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO:41 или 67 и где V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO:42, 59, 65, 89, 90 и 111-120.

Вариант осуществления 63. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO:97, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO:98, аминокислотную

последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO:99;

(ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность CDRL1 согласно SEQ ID NO:100, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно SEQ ID NO:100 и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO:102; и

(iii) Fc-часть, где Fc-часть содержит G236A/A330L/I332E.

Вариант осуществления 64. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 63, где Fc-часть не содержит S239D.

Вариант осуществления 65. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 63 или 64, где Fc-часть дополнительно содержит M428L/N434S.

Вариант осуществления 66. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 63-65, где V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:95, и где V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO:96.

Вариант осуществления 67. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 63-66, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент: (i) имеет усиленное связывание с Fc γ RIIA человека, Fc γ RIIA человека или обоими из них, по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E, где Fc γ RIIA человека необязательно представляет собой H131 или R131, и/или Fc γ RIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158; (ii) имеет сниженное связывание с Fc γ RIIB человека по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E; (iii) не связывается с Fc γ RIIB человека; имеет сниженное связывание с C1q человека по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E; не связывается с C1q человека; активирует Fc γ RIIA, Fc γ RIIA человека или оба из них в большей степени, чем эталонный полипептид, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E, где Fc γ RIIA человека необязательно представляет собой H131 или R131, и/или Fc γ RIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158; не активирует Fc γ RIIB человека; и/или активирует натуральные киллеры (NK) человека в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный полипептид, который включает Fc-часть, которая не содержит G236A/A330L/I332E.

Вариант осуществления 68. Способ лечения инфекции вирусом гепатита В у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму однократной дозы композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-47 или 59-67 в дозе 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 мг/кг или более антитела или антигенсвязывающего фрагмента или в дозе вплоть до 75 мг (т.е. включая любую целочисленную или нецелочисленную дозу вплоть до 75 мг), вплоть до 300 мг или вплоть до 900 мг антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 69. Способ согласно варианту осуществления 68, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) согласно SEQ ID NO:91 и аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) согласно SEQ ID NO:93.

Вариант осуществления 70. Способ согласно варианту осуществления 68 или 69, где перед введением композиция содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент в дозе 150 мг/мл необязательно в стерильной воде, и дополнительно содержит 20 мМ гистидин, 7% сахарозу и 0,02% PS80 при pH 6.

Вариант осуществления 71. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-70, где индивидиум: (i) имеет возраст от 18 до 65 лет или старше; (ii) имеет массу тела от ≥ 40 кг до ≤ 125 кг; (iii) имеет хроническую инфекцию HBV, где хроническая инфекция HBV определяется: положительным сывороточным HBsAg, ДНК HBV или HBeAg 2 раза с интервалом по меньшей мере 6 месяцев на основе предшествующей или текущей лабораторной документации (или положительный результат на основе любой комбинации этих тестов, проведенных с интервалом по меньшей мере 6 месяцев); (iv) не имеет цирроза; (v) получает терапию нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы (NTRI) в течение по меньшей мере 4 месяцев (120 суток) перед введением однократной дозы, где терапия NTRI необязательно включает тенофовир дисопроксил/тенофовир алафенамид, энтекавир, ламивудин или адефовир/адефовир дипивоксил; (vi) имел ДНК HBV < 100 МЕ/мл не более чем за 4 недели (28 суток) до введения однократной дозы; (vii) имел HBsAg $>$ нижнего предела детекции не более чем за 4 недели (28 суток) до введения однократной дозы; (viii) имел HBsAg < 1000 МЕ/мл не более чем за 4 недели (28 суток) до введения однократной дозы; (ix) имел HBsAg ≥ 1000 МЕ/мл не более чем за 4 недели (28 суток) до введения однократной дозы; (x) был отрицательным по HBeAg не более чем за 4 недели (28 суток) до введения однократной дозы; (xi) был негативным в отношении антител против гепатита В не более чем за 4 недели (28 суток) до введения однократной дозы; (xii) имеет уровень аланинаминотрансферазы $< 2 \times \text{ULN}$; или (xiii) имеет любую комбинацию (i)-(xii).

Вариант осуществления 72. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-71, где введение включает подкожную инъекцию.

Вариант осуществления 73. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-72, где через 8 недель после введения однократной дозы индивидиум имеет > 2 -кратное снижение HBsAg по сравнению с периодом от 0 суток до 4 недель (28 суток) до введения.

Вариант осуществления 74. Способ лечения инфекции вирусом гепатита В (HBV) у индивидиума, причем способ включает введение индивидиуму однократной дозы фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-47 или 59-67, где необязательно, антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO.:91 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO.:93.

Вариант осуществления 75. Способ согласно варианту осуществления 74, где

однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в диапазоне от 2 до 18 мг/кг (массы тела индивидуума).

Вариант осуществления 76. Способ согласно варианту осуществления 74 или 75, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 6 мг, вплоть до 18 мг, вплоть до 75 мг, вплоть до 90 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 900 мг или вплоть до 3000 мг антитела.

Вариант осуществления 77. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-76, где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в концентрации в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл, как например, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.

Вариант осуществления 78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-77, где однократная доза фармацевтической композиции содержит приблизительно 75 мг антитела.

Вариант осуществления 79. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-78, где однократная доза фармацевтической композиции содержит приблизительно 90 мг антитела.

Вариант осуществления 80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-78, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 300 мг антитела.

Вариант осуществления 81. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-78, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 900 мг антитела.

Вариант осуществления 82. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-78, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 3000 мг антитела.

Вариант осуществления 83. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-82, где способ включает введение однократной дозы посредством подкожной инъекции.

Вариант осуществления 84. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-83, где способ включает введение однократной дозы посредством внутривенной инъекции.

Вариант осуществления 85. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-84, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду, необязательно воду USP.

Вариант осуществления 86. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-85, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит гистидин, необязательно в концентрации в диапазоне от 10 mM до 40 mM, как например, 20 mM, в фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 87. Способ согласно любому из вариантов осуществления

74-86, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит дисахарид, такой как сахароза, необязательно в количестве 5%, 6%, 7%, 8% или 9%, предпочтительно приблизительно 7% (масс./об.).

Вариант осуществления 88. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-87, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество или триблоксополимер, необязательно полисорбат или полоксамер-188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), где необязательно полисорбат или полоксамер-188 присутствует в диапазоне от 0,01% до 0,05% (масс./об.), предпочтительно 0,02% (масс./об.).

Вариант осуществления 89. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-88, где фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от 5,8 до 6,2, в диапазоне от 5,9 до 6,1, или 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2.

Вариант осуществления 90. Способ согласно варианту осуществления 89, где фармацевтическая композиция содержит:

- (i) антитело в дозе 150 мг/мл;
- (ii) воду USP;
- (iii) 20 мМ гистидин;
- (iv) 7% сахарозу; и
- (v) 0,02% PS80,

где фармацевтическая композиция имеет pH 6.

Вариант осуществления 91. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-90, где индивидуумом является взрослый.

Вариант осуществления 92. Способ согласно варианту осуществления 74-91, где возраст индивидуума находится в диапазоне от 18 лет до 65 лет.

Вариант осуществления 93. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-92, где масса тела индивидуума составляет от 40 кг до 125 кг.

Вариант осуществления 94. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-93, где индивидуум имеет хроническую инфекцию HBV; например, определяемую положительным сывороточным HBsAg, ДНК HBV и/или HBeAg 2 раза, где интервал между 2 разами составляет по меньшей мере 6 месяцев.

Вариант осуществления 95. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-94, где индивидуум не имеет цирроза.

Вариант осуществления 96. Способ согласно варианту осуществления 95, где отсутствие цирроза определяют посредством: оценки с использованием Fibroscan (например, в пределах 6 месяцев перед введением однократной дозы фармацевтической композиции); или биопсии печени (например, в пределах 12 месяцев перед введением однократной дозы фармацевтической композиции), где предпочтительно отсутствие цирроза определяют по отсутствию фиброза F3 или отсутствию цирроза F4 Metavir.

Вариант осуществления 97. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-96, где индивидууму вводят нуклеотидный(нуклеозидный) ингибитор обратной

транскриптазы (NRTI), необязательно в пределах 120 суток, кроме того, необязательно в пределах 60 суток перед введением однократной дозы.

Вариант осуществления 98. Способ согласно варианту осуществления 97, где NRTI включает один или несколько из: тенофовира; тенофовира диспроксила (например, тенофовира диспроксида фумарата); тенофовира алафенамида; энтекавира; ламивудина; адефовира и адефовира дипивоксила.

Вариант осуществления 99. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-98, где индивидуум имеет сывороточную концентрацию ДНК HBV менее 100 МЕ/мл не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 100. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-99, где индивидуум имеет сывороточную концентрацию HBsAg менее 1000 МЕ/мл перед введением однократной дозы.

Вариант осуществления 101. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-99, где индивидуум имеет сывороточную концентрацию HBsAg, превышающую или равную 1000 МЕ/мл не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 102. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-101, где индивидуум был негативным по е-антигену HB (HBeAg) не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 103. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-102, где индивидуум был негативным в отношении антител против HBs не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 105. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-103, где индивидуум перед введением однократной дозы: (i) не имеет фиброза и/или не имеет цирроза; и/или (ii) имеет уровень аланинаминотрансферазы (ALT) $< 2 \times$ верхний предел нормы (ULN).

Вариант осуществления 106. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-105, где 56 суток после введения однократной дозы индивидуум имеет >2 -кратное снижение сывороточного HBsAg (например, концентрация HBsAg в сыворотке, например, при определении с использованием анализа Abbott ARCHITECT) по сравнению с сывороточным HBsAg индивидуума за от 0 суток до 28 суток до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 107. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-106, где после введения однократной дозы (например, через 56 суток после введения однократной дозы) индивидуум: (i) имеет сниженное или менее тяжелое внутрипеченочное распространение HBV по сравнению с референтным индивидуумом; и/или (ii) имеет адаптивный иммунный ответ против HBV.

Вариант осуществления 108. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-107, где индивидуумом является мужчина.

Вариант осуществления 109. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-107, где индивидуумом является женщина.

Вариант осуществления 110. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO.:91 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO.:93, где фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл, как например, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл, или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.

Вариант осуществления 111. Фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 110, где фармацевтическая композиция содержит вплоть до 6 мг, вплоть до 18 мг, вплоть до 75 мг, вплоть до 90 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 900 мг или вплоть до 3000 мг антитела.

Вариант осуществления 112. Фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 110 или 111, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 75 мг антитела.

Вариант осуществления 113. Фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 110 или 111, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 90 мг антитела.

Вариант осуществления 114. Фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 110 или 111, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 300 мг антитела.

Вариант осуществления 115. Фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 110 или 111, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 900 мг антитела.

Вариант осуществления 116. Фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 110 или 111, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 3000 мг антитела.

Вариант осуществления 117. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов осуществления 110-116, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду, необязательно воду USP.

Вариант осуществления 118. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов осуществления 110-117, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит гистидин, необязательно в концентрации от 10 mM до 40 mM, такой как 20 mM, в фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 119. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов осуществления 110-118, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит дисахарид, такой как сахароза, необязательно в количестве 5%, 6%, 7%, 8% или 9%, предпочтительно приблизительно 7% (масс./об.).

Вариант осуществления 120. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов осуществления 110-119, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, необязательно полисорбат, предпочтительно

полисорбат 80 (PS80), где необязательно полисорбат присутствует в диапазоне от 0,01% до 0,05% (масс./об.), предпочтительно 0,02% (масс./об.).

Вариант осуществления 121. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов осуществления 110-120, где фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от 5,8 до 6,2, в диапазоне от 5,9 до 6,1, или 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2.

Вариант осуществления 122. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов осуществления 110-121, где фармацевтическая композиция содержит:

(i) антитело в дозе 150 мг/мл;

(ii) воду USP;

(iii) 20 mM гистидин;

(iv) 7% сахарозу; и

(v) 0,02% PS80,

где фармацевтическая композиция имеет pH 6.

ПРИМЕРЫ

Ниже приводятся конкретные примеры, иллюстрирующие варианты осуществления и аспекты изобретения. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем описании. Следующие способы получения и примеры приведены, чтобы позволить специалистам в данной области лучше понять и применять на практике настоящее изобретение. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается проиллюстрированными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации изобретения, в дополнение к описанным в настоящем описании, станут хорошо понятными специалистам в данной области из приведенного выше описания, прилагаемых чертежей и приведенных ниже примеров. Все такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1: Получение и тестирование модифицированных антител

Анализ некоторых вариантов антител HBC34 из публикации PCT № WO 2017/060504 выявил аминокислоту цистеин в положении 40 (нумерация IMGT) в варибельной области легкой цепи, которая является непарной и отражает потенциальную неустойчивость. Без связи с теорией, непарные остатки цистеина потенциально являются реакционноспособными и потенциально могут запускать агрегацию посредством внутримолекулярной перестановки и образования внутримолекулярного дисульфида. Конструировали варианты HBC34-V7 (WO 2017/060504), в которых аминокислота цистеин в положении 40 была заменена серином (тем самым получая "HBC34-V34") или аланином (тем самым получая "HBC34-V35"). Нуклеотидные последовательности, кодирующие эти дополнительные варианты антител, подвергали оптимизации кодонов и антитела экспрессировали в качестве IgG1 (аллотип g1m17, 1) в клетках ExpiCHO™ (ThermoFisher). Кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие домены VH и VL HBC34-V35, приведены в SEQ ID NO: 103 и 104, соответственно.

Способность HBC34-V34 и HBC34-V35 связывать антиген исследовали с использованием прямого ELISA связывания антигена. В качестве эталона для сравнения использовали HBC34-V7. Как показано на фиг.1, как HBC34-V34, так и HBC34-V35 эффективно связывались с двумя рекомбинантными антигенами HBsAg ("adw", верхняя панель; "adr", нижняя панель), и HBC34-V35 имело в высокой степени сходное связывание с исходным HBC34-V7.

Варианты антител исследовали в отношении связывания со всеми известными генотипами HBsAg ((A)-(J)). В кратком изложении, эпителиальные клетки человека (клетки Hep2) трансфицировали плазмидами, экспрессирующими каждый из HBsAg 10 генотипов HBV A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. Все антитела тестировали в нескольких концентрациях в отношении окрашивания временно трансфицированных пермеабилizированных клеток. Через двое суток после трансфекции клетки Hep2 собирали, фиксировали и переабилizировали посредством сапонины для иммунного окрашивания посредством HBC34 и пяти отобранных вариантов. В качестве эталона для сравнения использовали HBC34-V7. Связывание антител с трансфицированными клетками анализировали с использованием Becton Dickinson FACSCanto2 (BD Biosciences) посредством программного обеспечения FlowJo (TreeStar). Как показано на фиг.2A-2J, HBC34-V34 и HBC34-V35 распознавали все 10 генотипов HBsAg HBV. HBC34-V35 продемонстрировало в некоторой степени более сильное окрашивание, чем HBC34-V34.

Эти данные показывают, что варианты антител HBC34-V34 и HBC34-V35 широко распознают и связываются с HBsAG на уровнях, сравнимых с HBC34-V7.

Пример 2: Антитела HBC, имеющие модифицированные Fc-области, эффективно связываются с антигеном

Модификации в Fc-области могут обеспечивать преимущества терапевтическому антителу. HBC34-V35 экспрессировали в качестве IgG1 с Fc дикого типа или с Fc, содержащим мутацию "MLNS" (M428L/N434S) или с MLNS в комбинации с "GAALIE" (G239A/A330L/I332E). Каждую конструкцию тестировали в отношении связывания с рекомбинантным HBsAg (adw) в двух отдельных экспериментах ELISA для определения связывания антигена. Тестировали три (3) партии HBC34-v35 (Fc дикого типа). Тестировали две (2) партии HBC34-V35-MLNS и две (2) партии HBC34-V35-MLNS-GAALIE. В качестве эталона для сравнения тестировали HBC34v7 (одна партия).

Как показано на фиг.3A и 3B внесенные мутации Fc не влияли на активность HBC34-V35 в отношении связывания антигена. Величины EC50 варьировались несколько между различными конструкциями и двумя экспериментами, но в общем были низкими.

Пример 3: Дополнительные функциональные исследования

Исследования нейтрализации *in vitro* и *in vivo* проводят с использованием HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE. В одном испытании антитела тестируют в отношении активности нейтрализации с использованием инфицированных HBV клеток мыши PXB. В другом исследовании антитела тестируют с использованием гепатоцитов человека, инфицированных HBV генотипа C.

Для обоих исследований в качестве положительного контроля используют Hebsbulin (иммуноглобулин человека против гепатита В). Следующие данные получают в несколько моментов времени: количественное определение ДНК HBV; количественное определение HBsAg; количественное определение HBeAg и количественное определение hAlb.

Пример 4: Идентификация и охарактеризация моноклонального антитела человека HBC24

Моноклональное антитело человека выделяли аналогично тому, как описано в Traggiai E. et al., 2004, Nat Med 10(8): 871-5, от пациента-человека. Антитело охарактеризовывали путем определения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей его вариабельных областей и определяющих комплементарность областей (CDR) в нем, и назвали "HBC24". Таким образом, HBC24 представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1-типа, имеющее последовательности CDR, V_H и V_L , как показано выше в таблице 3. Иллюстративные нуклеотидные последовательности, кодирующие V_H и V_L HBC24, приведены в таблице 4.

Пример 5: Выведение антигенов HB и ингибирование вхождения вируса в модели на мышах

Иммунодефицитную мышь, которой трансплантировали гепатоциты человека, использовали для тестирования эффективности антител против HBV по настоящему изобретению в отношении выведения HBsAg. В кратком изложении, первичные гепатоциты человека трансплантировали мышам SCID, у которой гепатоциты мыши предварительно были разрушены ферментативным путем. Мыши имели дефицит Т- и В-клеток. Эта модель является пригодной для исследования инфекции HBV, включая вхождение, распространение, регуляцию cccDNA, присущего гепатоцитам иммунного ответа и встраивания вируса в геном хозяина.

Мышам инокулировали посредством инъекции в хвостовую вену штамма gAAV8-1.3HBV ауw, D-типа, в количестве $1,0 \times 10^7$ вирусных геномов на мышь на -28. На сутки 0 лечения мышам, инфицированным AAV/HBV ($n=4$ на группу введения), вводили PBS (контроль) или HBC34-v35 (1, 5 или 15 мг/кг в/б, 2х/неделя). Антитела подвергали муринизации за исключением антигенсвязывающих Fab-областей.

Сбор образцов плазмы и сыворотки проводили периодически в ходе исследования и вирусной нагрузки ДНК HBV (посредством ПЦР) и HB Ag (HBsAg, HBeAg, HBcrAg). Мышей умерщвляли на 6 неделе. Как показано на фиг.4-7 лечение наиболее высокой дозой HBC34-v35 снижало вирусную нагрузку и вхождение вируса в гепатоциты.

Пример 6: Получение вариантов HBC24, подвергнутых модификации на уровне зародышевой линии, и функциональное тестирование

HBC24 анализируют в отношении присутствия соматических мутаций в вариабельной области относительно последовательности зародышевой линии. Идентифицированные мутации преобразуют обратно в последовательность зародышевой линии с получением вариантов HBC24. HBC24 и варианты тестируют в отношении

связывания (in vitro) и нейтрализации (in vitro; in vivo) серотипов HBV и HBD с использованием способов анализа, как описано в примерах 1 и 3.

Пример 7: Внесение модификаций Fc в HBC24 и варианты

Далее получают варианты HBC24, которые содержат мутации MLNS и GAALIE в обоих мономерах Fc. Аминокислотные последовательности HC выбранных вариантов приведены в SEQ ID NO: 120 и 121. Варианты исследуют в отношении: (1) связывания с антигеном in vitro; (2) нейтрализации серотипов HBV in vitro с использованием способов анализа, как описано в примерах 1 и 3.

Пример 8: Испытания эффекторных функций in vitro

Испытания in vitro проводили для исследования способности антител HBC34 с модифицированной Fc к: (1) связыванию с FcγR человека и с комплементом; (2) активации FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa; и (3) способствования ADCC и активации натуральных киллеров (NK) человека. Используемые тестируемые изделия, клеточные линии и реагенты были такими, как описано в таблицах 5-7 ниже. В этом примере используются следующие сокращенные обозначения: GLP=Надлежащая лабораторная практика; ADCC=антителозависимая клеточная цитотоксичность; ADCP=антителозависимый клеточный фагоцитоз; Fc=фрагмент кристаллизуемый; HBsAg=поверхностный антиген гепатита В; mAb=моноклональное антитело; PBS=фосфатно-солевой буфер; UHPL-SEC=сверхвысокоэффективная жидкостная эксклюзионная хроматография; ATCC=Американская коллекция типовых культур; FcγRs=рецептор(ы) Fc-гамма; клетки CHO=клетка яичника китайского хомячка; RLU=относительные единицы люминесценции; BLI=биослойная интерферометрия.

Таблица 5. Тестируемые образцы

Тестируемый образец	HBC34v35-MLNS
Изотип	IgG1k
Относительная молекулярная масса	≈150 кДа
Концентрация	3,47 мг/мл
Источник	Собственного производства
Условия содержания и хранения	Кратковременное хранение при 4°C, длительное хранение при -80°C
Буфер для составления	PBS, pH 7,2
Тестируемы образец	HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Изотип	IgG1k
Относительная молекулярная масса	≈150 кДа
Концентрация	2,1 мг/мл/0,86 мг/мл
Источник	Собственного производства
Условия содержания и хранения	Кратковременное хранение при 4°C,

	длительное хранение при -80°C
Буфер для составления	PBS, pH 7,2
Тестируемое изделие	HBC34v35-LALA
Изотип	IgG1k
Относительная молекулярная масса	≈150 кДа
Концентрация	1,2 мг/мл
Источник	Собственного производства
Условия содержания и хранения	Кратковременное хранение при 4°C, длительное хранение при -80°C
Буфер для составления	PBS, pH 7,2
Тестируемый образец	mAb 17.1.41
Изотип	IgG1k
Относительная молекулярная масса	≈150 кДа
Концентрация	4,4 мг/мл
Источник	Собственного производства
Условия содержания и хранения	Кратковременное хранение при 4°C, длительное хранение при -80°C
Буфер для составления	PBS, pH 7,2

Таблица 6. Клеточные линии

Клеточная линия	PLC/PRF/5
Каталожный номер	#4325-FC-050
Концентрация	100 мкг/мл
Источник	R&D Systems, клеточная линия миеломы мыши, происходящая из NS0, с С-концевой 6-His-меткой
Стабильность	Стабильная при -20-80°C
Условия содержания и хранения	Хранение при -80°C до применения, 1 месяц, от 2 до 8°C в стерильных условиях после восстановления
Буфер для составления	PBS
Клеточная линия	Jurkat-FcγRIIIa (F158)
Тканевое происхождение	Иммортализованная линия Т-лимфоцитов человека; клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa,

	вариант F158 (низкоаффинный) и элемент ответа NFAT, контролирующий экспрессию люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток
Источник	Promega (каталожный номер: G9798)
Среда для анализа	RPMI1640, дополненная 4% сывороткой с низким содержанием IgG
Клеточная линия	Jurkat-FcγRIIA (V158)
Тканевое происхождение	Иммortalизованная линия Т-лимфоцитов человека; клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIA, вариант F158 (низкоаффинный) и элемент ответа NFAT, контролирующий экспрессию люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток
Источник	Promega (каталожный номер: G7018)
Среда для анализа	RPMI1640, дополненная 4% сывороткой с низким содержанием IgG
Клеточная линия	Jurkat-FcγRIIA (H131)
Тканевое происхождение	Иммortalизованная линия Т-лимфоцитов человека; клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIA, вариант H131 (высокоаффинный) и элемент ответа NFAT, контролирующий экспрессию люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток
Источник	Promega (каталожный номер: G9995)
Среда для анализа	RPMI1640, дополненная 4% эмбриональной телячьей сывороткой с низким содержанием IgG
Клеточная линия	Jurkat-FcγRIIb
Тканевое происхождение	Иммortalизованная линия Т-лимфоцитов человека; клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIb и

	элемент ответа NFAT, контролирующей экспрессию люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток
Источник	Promega (каталожный номер: CS1781E02)
Среда для анализа	RPMI1640, дополненная 4% эмбриональной телячьей сывороткой с низким содержанием IgG
Клеточная линия	Свежевыделенные НК-клетки человека
Тканевое происхождение	Цельная кровь (EDTA) из донора НМ_WB019 (генотипированная в отношении FcγRIIIa F/V), очищенная с использованием набора MACSxpress NK Isolation Kit от Miltenyi Biotec (#130-098-185)
Источник	Собственного производства
Среда для анализа	AIM-V
Среда для роста	RPMI1640, дополненная 4% эмбриональной телячьей сывороткой с низким содержанием IgG, Glutamax
Условия выращивания	37°C, 5% CO ₂
Клеточная линия	Свежевыделенные НК-клетки человека
Тканевое происхождение	Цельная кровь (EDTA) из донора НМ_WB002 (генотипированная в отношении FcγRIIIa V/V), очищенная с использованием набора MACSxpress NK Isolation Kit от Miltenyi Biotec (#130-098-185)
Источник	Собственного производства
Среда для анализа	AIM-V
Среда для роста	RPMI1640, дополненная 4% эмбриональной телячьей сывороткой с низким содержанием IgG, Glutamax
Условия выращивания	37°C, 5% CO ₂
Клеточная линия	Свежевыделенные НК-клетки человека

Тканевое происхождение	Цельная кровь (EDTA) из донора HM_WB018 (генотипированная в отношении FcγRIIIa F/F), очищенная с использованием набора MACSxpress NK Isolation Kit от Miltenyi Biotec (#130-098-185)
Источник	Собственного производства
Среда для анализа	AIM-V
Среда для роста	RPMI1640, дополненная 4% эмбриональной телячьей сывороткой с низким содержанием IgG, Glutamax
Условия выращивания	37°C, 5% CO ₂

Таблица 7. Другие реагенты

Реагент	Рекомбинантный FcγRIIIa человека (V158)
Каталожный номер	#4325-FC-050
Концентрация	100 мкг/мл
Источник	R&D Systems, клеточная линия миеломы мыши, происходящая из NS0, с С-концевой 6-His-меткой
Стабильность	Стабилен при -20-80°C
Условия содержания и хранения	Хранить при -80°C до применения, 1 месяц, от 2 до 8°C в стерильных условиях после восстановления
Буфер для составления	PBS
Реагент	Рекомбинантный FcγRIIIa человека (F158)
Каталожный номер	10389-H08H
Концентрация	200 мкг/мл (после восстановления)
Источник	Sino Biological, происходящий из HEK293 с С-концевой 6-His-меткой
Стабильность	Стабилен при -20-80°C
Условия содержания и хранения	Хранить при -80°C до применения
Буфер для составления	PBS

Реагент	Рекомбинантный FcγRIIa человека (H131)
Каталожный номер	10374-H08C1
Концентрация	200 мкг/мл (после восстановления)
Источник	Sino Biological, происходящий из HEK293 с С-концевой 6-His-меткой
Стабильность	Стабилен при -20-80°C
Условия содержания и хранения	Хранить при -80°C до применения
Буфер для составления	PBS
Реагент	Рекомбинантный FcγRIIa человека (H131)
Каталожный номер	10374-H08B
Концентрация	200 мкг/мл (после восстановления)
Источник	Sino Biological, происходящий из HEK293 с С-концевой 6-His-меткой
Стабильность	Стабилен при -20-80°C
Условия содержания и хранения	Хранить при -80°C до применения
Буфер для составления	PBS
Реагент	Рекомбинантный human FcγRIIb
Каталожный номер	10259-H08C
Концентрация	200 мкг/мл (после восстановления)
Источник	Sino Biological, происходящий из HEK293 с С-концевой 6-His-меткой
Стабильность	Стабилен при -20-80°C
Условия содержания и хранения	Хранить при -80°C до применения
Реагент	Компонент комплемента C1q человека
Каталожный номер	204873
Концентрация	1,17 мг/мл
Источник	Sigma-Aldrich, получен из сыворотки человека
Стабильность	Стабилен при -80°C
Условия содержания и хранения	Хранить при -80°C до применения
Буфер для составления	10 mM HEPES с 0,3 M NaCl, pH 7,2
Реагент	Источник

PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Швейцария
Среда AIM-V	Gibco
Среда Хэма F-12K	Gibco
Набор для выделения NK-клеток MACSxpress® NK Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Germany
Набор для определения цитотоксичности (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Швейцария
96-луночные планшеты с круглым дном	Corning
Белый 96-луночный планшет с плоским дном	PerkinElmer
384-луночные планшеты с круглым дном	Corning
384-луночные планшеты с плоским дном	Corning
Спектрофотометр	Bio-Tek
Среда RPMI	Gibco
DMEM с высоким содержанием глюкозы со стабильным глутамином	Bioconcept
FBS	GE Healthcare
GlutaMax	Gibco
Трипсин-EDTA (0,05%), феноловый красный	Gibco
Prism7 Software Graph	Pad Software, Inc., La Jolla, CA
Triton X-100	Sigma
Буфер для анализа ADCC	Promega
Реагент для люциферазного анализа Bio- Glo-TM	Promega
Биоанализ ADCC	Promega
Буфер для промывания	PBS, 1% FBS
Формальдегид раствор, конц. 37%	Sigma (каталожный номер: F1635-500 ML)
Сапонин	Sigma (каталожный номер: S7900-100G)
Permeabilization buffer	0,5% сапонин, PBS, 1% FBS
вторичное Ab с Alexa Fluor® 647	AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti- Human IgG, специфичное к Fcγ-фрагменту (Jackson ImmunoResearch, каталожный номер: 109-606-098)

Вторичное Ab против CD107 с PE	Антитело против CD107 с PE (BioLegend, каталожный номер: 328608, клон H4A3, IgG1 мыши, каппа)
--------------------------------	---

Экспериментальные методики

Определение связывания с Fcγ-рецепторами человека

Связывание HBC34v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с FcγR человека определяли на устройстве Octet (BLI, биослойная интерферометрия). В кратком изложении, His-меченные FcγR человека (аллель FcγRIIa H131, аллель FcγRIIa R131, аллель FcγRIIa F158, аллель FcγRIIa V158 и FcγRIIb) в количестве 2 мкг/мл иммобилизовывали на датчиках с антителом против пента-His в течение 6 минут. Затем нагруженные FcγR датчики подвергали воздействию в течение 4 минут раствора буфера для кинетического анализа (pH 7,1), содержавшего 2 мкг/мл каждого mAb, в присутствии 1 мкг/мл affiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, специфичного к F(ab')₂ -фрагменту (для связывания mAb человека через Fab-фрагмент), с последующей стадией диссоциации в том же буфере в течение 4 дополнительных минут (правая часть графика). Измерение профилей ассоциации и диссоциации проводили в реальном времени в качестве изменения паттерна интерференции с использованием Octet RED96 (FortéBio).

Измерение связывание с белком комплемента C1q человека

Связывание HBC34v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE с комплементом человека определяли на устройстве Octet (BLI, биослойная интерферометрия). В кратком изложении, датчики с антителом против Fab человека (CH1-специфическим) использовали для иммобилизации, через Fab-фрагмент, полных IgG1-mAb HBC34v35 MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE в дозе 10 мкг/мл в течение 10 минут. Затем нагруженные IgG датчики подвергали воздействию в течение 4 минут раствора буфера для кинетического анализа (pH 7,1), содержавшего 3 мкг/мл очищенного C1q человека (левая часть графика), за которым следовала стадия диссоциации в том же буфере в течение 4 дополнительных минут (правая часть графика). Измерение профилей ассоциации и диссоциации проводили в реальном времени в качестве изменения паттерна интерференции с использованием Octet RED96 (FortéBio).

Получение NK-клеток человека из цельной крови

NK-клетки выделяли непосредственно перед применением из цельной крови с EDTA с использованием набора MACSxpress® NK isolation Kit в соответствии с инструкцией изготовителя. В кратком изложении, кровь с антикоагулянтом перемешивали в 50-мл пробирке с 15 мл коктейля для выделения NK и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре с использованием вращающего устройства при приблизительно 12 оборотах в минуту. Затем пробирку помещали в магнитное поле сепаратора MACSxpress® на 15 минут. Подвергнутые магнитному мечению клетки прилипают к стенке пробирки, в то время как агрегированные эритроциты оседают на дне. Затем NK-клетки, являющиеся мишенями, собирали из супернатанта, пока пробирка все

еще была внутри сепаратора MACSxpress®. NK-клетки центрифугировали, обрабатывали дистиллированной водой для удаления остаточных эритроцитов, вновь центрифугировали и, наконец, ресуспендировали в среде AIM-V.

Определение антителозависимого уничтожения NK-клеток

Mab подвергали серийному разведению в 10 раз в среде AIM-V от 100 мкг/мл до 0,001 мкг/мл. Клетки-мишени (PLC/PRF/5; MacNab, et al., British Journal of Cancer, 34(5), 1976) добавляли в круглодонный 384-луночный планшет в количестве $7,5 \times 10^3$ клеток/лунка в 23 мкл, затем подвергнутые серийному разведению антитела добавляли в каждую лунку (23 мкл на лунку), и смесь антитело/клетки инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. После инкубации добавляли NK-клетки человека с плотностью клеток $7,5 \times 10^4$ /лунка в 23 мкл, достигая соотношения эффектора и мишени 10:1. Также были включены контрольные лунки, которые использовали для измерения максимального лизиса (содержавшие клетки-мишени с 23 мкл 3% Triton x-100) и спонтанного лизиса (содержавшие клетки-мишени и эффекторные клетки без антитела). Планшеты инкубировали в течение 4 часов при 37°C с 5% CO₂. Клеточную смерть определяли путем измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) с использованием набора для детекции LDH в соответствии с инструкциями изготовителя. В кратком изложении, планшеты центрифугировали в течение 4 минут при 400×g и 35 мкл супернатанту переносили в 384-луночный планшет с плоским дном. Получали реагент LDH и 35 мкл добавляли в каждую лунку. С использованием протокола кинетического анализа, поглощение при 490 нм и 650 нм определяли раз в 2 минуты в течение 8 минут. Процентный специфический лизис определяли с использованием следующей формулы: $(\text{специфическое высвобождение} - \text{спонтанное высвобождение}) / (\text{максимальное высвобождение} - \text{спонтанное высвобождение}) \times 100$.

Определение антителозависимой активации NK-клеток

Активацию первичных NK-клеток тестировали с использованием свежeweделенных клеток от двух доноров, которые ранее генотипировали в отношении экспрессии гомозиготного высокоаффинного (аллель V158) или низкоаффинного (аллель F158) FcγRIIIa. Серийные разведения mAb (10-кратные серийные разведения в среде AIM-V от 100 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл) инкубировали с NK-клетками в течение 4 часов. Активацию NK-клеток определяли посредством проточной цитометрии путем окрашивания NK-клеток mAb против CD107a (антитело против CD107 с PE, BioLegend, использованное в разведении 1/35) в качестве функционального маркера активности NK-клеток.

Определение антителозависимой активации FcγRIIIa человека

Проводили серийные разведения HBC34v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE в 4 раза в буфере для анализа ADCC от 5 мкг/мл до 0,076 мкг/мл. Антиген-мишень (HBsAg от Engerix B, Glaxo SmithKline) добавляли в белый 96-луночный планшет с плоским дном в количестве 0,6 мкг/мл в 25 мкл, затем в каждую лунку добавляли серийные разведения антител (25 мкл на лунку), и смесь антитело/клетки инкубировали в

течение 10 минут при комнатной температуре. Эффекторные клетки для биоанализа ADCC размораживали и добавляли с клеточной плотностью $7,5 \times 10^4$ /лунка в 25 мкл (конечная концентрация HBsAg составляла 0,2 мкг/мл). Также были включены контрольные лунки, которые использовали для определения независимой от антитела активации (содержавшие HBsAg и эффекторные клетки, но не антитело) и спонтанной люминесценции планшета (лунки, содержавшие только буфер для анализа ADCC). Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C с 5% CO₂. Активация FcγRIIIa человека (варианты V158 или F158) в этом биоанализе приводит к опосредуемой NFAT экспрессии репортерного гена люциферазы. Измерение люминесценции проводили на люминометре с использованием реагента для анализа с люциферазой Bio-Glo™ в соответствии с инструкциями изготовителя. Данные (т.е. специфическую активацию FcγRIIIa) выражали в качестве среднего значения относительных единиц люминесценции (RLU) относительно фонового уровня с использованием следующей формулы: (RLU в концентрации × mAb - RLU фонового уровня).

Определение зависимой от антитела активации FcγRIIIa человека

HBC34v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE подвергали серийному разведению в 5 раз в буфере для анализа ADCP от 50 мкг/мл до 0,00013 мкг/мл. Антиген-мишень (HBsAg от Engerix B) добавляли в белый 96-луночный планшет с плоским дном в количестве 0,6 или 6 мкг/мл в 25 мкл, а затем в каждую лунку добавляли серийные разведения антител (25 мкл на лунку), и антиген/антитело инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре. Эффекторные клетки для биоанализа активации FcγRIIIa размораживали и добавляли при плотности клеток $50,0 \times 10^4$ /лунка в 25 мкл (конечная концентрация HBsAg составила 0,2 или 2 мкг/мл, соответственно). Также были включены контрольные лунки, которые использовали для определения независимой от антитела активации (содержавшие HBsAg и эффекторные клетки, но не антитело) и спонтанной люминесценции планшета (лунки, содержавшие только буфер для анализа ADCP). Планшеты инкубировали в течение 23 часов при 37°C с 5% CO₂. Активация FcγRIIIa человека (варианты H131) в этом биоанализе приводит к опосредуемой NFAT экспрессии репортерного гена люциферазы. Измерение люминесценции проводили на люминометре с использованием реагента для люциферазного анализа Bio-Glo™ в соответствии с инструкциями изготовителя. Данные (т.е. специфическую активацию FcγRIIIa) выражали в качестве среднего значения относительных единиц люминесценции (RLU) относительно фонового уровня с использованием следующей формулы: (RLU в концентрации [x] для mAb - RLU фонового уровня).

Определение антитело-зависимой активации FcγRIIb человека

HBC34v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE подвергали серийному разведению в 5 раз в буфере для анализа ADCP от 100 мкг/мл до 0,00026 мкг/мл. Антиген-мишень (HBsAg от Engerix B, Glaxo SmithKline) добавляли в белый 96-луночный планшет с плоским дном в количестве 3 мкг/мл в 25 мкл, затем в каждую лунку добавляли серийные разведения антител (25 мкл на лунку), и смесь антитело/клетки инкубировали в

течение 15 минут при комнатной температуре. Эффекторные клетки для биоанализа активации FcγRIIb размораживали и добавляли с клеточной плотностью $75,0 \times 10^4$ /лунка в 25 мкл (конечная концентрация HBsAg составляла 1 мкг/мл). Также были включены контрольные лунки, которые использовали для определения независимой от антитела активации (содержавшие HBsAg и эффекторные клетки, но не антитело) и спонтанной люминесценции планшета (лунки, содержавшие только буфер для анализа ADCC). Планшеты инкубировали в течение 20 часов при 37°C с 5% CO₂. Активация FcγRIIb человека в этом биоанализе приводит к опосредуемой NFAT экспрессии репортерного гена люциферазы. Измерение люминесценции проводили на люцинометре с использованием реагента для анализа с люциферазой Bio-Glo™ в соответствии с инструкциями изготовителя. Данные (т.е. специфическую активацию FcγRIIb) выражали в качестве среднего значения относительных единиц люминесценции (RLU) относительного фонового уровня с использованием следующей формулы: (RLU в концентрации × mAb - RLU фонового уровня).

Определение связывания антитела с клеточной линией гепатомы человека PLC/PRF/5

Клетки PLC/PRF/5 трипсинизировали в течение 5 мин при 37°C, переносили в 7 мл среды для выращивания, центрифугировали при 400×g, 4 мин, 4°C, и тщательно промывали 4°C в PBS. Некоторые клетки фиксировали 4% формальдегидом (20 минут при 4°C); другие фиксировали, а затем пермеабилizировали буфером для пермеабилзации (20 минут при 4°C). Клеточный осадок ресуспендировали в 2,64 мл буфера для промывания (фиксация клеток) или буфера для пермеабилзации (фиксация и пермеабилзация клеток) (таблица 7) и распределяли в количестве 200 мкл/лунка в 96-луночные планшеты с круглым дном (соответствующие 100000 клеток/лунка). Планшет центрифугировали при 400g, 4 мин, 4°C. В содержавшие клетки лунки добавляли серийные разведения тестируемых антител 1:5 из 5 точек, начиная с конечной концентрации 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 30 минут на льду. После 2 промываний при 4°C, 400×g, 4 мин в буфере для промывания (фиксация клеток) или буфере для пермеабилзации (фиксация и пермеабилзация клеток) к клеткам добавляли 50 мкл/лунка меченного Alexa Fluor® 647 вторичного антитела (таблица 7) и инкубировали в течение 20 мин на льду. Клетки промывали еще 2 раза буфером для промывания (фиксация клеток) или буфером для пермеабилзации (фиксация и пермеабилзация клеток), ресуспендировали в количестве 200 мкл/лунка буфера для промывания (фиксация клеток) или буфера для пермеабилзации (фиксация и пермеабилзация клеток) и сигнал (MFI, средняя интенсивность флуоресценции) количественно определяли с использованием цитофлуориметра (BD FACSCanto II).

Результаты

Прямые противовирусные механизмы являются важными для нейтрализации HBV *in vivo*. Непрямые, Fc-зависимые механизмы действия, опосредуемые взаимодействием Fc-областью с рецепторами Fc-гамма (FcγR) на иммунных клетках, также могут вносить

важный вклад в эффективность *in vivo* и опосредовать эндогенный иммунный ответ. FcγR-зависимые механизмы можно оценивать *in vitro* путем определения связывания с FcγR, а также антителозависимой активации FcγR человека (Hsieh, Y.-T., et al., *Journal of Immunological Methods*, 441(C), 56-66. doi.org/10.1016/j.jim.2016.12.002).

В этом исследовании HBC34v35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE сравнивали параллельно в отношении их способности связываться с полным набором FcγR человека (аллели V158 и F158 FcγRIIIa, аллели H131 и R131 FcγRIIa и FcγRIIb) с использованием биослойной интерферометрии (BLI Octet System, ForteBio). Как показано на фиг.8А-8Е, Fc, имеющий мутации MLNS-GAALIE, имеет измененные взаимодействия с FcγR; в частности, Fc, имеющий эти мутации, имеет усиленное связывание с FcγRIIIa и FcγRIIa, и сниженное связывание с FcγRIIb. Следует отметить, что связывание HBC34-V35-MLNS-GAALIE с C1q устранялось при определении посредством биослойной интерферометрии (фиг.9).

HBC34-V35-MLNS и HBC34-V35-MLNS-GAALIE также тестировали в отношении их способности активировать FcγRIIIa и FcγRIIa человека с использованием клеточных репортерных биоанализов. В этих анализах используются клетки Jurkat, модифицированные опосредуемым NFAT люциферазным репортером, для отображения активации FcγR человека. В то время как HBC34v35-MLNS слабо активировало или не активировало FcγRIIIa и FcγRIIa человека в присутствии HBsAg, HBC34-V35-MLNS-GAALIE продемонстрировало зависимость от дозы активацию всех протестированных FcγR (фиг.10А, 10В, 11А и 11В). Напротив, HBC34-V35-MLNS-GAALIE не активировало FcγRIIb даже при тестировании в количестве 100 мкг/мл (фиг.12).

Активность ADCC также определяли с использованием натуральных киллеров (NK), выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови человека одного донора, которого ранее генотипировали в отношении экспрессии гетерозиготного высокоаффинного (V158) и низкоаффинного (F158) FcγRIIIa (F/V). Для определения уничтожения клеточной линии гепатомы PLC/PR/5 под действием HBC34v35; HBC34v35-MLNS; HBC34-V35-MLNS-GAALIE; или другого mAb (17.1.41, нацеленного на другой эпитоп на антигенной петле HBsAg; см. Eren, R., et al., *Hepatology*, doi.org/10.1053/jhep.2000.9632; Galun, E., et al., *Hepatology*, doi.org/10.1053/jhep.2002.31867) использовали выделенные NK-клетки. Уничтожение в присутствии HBsAg-специфических mAb HBC34v35, HBC34v35-MLNS, HBC34-V35-MLNS-GAALIE и 17.1.41 не наблюдалось (фиг.13А). Выявленное отсутствие антителозависимого уничтожения клеток PLC/PR/5 может быть связано с низкой экспрессией HBsAg на поверхности этих клеток (фиг.13В), которая, без связи с теорией, может быть недостаточной для запуска уничтожения NK-клетками. Напротив, высокие уровни HBsAg были выявлены посредством HBC34v35 и 17.1.41, когда клетки PLC/PR/5 фиксировали и пермеабелизировали, что указывает на то, что основная часть HBsAg обнаруживалась либо внутриклеточно, либо в секретируемых формах (т.е. субвирусные частицы) (фиг.13В).

Активацию первичных NK-клеток человека (V/F) в присутствии HBC34v35-MLNS или HBC34-V35-MLNS-GAALIE и HBsAg также исследовали mAb против CD107a. Данные представлены на фиг.14А и 14В.

Эти данные *in vitro* показывают, что HBV-специфические связывающие белки по настоящему изобретению, имеющие мутацию Fc GAALIE, связывают и активируют низкоаффинный активирующий FcγRIIa и FcγRIIIa более эффективно, чем родительское антитело с Fc без GAALIE. Связывающие белки, содержащие GAALIE, также не связываются с или не активируют низкоаффинный ингибиторный FcγRIIb. Связывающие белки, содержащие GAALIE, также не связываются с C1q. Более того, связывающие белки, содержащие GAALIE, не способствуют ADCC на клетках гепатомы, а активируют NK-клетки человека в присутствии растворимого HBsAg.

Пример 9: Клиническое испытание HBC34-v35-MLNS-GAALIE фазы 1

Проводят многоцентровое рандомизированное плацебо-контролируемое испытание фазы 1 для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и противовирусной активности HBC34-v35-MLNS-GAALIE (содержащего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO:91 и аминокислотную последовательность легкой цепи, показанную в SEQ ID NO:93). Центры испытания являются следующими: часть А (одноцентровое) и части В/С (многоцентровое).

В части А (вплоть до 40 индивидуумов), основной задачей была оценка безопасности и переносимости HBC34-v35-MLNS-GAALIE у здоровых взрослых индивидуумов. Вторичными задачами была охарактеризация сывороточной фармакокинетики (PK) HBC34-v35-MLNS-GAALIE у здоровых взрослых индивидуумов и оценка иммуногенности (индукция антител против лекарственного средства [ADA]) HBC34-v35-MLNS-GAALIE у здоровых индивидуумов.

В частях В (вплоть до 56 индивидуумов) и С (вплоть до 24 индивидуумов), первичной задачей была оценка безопасности и переносимости HBC34-v35-MLNS-GAALIE у взрослых индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза. Вторичными задачами были: охарактеризация сывороточной PK HBC34-v35-MLNS-GAALIE у взрослых индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза; оценка противовирусной активности HBC34-v35-MLNS-GAALIE у взрослых индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза; и оценка иммуногенности (индукция ADA) HBC34-v35-MLNS-GAALIE у взрослых индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза. Поисковые цели включают: оценку эффекта HBC34-v35-MLNS-GAALIE на дополнительные вирусные параметры; оценку эффекта HBC34-v35-MLNS-GAALIE на иммунный ответ (или поисковых биомаркеров) у взрослых индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза; и оценку влияния полиморфизмов хозяина (или поисковых биомаркеров) на ответ на HBC34-v35-MLNS-GAALIE у взрослых индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза.

Детали критериев оценки

Для части А, первичные результаты этого исследования являются следующими:

- Частота нежелательных явлений, возникших в ходе лечения (TEAE).
- Клиническая оценка, включая, но не ограничиваясь ими, результаты лабораторных тестов.

Вторичные результаты этого испытания являются следующими:

- Параметры РК сывороточного свободного HBC34-v35-MLNS-GAALIE, например: C_{max} , C_{last} , T_{max} , T_{last} , AUC_{inf} , AUC_{last} , $\%AUC_{exp}$, $t_{1/2}$, λ_z , V_z (в/в только), CL (в/в только), V_z/F (п/к только) и CL/F (п/к только).
- Встречаемость и титры (в соответствующих случаях) ADA к HBC34v-35-MLNS-GAALIE.

Для частей В/С первичные результаты этого исследования являются следующими:

- Частота TEAE,
- Клиническая оценка, включая, но не ограничиваясь ими, результаты лабораторных тестов

Вторичные результаты этого испытания являются следующими:

- Параметры РК HBC34-v35-MLNS-GAALIE для свободного сывороточного и общего вещества, например: C_{max} , C_{last} , T_{max} , T_{last} , AUC_{inf} , AUC_{last} , $\%AUC_{exp}$, $t_{1/2}$, λ_z , V_z/F и CL/F .
- Частота и титры (в соответствующих случаях) ADA к HBC34-v35-MLNS-GAALIE
- максимальное снижение сывороточного HBsAg от исходного уровня (сутки 1 до введения дозы).

Поисковые конечные результаты этого испытания могут включать:

- Оценку дополнительных параметров вируса (например: РНК HBV и HBcrAg),
- анализ иммунных ответов хозяина,
- анализ факторов хозяина при определении посредством секвенирования РНК,
- полиморфизмы рецептора Fc-гамма ($Fc\gamma R$) при определении посредством генотипирования,
- аллотипы IgG при определении посредством генотипирования,

Планируемое количество индивидуумов

Часть А: вплоть до 40 здоровых взрослых индивидуумов.

Часть В: вплоть до 56 взрослых индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза на терапии нуклеозидным(нуклеотидным) ингибитором обратной транскриптазы (NRTI), которые являются негативными по HBsAg и которые имеют HBsAg < 1000 МЕ/мл.

Часть С: вплоть до 24 взрослых индивидуумов с хронической инфекцией HBV без цирроза на терапии NRTI, которые имеют HBsAg $\geq$ 1000 МЕ/мл.

Диагноз и основные критерии включения

Критерии включения в часть А включают:

Здоровые взрослые индивидуумы в возрасте от 18 (или возраст правового согласия в зависимости от того, что больше) до 55 лет с массой тела от $\geq$ 40 кг до $\leq$ 125 кг. Пациенты с хорошим состоянием здоровья, определенным из медицинского анамнеза

(например, хронические состояния, такие как гипертензия, гиперлипидемия, желудочно-пищеводное рефлюксное заболевание, астма, тревожность и депрессия должны хорошо контролироваться) и без клинически значимых данных физикального обследования, ЭКГ с 12 отведениями, основными показателями жизнедеятельности и лабораторными показателями. Женщины должны иметь отрицательный тест на беременность или подтверждение статуса постменопаузы. Статус постменопаузы определяют как 12 месяцев без менструаций без альтернативной медицинской причины. Женщины детородного возраста (WOCBP) должны иметь отрицательный результат теста крови на беременность при скрининге и отрицательный результат теста мочи на беременность на 1 сутки, не могут быть кормящими грудью и должны быть согласны применять высокоэффективные способы контрацепции, как описано в настоящем описании, за 14 суток до введения исследуемого лекарственного средства до 40 недель после введения исследуемого лекарственного средства.

Мужчины с женщинами-партнерами детородного возраста должны согласиться на 1 из следующих требований к контрацепции с момента введения исследуемого лекарственного средства до 40 недель после дозирования исследуемого лекарственного средства: вазэктомия с документированной азооспермией или частое использование мужского презерватива плюс применение партнером высокоэффективной контрацепции. Индивидуумы мужского пола должны согласиться не становиться донорами спермы от момента введения исследуемого лекарственного средства до 40 недель после введения исследуемого лекарственного средства. Пациенты должны согласиться не становиться донорами крови в ходе испытания.

Пациенты должны хотеть соблюдать требования лечения и быть способны предоставить информированное письменное согласие.

Критерии включения в часть В/С включают:

1. Возраст от 18 (или возраст правового согласия в зависимости от того, что старше) до 65 лет,
2. Масса тела от ≥ 40 кг до ≤ 125 кг с хронической инфекцией HBV (определяемой как: положительный сывороточный HBsAg, ДНК HBV или HBeAg 2 раза с интервалом по меньшей мере 6 месяцев на основе предшествующего или текущего лабораторного подтверждения (является приемлемой любая комбинация этих тестов, проведенных с интервалом 6 месяцев)),
3. Отсутствие цирроза,
4. Наличие терапии NRTI в течение по меньшей мере 2 месяцев в момент скрининга, отрицательный результат на HBeAg. Примеры терапии NRTI включают, но не ограничиваются ими: тенофовир дисопроксил/тенофовир алафенамид; энтекавир; ламивудин; адефовир/адефовир дипивоксил,
5. ДНК HBV < 100 МЕ/мл при скрининге,
6. HBsAg $>$ нижний предел обнаружения,
7. HBsAg < 1000 МЕ/мл (только часть В) при скрининге,

8. HBsAg $\geq$ 1000 МЕ/мл (только часть C) при скрининге,
9. отрицательный результат по HBeAg при скрининге (только часть B),
10. отрицательный результат на антитела против HBs при скрининге,
11. Помимо хронической инфекции HBV, состояние здоровья должно быть хорошим при определении из медицинского анамнеза (например, хронические состояния, такие как гипертензия, гиперлипидемия, желудочно-пищеводное рефлюксное заболевание, астма, тревожность и депрессия, должны хорошо контролироваться), и должны отсутствовать клинически значимые данные физикального обследования, ЭКГ с 12 отведениями, основных показателей жизнедеятельности и лабораторных величин.

12. Женщины должны иметь отрицательный тест на беременность или подтверждение статуса постменопаузы. Статус постменопаузы определяют как 12 месяцев без менструаций без альтернативной медицинской причины. Женщины детородного возраста должны иметь отрицательный результат теста крови на беременность при скрининге и отрицательный результат теста мочи на беременность на 1 сутки, не могут быть кормящими грудью и должны быть согласны применять высокоэффективные способы контрацепции, как описано в настоящем описании, за 14 суток до введения исследуемого лекарственного средства до 40 недель после введения исследуемого лекарственного средства.

13. Мужчины с женщинами-партнерами детородного возраста должны согласиться на 1 из следующих требований к контрацепции с момента введения исследуемого лекарственного средства до 40 недель после дозирования исследуемого лекарственного средства: вазэктомия с документированной азооспермией или частое использование мужского презерватива плюс применение партнером 1 из возможностей контрацепции, приведенных для контрацепции для WOCBP (см. в настоящем описании). Индивидуумы мужского пола также должны согласиться не становиться донорами спермы от момента введения исследуемого лекарственного средства до 40 недель после введения исследуемого лекарственного средства.

14. Пациенты должны хотеть соблюдать требования лечения и быть способны предоставить информированное письменное согласие.

Способы контроля рождаемости, которые считаются высокоэффективными, включают:

- Установившийся прием комбинированных (содержащих эстроген и прогестоген) пероральных, внутривагинальных и трансдермальных гормональных способов контрацепции, ассоциированных с ингибированием овуляции или установившийся прием пероральных, инъекционных или имплантируемых гормональных способов контрацепции на основе только прогестогена, ассоциированных с ингибированием овуляции. В настоящее время неизвестно, будет ли HBC34-v35-MLNS_GAALIE влиять на эффективность гормональных способов контрацепции; таким образом, рекомендуется применять дополнительную форму контрацепции (т.е. барьерного способа) на протяжении испытания и в течение 40 недель после введения исследуемого лекарственного средства,

- Установку внутриматочного устройства,
- Установку внутриматочной высвобождающей гормон системы,
- Хирургическую стерилизацию мужчины-партнера (с соответствующим документальным подтверждением после вазэктомии отсутствия спермы в эякуляте; для исследуемых женщин в испытании мужчина-партнер с вазэктомией должен быть единственным партнером для этой женщины),

- Истинное половое воздержание от гетеросексуального контакта, когда это согласуется с предпочтительным и обычным образом жизни индивидуума. Периодическое воздержание (например, календарь, овуляция, симптотермальный, послеовуляционный способы) и прерванный половой акт не являются приемлемыми способами контрацепции. Воздерживающиеся индивидуумы должны согласиться применять 1 из вышеупомянутых способов контрацепции, если они начинают сексуальные отношения в ходе испытания и в течение вплоть до 40 недель после введения исследуемого лекарственного средства или настолько долго, насколько индивидуум наблюдается в исследовании, в зависимости от того, что дольше.

- Барьерный способ в комбинации с гормональным контрацептивом, как описано выше.

Статус постменопаузы определяют как 12 месяцев без менструаций без альтернативной медицинской причины.

Мужчины с женщинами-партнерами детородного возраста должны согласиться на 1 из следующих требований к контрацепции с момента введения исследуемого лекарственного средства до 40 недель после дозирования исследуемого лекарственного средства:

- вазэктомия с документированной азооспермией,
- мужской презерватив плюс применение партнером 1 из возможных способов контрацепции, приведенных выше для контрацепции для WOCBP (гормональный контрацептив, внутриматочное устройство),

Индивидуумы мужского пола также должны согласиться не становиться донорами спермы от момента введения исследуемого лекарственного средства до 40 недель после введения исследуемого лекарственного средства.

Длительность участия в испытании

Часть: длительность лечения исследуемым лекарственным средством - однократная доза. Оцененное общее время в испытании, включая скрининг и наблюдение, для каждого индивидуума составляет вплоть до 28 недель.

Части В/С: длительность лечения исследуемым лекарственным средством - однократная доза. Оцененное общее время в испытании, включая скрининг и наблюдение, для каждого индивидуума составляет вплоть до 44 недель.

Длительность наблюдения

Часть А: всех индивидуумов наблюдают в течение 24 недель после введения исследуемого лекарственного средства.

Части В/С: Всех индивидуумов наблюдают в течение 8 недель после введения исследуемого лекарственного средства. Индивидуумов с > 2 -кратным снижением HBsAg на 8 неделе подвергают более длительному наблюдению в течение вплоть до 40 недель в общем или до достижения снижения уровня HBsAg < 2 раз относительно исходного уровня при 2 последовательных сборах, в зависимости от того, что произойдет первым. Более длительное наблюдение может быть прекращено на основе появляющихся данных.

Схема испытания

Комитет по рассмотрению вопросов безопасности (SRC) выполняет непрерывный обзор данных безопасности, переносимости и противовирусной активности (только части В и С) в определенные моменты времени на основе доступных данных, полученных на протяжении испытания. В то время как первичные данные, которые будут рассмотрены SRC для повышения дозы и включения дополнительных групп, приведены на протяжении протокола, дополнительные соответствующие данные от других групп также рассматриваются SRC, как указано, для обоснованного решения.

Испытание проводят 3 частями:

- **Часть А:** рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое испытание с однократной возрастающей дозой (SAD) HBC34-v35-MLNS-GAALIE, вводимого посредством подкожной (п/к) инъекции или внутривенной (в/в) инфузии здоровым взрослым индивидуумам.

- **Часть В:** рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое испытание SAD HBC34-v35-MLNS-GAALIE, вводимого посредством п/к инъекции взрослым индивидуумам с хронической инфекцией HBV без цирроза, которые получают терапию NRTI, являются отрицательными по HBeAg и имеют HBsAg < 1000 ME/мл.

- **Часть С:** необязательное, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое испытание SAD HBC34v35-MLNS-GAALIE, вводимого посредством п/к инъекции взрослым индивидуумам с хронической инфекцией HBV без цирроза, которым проводят терапию NRTI и которые имеют HBsAg ≥ 1000 ME/мл.

Общая оценка риска/пользы

Потенциальный риск для здоровых взрослых индивидуумов основан на общих рисках безопасности, наблюдаемых для класса терапевтических средств mAb, и они не являются специфическими для HBC34-v35-MLNS-GAALIE: анафилаксия и другие серьезные аллергические реакции и связанные с инъекцией/инфузией реакции. Риск развития таких состояний после дозирования конкретно HBC34v35-MLNS-GAALIE неизвестен.

Часть А испытания собирает информацию о безопасности и переносимости HBC34v35-MLNS-GAALIE, а также соответствующие данные о профиле PK и образовании антител против лекарственного средства (ADA). Ожидается, что HBC34-v35-MLNS-GAALIE не обеспечит пользу для здоровых индивидуумов, включенных в часть А этого испытания. Индивидуумов будут подвергать мониторингу в отношении важных потенциальных рисков и стандартному фармакологическому надзору, и будут проводить

активные действия по минимизацию риска.

Потенциальная польза HBC34-v35-MLNS-GAALIE у индивидуумов с хронической инфекцией HBV для современного стандарта лечения представляет собой:

- Уменьшение сывороточного уровня HBsAg, ингибирование внутрипеченочного распространения HBV, выведение инфицированных гепатоцитов и стимуляция адаптивного иммунного ответа против HBV.

- Пангенотипная терапия инфекции HBV, которая хорошо переносится и вводится в/к на протяжении конечного периода времени.

В дополнение к анафилаксии, другим серьезным аллергическим реакциям и связанным с инъекцией/инфузией реакциям, потенциальные риски, ассоциированные с введением HBC34-v35-MLNS-GAALIE индивидуумам с хронической инфекцией HBV, включают иммунокомплексное заболевание и гепатотоксичность вследствие устранения инфицированных гепатоцитов посредством ADCC/ADCP и/или цитотоксических Т-клеток, индуцированных посредством вакцинального эффекта. Схема исследования частей В/С включает несколько элементов для уменьшения этих рисков:

- В часть В включают индивидуумов с сывороточным HBsAg < 1000 МЕ/мл для уменьшения риска иммунокомплексных заболеваний и гепатотоксичности. Кроме того, данные безопасности В рассматриваются SRC перед включением индивидуумов с потенциально более высокими величинами HBsAg в необязательной части С испытания.

В части В и С включают индивидуумы, которые получают NRTI и имеют ДНК HBV < 100 МЕ/мл при скрининге и имеют хороший печеночный резерв и низкий уровень воспаления печени на исходном уровне при определении по следующим признакам: ALT или AST $\leq 2 \times \text{ULN}$, отсутствие декомпенсации печени в анамнезе и отсутствие выраженного фиброза и цирроза.

- Двух сентинельных индивидуумов рандомизируют 1:1 в группы HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо и проводят им дозирование. Мониторинг этих сентинельных индивидуумов проводят в течение по меньшей мере 72 часов после введения, и, если исследователь(и) не имеет опасений с точки зрения безопасности, проводят дозирование остальным 6 индивидуумам в той же группе (5 - активное вещество, и 1 - плацебо).

- Повышение дозы происходит после рассмотрения SRC доступных данных о безопасности вплоть до 4 недель после введения дозы для учета ожидаемого времени потенциального иммунокомплексного заболевания и гепатотоксичности вследствие устранения инфицированных гепатоцитов посредством ADCC/ADCP и/или цитотоксических Т-клеток, индуцированных посредством вакцинального эффекта,

- Мониторинг безопасности, включая тесты функции печени, анализ мочи, функцию почек, основные показатели жизнедеятельности и данные физикального обследования, предназначены для выявления доказательства ассоциированных с HBC34-v35-MLNS-GAALIE иммунных неблагоприятных явлений.

Часть А

В трех последовательных группах для части А оценивают 90 мг, вплоть до 300 мг и

вплоть до 900 мг, вводимых посредством п/к инъекции. SRC рассматривает доступные клинические и лабораторные данные безопасности вплоть до 2 недель после дозирования для всех доступных индивидуумов в группе перед повышением дозы. В часть А могут быть добавлены две необязательных группы, оценивающие вплоть до 900 мг и 3000 мг, вводимые посредством в/в инфузии. Включение этих необязательных групп может происходить после рассмотрения SRC доступных данных недели 2 от всех доступных индивидуумов в группе 3а (вплоть до 900 мг п/к).

В то время как все из п/к групп (группа 1а, 2а и 3а) в части А включают последовательно, группы могут быть включены параллельно, если в дополнительной группе(ах) исследуют уровень дозы, который находится на уровне или ниже уровня дозы, для которого ранее было обнаружено, что он имел приемлемый профиль безопасности и переносимости в предшествующей группе в части А.

В каждой группе 2 сентинельных индивидуумов рандомизируют 1:1 для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо. Этим индивидуумам проводят дозирование и их подвергают мониторингу в течение по меньшей мере 24 часов в условиях стационара; если исследователь не имеет опасений в отношении безопасности, проводят дозирование остальным индивидуумам в той же группе. Остальных индивидуумов рандомизируют 5:1 для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо.

Максимальный коэффициент повышения дозы в части А не превышает 5 раз.

Часть В

Первую группу в части В (группа 1b) включают после рассмотрения SRC доступных данных недели 2 от всех доступных индивидуумов группы 1а (90 мг п/к).

Пять групп планируют для оценки в части В 6 мг (группа 1b), 18 мг (группа 2b), вплоть до 75 мг (группа 3b), вплоть до 300 мг (группа 4b) и вплоть до 900 мг (группа 5b), вводимых посредством п/к инъекции. Перед повышением дозы SRC рассматривает доступные клинические и лабораторные данные безопасности и данные противовирусной активности вплоть до 4 недель после дозирования для всех доступных индивидуумов в предыдущей группе.

Две необязательных группы в части В могут быть добавлены в соответствии с той же схемой дозирования. Необязательным группам может быть проведено дозирование на более низком, эквивалентном или промежуточном уровне дозы относительно уровней дозы, исследованных в планируемых группах части В или после группы 5b на уровне дозы, не превышающем 900 мг. Максимальный уровень дозы для необязательных групп в части В не превышает наиболее высокую однократную дозу, для которой в части А обнаружено, что она имеет приемлемый профиль безопасности и переносимости. Необязательные группы включают в любой момент времени в планируемые группы части В в случае одобрения SRC.

В то время как все группы части В включают последовательно, группы могут быть включены параллельно, если дополнительную группу(ы) исследуют на уровне дозы, который находится на уровне или ниже уровня дозы, для которого ранее было

обнаружено, что он имеет приемлемый профиль безопасности и переносимости, в предшествующей группе в части А и части В.

В каждой группе проводят рандомизацию 2 сентинельных индивидуумов 1:1 для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо посредством п/к инъекции. Этим индивидуумам проводят дозирование и мониторинг в течение по меньшей мере 72 часов после дозирования (включая мониторинг в стационаре в течение по меньшей мере первых 24 часов); если исследователь(и) не имеет опасений безопасности, проводят дозирование остальным индивидуумам в той же группе. Остальных индивидуумов рандомизируют 5:1 для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо посредством п/к инъекции.

Максимальный коэффициент повышения дозы в части В не превышает 5 раз.

Часть С

Часть С является необязательной и может быть проведена на основе приемлемого профиля безопасности и переносимости HBC34-v35-MLNS-GAALIE у отрицательных по HBeAg индивидуумов с уровнями HBsAg < 1000 МЕ/мл в части В. Первую группу в части С включают после рассмотрения SRC доступных данных для всех индивидуумов в части А и части В до посещения на 4 неделе для группы индивидуумов в части В, которым проводят введение совпадающей или более высокой дозы относительно предполагаемого начального уровня дозы в части С.

В часть С могут быть включены три необязательных группы. Каждая группа может оценивать вплоть до 900 мг, вводимых посредством п/к инъекции, и доза, применяемая в группах части С, не превышает наиболее высокий уровень дозы в части В, для которого SRC обнаружил, что он имеет приемлемый профиль безопасности и переносимости. Группы могут быть включены параллельно.

В каждой группе 2 сентинельных индивидуумов рандомизируют 1:1 для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо посредством п/к инъекции. Этим индивидуумам проводят дозирование и мониторинг в течение по меньшей мере 72 часов после дозирования (включая мониторинг в стационаре в течение по меньшей мере первых 24 часов); если исследователь(и) не имеет опасений в отношении безопасности, проводят дозирование остальной части индивидуумов в той же группе. Остальных индивидуумов рандомизируют 5:1 для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо посредством п/к инъекции.

Методики испытания

Часть А

Скрининг

- Здоровых взрослых индивидуумов включают в 1 из 5 групп (3 планируемых, 2 необязательных) в части А. Скрининг проводят не более чем за 4 недели до посещения на 1 сутки, и он включает письменное информированное, определение пригодности для включения в испытание, получение демографических данных и медицинского анамнеза, физикальное обследование, основные показатели жизнедеятельности, лабораторные тесты, электрокардиограмма (ЭКГ) с 12 отведениями и другие способы оценки в

соответствии со схемой оценки (SoA).

- Пригодные для включения индивидуумы поступают в клинический исследовательский центр на сутки -1 или 1. На 1 сутки оценивают критерии пригодности для включения в испытание, касающиеся основных показателей жизнедеятельности, тесты на беременность, вызывающие пристрастие наркотических средств, донорство крови, наличие какого-либо клинически значимого острого состояния и применение рецептурных, ОТС, травяные или экспериментальные средства, чтобы убедиться пригодность на данный момент к включению в испытание. Также оценивают и регистрируют любые изменения медицинского анамнеза. Пригодных для включения индивидуумов рандомизируют в каждой группе для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо в пределах 48 часов до введения исследуемого лекарственного средства. Индивидуумам вводят однократную дозу исследуемого лекарственного средства на 1 сутки (HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо).

- Данные о неблагоприятных явлениях (AE), связанных с активными действиями при скрининге, собирают от момента получения согласия и далее; любые другие события, происходящие в ходе скринингового периода, сообщаются в качестве медицинского анамнеза. Данные о всех неблагоприятных неблагоприятных явлениях (SAE) получают после момента получения информированного согласия.

- Скрининг параметров вирусной серологии является следующим: активная инфекция ВИЧ, HCV и HBV

Сутки дозирования (сутки 1)

- Пригодных для включения в исследование индивидуумов рандомизируют для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо в пределах 48 часов перед введением исследуемого лекарственного средства на сутки 1.

- Пригодным для включения в исследование индивидуумам вводят однократную дозу исследуемого лекарственного средства и проводят необходимую оценку на 1 сутки.

- В начале в каждой группе 2 сентинельных индивидуума рандомизируют 1:1 для введения HBC34v-35-MLNS-GAALIE или плацебо. Этим индивидуумам проводят дозирование и их подвергают мониторингу в течение по меньшей мере 24 часов в условиях стационара. Основные показатели жизнедеятельности, ЭКГ, направленное на симптомы физикальное обследование(я) и АЕ изучаются исследователем; если исследователь не имеет опасений безопасности, проводят дозирование остальным индивидуумам в той же группе. Остальных индивидуумов в этой группе рандомизируют 5:1 для введения однократной дозы HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо. Всем индивидуумам проводят тщательный мониторинг после введения дозы.

Период наблюдения

- Индивидуумов выписывают после проведения всей оценки в испытании на 2 сутки. Все последующие посещения в испытании являются амбулаторными.

- Индивидуумы возвращаются в клинический исследовательский центр для индивидуальной оценки в соответствии с SoA включая, но не ограничиваясь ими

физикальное обследование, основные показатели жизнедеятельности, лабораторное тестирование, оценку РК и обзор АЕ и сопутствующего лечения до 24 недели.

Части В/С

Скрининг

- Скрининг проводят не более чем за 4 недели до посещения на 1 сутки и включает письменное информированное согласие, определение пригодности для включения, сбор демографических данных и медицинского анамнеза, физикальное обследование, основные показатели жизнедеятельности, лабораторные тесты, ЭКГ с 12 отведениями и другую оценку в соответствии с SoA. Неблагоприятные явления, связанные с активными действиями при скрининге, собирают от момента получения согласия и далее; любые другие события, происходящие в ходе скринингового периода, сообщаются в качестве медицинского анамнеза. Все (SAE) получают после момента получения информированного согласия.

- Взрослых индивидуумов с HBeAg-негативной хронической инфекцией HBV без цирроза и с HBsAg < 1000 МЕ/мл на терапии NRTI в течение ≥ 2 месяцев включают в 1 из 7 групп (5 планируемых, 2 необязательных) в части В. Скрининг индивидуумов проводят не более чем за 4 недели до посещения на 1 сутки. Индивидуумы поступают в клинический исследовательский центр на сутки -1 или 1. На 1 сутки оценивают критерии пригодности для включения, связанные с соблюдением NRTI, основными показателями жизнедеятельности, тестированием на беременность, присутствием какого-либо клинически значимого острого состояния, декомпенсацией печени и применением рецептурных, ОТС, травяных или экспериментальных средств, чтобы убедиться в пригодности на данный момент к включению в испытание. Любые изменения медицинского анамнеза также оценивают и регистрируют. Пригодных для включения индивидуумов в каждой группе рандомизируют для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо в пределах 48 часов перед введением исследуемого лекарственного средства на 1 сутки.

- Для исключения наличия цирроза индивидуумам в частях В и С проводят оценку FibroScan. Ее проведение не требуется, если индивидуум имел FibroScan в течение 6 месяцев перед скринингом или биопсию печени за год до скрининга, которые подтвердили отсутствие фиброза F3 или цирроза F4 Metavir.

- Параметры вирусной серологии при скрининге являются следующими: активная инфекция ВИЧ, HCV и вирусом гепатита дельта. Индивидуумы, которые имеют положительный результат серологии HCV, могут иметь контрольное тестирование ПЦР HCV-RT для определения пригодности для включения.

- Хроническую инфекцию HBV можно определять при скрининге, и ее определяют следующим образом: положительный сывороточный HBsAg, ДНК HBV или HBeAg 2 раза с интервалом по меньшей мере 6 месяцев на основе предшествующей или текущей лабораторной документации (является приемлемой любая комбинация этих тестов, проведенных с интервалом 6 месяцев).

Сутки дозирования (1 сутки)

Пригодных для включения индивидуумов рандомизируют для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо в пределах 48 часов перед введением исследуемого лекарственного средства на 1 сутки.

- Индивидуумы поступают в клинический исследовательский центр на 1 сутки.
- Пригодным для включения индивидуумам вводят однократную дозу исследуемого лекарственного средства и проводят необходимую оценку на 1 сутки.
- В начале в каждой группе 2 сентинельных индивидуума рандомизируют 1:1 для введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE или плацебо. Этим индивидуумам проводят дозирование и их подвергают мониторингу в течение по меньшей мере 72 часов после введения дозы (включая мониторинг в стационаре в течение по меньшей мере первых 24 часов); если исследователь(и) не имеет опасений безопасности, проводят дозирование остальным индивидуумам в той же группе. Перед дозированием каким-либо дополнительным индивидуумам исследователем изучаются основные показатели жизнедеятельности, направленное на симптомы физикальное обследование(я) и АЕ. Остальных индивидуумов в этой группе рандомизируют 5:1 для введения однократной дозы антитела или плацебо. Всем индивидуумам проводят тщательный мониторинг после введения дозы.

Период наблюдения

- Индивидуумов выписывают после проведения всей оценки в испытании на 2 сутки. Все последующие посещения в испытании являются амбулаторными.
- Индивидуумы возвращаются в клинический исследовательский центр для оценки в соответствии с SoA, включая, но не ограничиваясь ими физикальное обследование, основные показатели жизнедеятельности, лабораторное тестирование, оценку РК, оценку эффективности и изучение АЕ и введение сопутствующих лекарственных средств вплоть до 8 недели.

Пролонгированный период наблюдения

Индивидуумы с > 2 -кратным снижением HBsAg на 8 неделе возвращаются в клинический исследовательский центр для индивидуальной оценки в соответствии с SoA до 40 недели или до тех пор, пока снижение HBsAg не составит < 2 раз относительно исходного уровня при 2 последовательных взятиях образцов, в зависимости от того, что произойдет первым. Длительное наблюдение может быть прекращено на основе появляющихся данных.

Продукт, дозировка и способ введения

HBC34v35-MLNS-GAALIE предоставляют в качестве лиофилизированного твердого вещества, подлежащего восстановлению стерильной водой для инъекций (USP) в концентрации 150 мг/мл, и вводят в качестве п/к инъекции или в/в инфузии. Единичная доза основана на объеме и способе введения. При восстановлении до 150 мг/мл стерильной водой для инъекций, USP, вводимый лекарственный продукт содержит 20 мМ гистидин, 7% сахарозу, 0,02% PS80 при pH 6. Плацебо представляет собой стерильный

свободный от консервантов нормальный 0,9% солевой раствор для в/в инфузии или п/к инъекции.

- группа 1a: HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза 90 мг, вводимая посредством п/к инъекции
- группа 2a: HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 300 мг, вводимая посредством п/к инъекции
- группа 3a: HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 900 мг, вводимая посредством п/к инъекции
- группа 4a (необязательная): HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 900 мг, вводимая посредством в/в инфузии
- группа 5a (необязательная): HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 3000 мг, вводимая посредством в/в инфузии
- группа 1b: HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза 6 мг, вводимая посредством п/к инъекции
- группа 2b: HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза 18 мг, вводимая путем п/к инъекции
- группа 3b: HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 75 мг, вводимая путем п/к инъекции
- группа 4b: HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 300 мг, вводимая путем п/к инъекции
- группа 5b: HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 900 мг, вводимая путем п/к инъекции
- группа 6b (необязательная): HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 900 мг, вводимая путем п/к инъекции
- группа 7b (необязательная): HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 900 мг, вводимая путем п/к инъекции
- группа 1c (необязательная): HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 900 мг, вводимая путем п/к инъекции
- группа 2c (необязательная): HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 900 мг, вводимая путем п/к инъекции
- группа 3c (необязательная): HBC34v35-MLNS-GAALIE, однократная доза вплоть до 900 мг, вводимая путем п/к инъекции

Таблица 8: План повышения дозы в части А

Часть испытания	Группа	Активное вещество:плацебо	Доза (путь)	Частота введения
А	1a	6:2	90 мг (п/к)	Однократно
	2a	6:2	Вплоть до 300	Однократно

			мг (п/к)	
	3a	6:2	Вплоть до 900 мг (п/к)	Однократно
	4a (необязательная)	6:2	Вплоть до 900 мг (в/в)	Однократно
	5a (необязательная)	6:2	Вплоть до 3000 мг (в/в)	Однократно

В/в=внутривенный; п/к=подкожный.

Часть В: Испытание однократной возрастающей дозы у индивидуумов с хронической инфекцией HBV

В части В индивидуумам с хронической инфекцией HBV вводят однократную дозу исследуемого лекарственного средства. Присутствие терапевтической мишени HBC34-v35-MLNS-GAALIE, HBsAg, у индивидуумов с хронической инфекцией HBV изменяет потенциальные риски введения HBC34-v35-MLNS-GAALIE. Потенциальные риски включают иммунокомплексное заболевание вследствие образования комплексов антиген-антитело и гепатотоксичность вследствие устранения гепатоцитов посредством ADCC/ADCP и/или "вакцинного эффекта". Для минимизации риска для индивидуумов часть В будут проводить у индивидуумов, которым вводят NRTI и которые имеют ДНК HBV < 100 МЕ/мл при скрининге и имеют хороший печеночный резерв и низкие уровни воспаления печени при определении по отсутствию фиброза/цирроза и ALT < 2×ULN.

Для части В используют группы с пятью уровнями доз. Дозы возрастают постепенно на коэффициент, составляющий приблизительно 3-4 раза, до максимальной планируемой дозы 900 мг, вводимой путем п/к инъекции:

Включают две необязательных группы вплоть до максимальной дозы 900 мг, вводимой посредством п/к инъекции. Группа 7b может быть включена для цели, но не ограничиваясь ими, сбора и оценки образцов для определения иммунного ответа и образцов тонкоигольного аспирата печени в выбранных участках, когда и где доступно. Эти уровни доз основаны на доклинических моделях на животных и трансляционном моделировании PK/PD, которое прогнозирует выраженное снижение HBsAg для доз в диапазоне от 2 до 15 мг/кг. Детали плана повышения дозы для части В могут быть найдены в таблице 9.

Таблица 9: План повышения дозы части В

Часть испытания	Группа	Активное вещество:плацебо	Доза (путь)	Частота введения
В	1b	6:2	6 мг	Однократно

			(п/к)	
	2b	6:2	18 мг (п/к)	Однократно
	3b	6:2	Вплоть до 75 мг (п/к)	Однократно
	4b	6:2	Вплоть до 300 мг (п/к)	Однократно
	5b	6:2	Вплоть до 900 мг (п/к)	Однократно
	6b (необязательная)	6:2	Вплоть до 900 мг (п/к)	Однократно
	7b (необязательная)	6:2	Вплоть до 900 мг (п/к)	Однократно

п/к=подкожный

Необязательная часть С: испытание с однократной возрастающей дозой у индивидуумов с хронической инфекцией HBV

Для оценки безопасности, переносимости и противовирусной активности HBC34-v35-MLNS-GAALIE у индивидуумов с исходным уровнем HBsAg ≥ 1000 МЕ/мл проводят необязательную часть С после установления безопасности, переносимости и противовирусной активности HBC34-v35-MLNS-GAALIE у отрицательных по HBeAg индивидуумов с HBsAg < 1000 МЕ/мл в части В. Часть состоит из трех необязательных групп уровня дозы, причем в каждой из них оценивают дозу вплоть до 900 мг, вводимую посредством п/к инъекции. Таблица 10. Одна или несколько из необязательных групп в части С может быть включена для цели, но не ограничиваясь ими, сбора и оценки образцов для определения иммунного ответа и образцов тонкоигольного аспирата печени в выбранных участках, когда и где доступно.

Таблица 10: обзор групп части С

Часть испытания	Группа	Путь	Уровень дозы	Активное вещество:плацебо
С	1с (необязательная)	п/к	Вплоть до 900 мг	6:2

С	2с (необязательная)	п/к	Вплоть до 900 мг	6:2
С	3с (необязательная)	п/к	Вплоть до 900 мг	6:2

Эталонная терапия, дозировка и путь введения:

Индивидуумам, рандомизированным в группу плацебо, вводят стерильный свободный от консервантов нормальный 0,9% солевой раствор посредством п/к инъекции (части А, В, и С) или в/в инфузия (только часть А).

Локальная переносимость

Для всех частей исследования проводят оценку локальной переносимости в соответствии со схемой оценки (фиг.) для индивидуумов, которым вводят исследуемое лекарственное средство посредством п/к инъекции. Область(и) инъекции маркируют и картируют для последующего наблюдения, и они должны быть задокументированы. Мониторинг области(ей) инъекции следует проводить в отношении боли/чувствительности, опухания, покраснения, кровоподтека и зуда.

Время оценки переносимости для части А представлено на фиг.15А-15С. Время оценки локальной переносимости для частей В/С представлено на фиг.16А-16Е.

В зависимости от мнения исследователя при необходимости допускаются незапланированные посещения для наблюдения каких-либо неразрешенных симптомов, связанных с локальной переносимостью.

Скрининг на наркотические средства, вызывающие пристрастие

Для частей А, В и С испытания проводят сбор мочи для выявления наркотических средств, вызывающих пристрастие. Панель включает амфетамины, кокаин, метадон и опиаты.

Оценка фармакокинетики

Образцы крови собирают для оценки концентраций HBC34-v35-MLNS-GAALIE. Моменты времени для сбора образцов для анализа HBC34-v35-MLNS-GAALIE PK для части А испытания приведены ниже. Моменты времени для сбора образцов для анализа HBC34-v35-MLNS-GAALIE PK для частей В и С испытания приведены ниже.

Фармакокинетический анализ

Часть А

Параметры PK для свободного HBC34-v35-MLNS-GAALIE вычисляют с использованием стандартных некомпартментных способов. Параметры включают, но не ограничиваются ими, сывороточные C_{max} , C_{last} , T_{max} , T_{last} , AUC_{inf} , AUC_{last} , $\%AUC_{exp}$, $t_{1/2}$, λ_z , V_z (только в/в), CL (только в/в), V_z/F (только п/к) и CL/F (только п/к). При необходимости вычисляют другие параметры.

Части В/С

Параметры PK для свободного и общего HBC34-v35-MLNS-GAALIE вычисляют с использованием стандартных некомпартментных способов. Параметры включают, но не

ограничиваются ими, сывороточные $C_{\max}$, C_{last} , $T_{\max}$, T_{last} , AUC_{inf} , AUC_{last} , $\%AUC_{\text{exp}}$, $t_{1/2}$, λ_z , V_z/F и CL/F . При необходимости вычисляют другие параметры.

Анализ РК/фармакодинамики проводят для исследования взаимосвязи воздействие-ответ между параметрами РК и выбранными противовирусными переменными.

Анализ противовирусной активности

Для частей В и С, отдельные данные, касающиеся противовирусной активности HBC34-v35-MLNS-GAALIE, такие как уровни HBsAg, антител против HB, HBeAg, антител против HBe, HBV РНК, HBcrAg и ДНК HBV, обобщенно предоставляют (n, среднее значение, SD, медиана, Q1, Q3, минимум и максимум) в зависимости от группы и посещения в испытании в месте с соответствующим изменением относительно исходного уровня. Обобщенное представление (количество и процент индивидуумов) снижения уровня HBsAg (определяемое как не поддающийся обнаружению HBsAg, измеренный 2 отдельных последовательных раза с интервалом по меньшей мере 2 недели) приводится в зависимости от группы и посещения в испытании.

Иммуногенность

Взятие образцов крови для анализа иммуногенных ответов для определения наличия/отсутствия и титров антител против лекарственного средства (ADA), в зависимости от ситуации, проводят в соответствии с моментами времени, определенными на схеме оценки (фиг.15А-16Е). Образцы охарактеризуются в отношении потенциала HBC34-v35-MLNS-GAALIE (NAb) к нейтрализации, в зависимости ситуации.

Оценка скрининга вирусных параметров, противовирусной активности и наблюдение резистентности

В ходе частей В и С оценка скрининга параметров вирусов включает: HBsAg, anti-HBs, HBeAg (качественная) и ДНК HBV.

Оценка противовирусной активности, проведенной после скрининга, включает: HBsAg, антитела против HB, HBeAg (качественная; должна быть получена только для индивидуумов части С, которые являются качественно положительными по HBeAg при скрининге), HBeAg (количественно; должна быть получена только для индивидуумов части С, которые являются качественно положительными по HBeAg при скрининге), антитела против HBe, РНК HBV, родственному коровому антигена гепатита В (HBcrAg) и ДНК HBV.

Наблюдение резистентности для мониторинга потенциального развития резистентности к NRTI или HBC34-v35-MLNS-GAALIE проводят для всех индивидуумов, которым вводят исследуемое лекарственное средство. Попытку секвенирования генома HBV у индивидуумов проводят с подтвержденным прорывом ДНК HBV, как определяют по ДНК HBV ≥ 500 МЕ/мл, измеренной при 2 последовательных посещениях в испытании, или у индивидуумов, которые рано прекратили участие в испытании с ДНК HBV ≥ 500 МЕ/мл. Как не может быть известно на момент посещения, если индивидуум имеет вирусологический прорыв, образцы для наблюдения резистентности получают при

всех посещениях в испытании, указанных в SOA. Образцы, полученные для наблюдения резистентности, могут использоваться для проведения дополнительного анализа вирусов, включая скрининг вирусов.

Оценка иммунного ответа

Для исследования иммунного ответа хозяина и потенциальных биомаркеров инфекции индивидуумы могут согласиться на необязательные подиспытания, в которых периферические иммунные образцы с печеночными иммунными образцами или без них (посредством тонкоигольного аспирирования) собирают в моменты времени, указанные на фиг.15А-16Е. Эти необязательные подиспытания и ассоциированную оценку проводят, когда и где доступно в отдельных центрах.

Генотипирование Fc-гамма рецепторов (FcγR) и аллотипирование иммуноглобулинов

Образцы крови для генотипирования FcγR и аллотипирования иммуноглобулинов собирают на исходном уровне для всех индивидуумов в частях В и С для оценки возможной ассоциации между полиморфизмами Fc-гамма рецепторов или аллотипами иммуноглобулинов с противовирусной активностью HBC34-v35-MLNS-GAALIE.

Статистические способы

Статистический анализ является в основном описательным. Все исследуемые данные приводятся по перечням данных индивидуумов. Для всех частей испытания в таблицах с обобщением представлены результаты по группам для HBC34-v35-MLNS-GAALIE и плацебо, где индивидуумов в группе плацебо объединяют среди групп введения дозы в зависимости от пути введения для каждой части.

Это испытание проводят в соответствии с этическими принципами, источниками которых является Декларация Хельсинки и которые согласуются с Правилами проведения качественных клинических исследований (GCP) и применимым регулятивными требованиями, включая архивацию необходимых документов.

Перечень сокращенных обозначений и определений терминов в этом примере

- ADA - антитело против лекарственного средства
- AE - неблагоприятное явление
- ALT - аланинаминотрансфераза
- ANC - абсолютное число нейтрофилов
- AP - щелочная фосфатаза
- AST - аспартатаминотрансфераза
- AUC - площадь под кривой
- BLQ - ниже предела количественного определения
- BMI - индекс массы тела
- BUN - азот мочевины крови
- CLcr - клиренс креатинина
- CRF - индивидуальная регистрационная карта
- CTCAE - Общие терминологические критерии нежелательных явлений

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЭКГ - электрокардиограмма

eCRF - электронная индивидуальная регистрационная карта

EF - конец наблюдения

ET - конец лечения

FDA - Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств

GCP - Правила проведения качественных клинических исследований

GGT - гамма-глутамилтрансфераза

GLP - Надлежащая лабораторная практика

GNA - гликоль-нуклеиновая кислота

HBcrAg - родственный коровому антиген гепатита В

HBeAg - e-антиген гепатита В

HBIG - иммуноглобулин гепатита В

HBsAg - поверхностный антиген гепатита В

HBV - вирус гепатита В

HCC - печеночно-клеточная карцинома

HED - эквивалентная доза для человека

Hgb - гемоглобин

ICF - форма информированного согласия

ICH - Международная конференция по гармонизации

IgG - иммуноглобулин G

IgM - иммуноглобулин M

IEC - Независимый этический комитет

INR - международное нормализованное соотношение

IRB - Экспертный совет учреждения

В/в - внутривенный

IWRS - интерактивная веб-система ответа

LDH - лактатдегидрогеназа

LLN - нижний предел нормы

LLOQ - нижний предел количественного определения

LLT - термин нижнего уровня

mAb - моноклональные антитела

MedDRA - Медицинский словарь терминологии для регуляторной деятельности

Nab - Нейтрализующие антитела

NOAEL - отсутствие наблюдаемого уровня неблагоприятного явления

OTC - продаваемый без рецепта

PK - фармакокинетика

PT - предпочтительный термин

Q1 - первый квартиль

Q3 - третий квартиль

RBC - эритроцит (количество)

PHK - рибонуклеиновая кислота

SAD - однократная возрастающая доза

SAE - серьезное неблагоприятное явление

п/к - подкожный

SD - стандартное отклонение

SoA - схема оценки

SOC - класс системы органов

SRC - комитет по рассмотрению вопросов безопасности

SUSAR - предполагаемая неожиданная серьезная неблагоприятная реакция

TCR - перекрестная реактивность в ткани

TEAE - возникшее на фоне лечения неблагоприятное явление

США - Соединенные штаты Америки

ULN - верхняя граница нормы

WBC - лейкоцит (количество)

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

WOCBP - женщины детородного возраста

Пример 10: Активация дендритных клеток иммунными комплексами

HBsAg:антитело HBC34-v35

Тестировали активацию DC моноцитарного происхождения ((mo)DC) в присутствии иммунных комплексов (IC), образованных HBC34-V35-MLNS_GAALIE (HC SEQ ID NO.:91, LC SEQ ID NO.:93) или HBC34-V35_MLNS (HC SEQ ID NO.:92, LC SEQ ID NO.:93) и HBsAg в сыворотке пациентов HBV+ (поставщик: BioIVT). Материалы и способы:

CD14+ моноциты выделяли из PBMC человека от здоровых доноров (n=2) и культивировали в RPMI 1640, 10% FBS (Hyclone), 1% заменимых аминокислотах, 1% глутамине, 1% Pen/Strep, 1% пирувате натрия, 50 мкМ β-меркаптоэтанолу, 50 нг/мл GM-CSF (Miltenyi) и 1000 Е/мл IL-4 (R&D) в течение 6 суток. Затем дифференцированные незрелые DC моноцитарного происхождения (moDC) стимулировали в течение 22 часов HBsAg отдельно (разбавленным до конечной концентрации 250 МЕ/мл, из двух сывороток пациентов 1890 и 4460 МЕ/мл), с IC HBsAg и HBC34-v35-MLNS или HBC34-v35-MLNS_GAALIE (mAb в концентрации 20-100 мкг/мл) или mAb отдельно. Реагенты тестировали в отношении свободы от эндотоксинов. Поверхностную экспрессию костимулирующих маркеров CD83 и CD86 и HLA-DR определяли посредством проточной цитометрии. Уровни десяти (10) провоспалительных цитокинов человека (IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 и TNFα) изменяли с использованием набора V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kit от Meso Scale Diagnostics (MSD). В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду. В качестве положительного контроля служил LPS (Sigma, 100 нг/мл).

Данные представлены на фиг.20-24В. Иммунные комплексы (IC) HBsAg с HBC34-v35-MLNS-GAALIE индуцировали повышение экспрессии костимулирующих маркеров CD83 и CD86, а также HLA-DR, на поверхности moDC. Кроме того, IC HBsAg с HBC34-v35-MLNS-GAALIE индуцировали moDC к секреции цитокинов TNF α , IL-6 и IL-10.

ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И НОМЕРА SEQ ID (СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ):

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
1	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G где X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄ , X ₅ , X ₆ и X ₇ могут представлять собой любую аминокислоту	эпитоп
2	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G где X ₁ представляет собой P, T или S, X ₂ представляет собой C или S, X ₃ представляет собой R, K, D или I, X ₄ представляет собой M или T, X ₅ представляет собой T, A или I, X ₆ представляет собой T, P или L, и X ₇ представляет собой Q, H или L.	e
3	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTS LNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWM CLRRFIIFLIFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSST TSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPI SSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPT VWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI	S-домен HBsAg (номер доступа GenBank № J02203)
4	MENVTSGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWT SLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRW MCLRRFIIFLIFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSS TTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPI PSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSP TVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCLWV YI	S-домен HBsAg (номер доступа GenBank № FJ899792)
5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	J02203 (D, ayw3)
6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC	FJ899792 (D, adw2)

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	CCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	
7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSC CCTKPSDGNCTCIPISSWAFAKYLWEWASVRFSW	AM282986 (A)
8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCC CTKPTDGNCTCIPISSWAFAKYLWEWASVRFSW	D23678 (B1)
9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCC CTKPSDGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFSW	AB117758 (C1)
10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMFPSCC CSKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	AB205192 (E)
11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSC CCSKPSDGNCTCIPISSWALGKYLWEWASARFSW	X69798 (F4)
12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPISSWAFAKYLWEWASVRFSW	AF160501 (G)
13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSC CCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKYLWEWASARFSW	AY090454 (H)
14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPISSWAFAKYLWEWASARFSW	AF241409 (I)
15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCTITAQGTSMFPSCC CTKPSDGNCTCIPISSWAFAKFLWEWASVRFSW	AB486012 (J)
16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSC CCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Y100C/P120T
17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T
18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPLDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T/S143L
19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg C121S
20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122D
21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSMYPSCC CTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122I
22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMYPSC	HBsAg T123N

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	CCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	
23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129H
24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129L
25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSHYPSCC CTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133H
26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSLYPSCC CTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133L
27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSTYPSCC CTKPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133T
28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTEPSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg K141E
29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKSSDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P142S
30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPKDGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg S143K
31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSAGNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg D144A
32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDRNCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg G145R
33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGACTIONCTCIIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg N146A
34	GRIFRSFY	CDRH1 HBC34 а.к.
35	NQDGSEK	CDRH2 HBC34 а.к.
36	AAWSGNSGGMDV	CDRH3 HBC34 а.к.
37	KLGNKN	CDRL1 HBC34 а.к.
38	EVK	CDRL2 HBC34 а.к.
39	VIYEVKYRP	CDRL2 HBC34 длинная, а.к.
40	QTDWSTTVV	CDRL3 HBC34 а.к.
41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSW	VH HBC34, HBC34-V7,

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	VRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISR DNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGM DVWGQGTTVSVSS	HBC34-V34, HBC34-V35, а.к.
42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNCWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTDSTTVVFGGGTRLTVL	VL HBC34, а.к.
43	GGACGCATCTTTAGAAAGTTTTTAC	CDRH1 HBC34, нт
44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA	CDRH2 HBC34, нт
45	GCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTATGGACGT C	CDRH3 HBC34, нт
46	AAATTGGGGAATAAAAAT	CDRL1 HBC34, нт
47	GAGGTAAA	CDRL2 HBC34, нт
48	gtcatctatGAGGTAAAtaccgcccc	CDRL2 HBC34, длинная, нт
49	CAGACGTGGGACAGCACCCTGTGGTG	CDRL3 HBC34, нт
50	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGT CCAGCCGGGGGGGTCCCAGAGACTGTCCTGTGCAG CCTCTGGACGCATCTTTAGAAAGTTTTTACATGAG CTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCCACTATAAACCAAGATGGAAGTGAGA AATTATATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTATTTCT GCAAATGAACAACCTGAGAGTCGAGGACACGGCC GTTTATTACTGCGCGGCTTGGAGCGGCAATAGTG GGGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGGACCACGG TCTCCGTCTCCTCA	VH HBC34, нт
51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGT GTCCCCAGGACAGACAGTCAGCATCCCCTGCTCTG GAGATAAATTGGGGAATAAAAATGTTTGCTGGTT TCAGCATAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCA TCTATGAGGTAAATACCGCCCCTCGGGGATTCTCT GAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGC	VL HBC34, нт

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	CACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATG AGGCTGCCTATTTCTGTCAGACGTGGGACAGCAC CACTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAGGCTGACC GTCCTA	
52	<u>X</u> GSSTTSTGPCRTCMT <u>X</u> PSDGN <u>A</u> T <u>A</u> IPIPSW <u>X</u> где остатки, кодируемые как <u>X</u> , заменены остатками цистеина	пептид
53	TSTGPCRTCMTTAQG	пептид
54	GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT	пептид
55	<u>X</u> SMYPS <u>A</u> SATKPSDGN <u>X</u> TGPCRTCMTTAQGT <u>S</u> <u>X</u> где остатки, кодируемые как <u>X</u> , заменены остатками цистеина	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 представляет собой R или K, X ₂ представляет собой M или T, X ₃ представляет собой T или I, и X ₄ представляет собой T, P или L	эпитоп
58	QTFDSTTVV	HBC34-V7 CDRL3 и HBC34-V23 CDRL3 (а.к.)
59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGD <u>K</u> LG <u>N</u> KNVCFQ HKPGQSPVLVIYE <u>V</u> KYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SGTQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	VL HBC34-V7
60	AAGCTGGGGAACAAAAAT	CDRL1 HBC34v7 и CDRL1 HBC-V23 (нт)
61	GAGGTGAAA	CDRL2 HBC34-V7 и CDRL2 HBC34v23 нт
62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT	CDRL2 HBC34-V7, длинная, и CDRL2 HBC34-V23, длинная, нт

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
63	CAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTC	CDRL3 HBC34-V7 и CDRL3 HBC34-V23, нт
64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTGTCCGT CTCTCCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCTCTGG CGACAAGCTGGGGAACAAAAATGTCTGTTGGTTC CAGCACAAGCCAGGGCAGAGTCCCGTGCTGGTCAT CTACGAGGTGAAATATCGGCCTTCAGGAATTCCAG AACGGTTCAGCGGATCAAACAGCGGCAATACTGCA ACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCATGGACGA AGCCGCTTATTTCTGCCAGACATTCGATTCCACCA CAGTGGTCTTTGGCGGGGGAAGTACTAGGCTGACCGT GCTG	VL HBC34-V7, HBC34- V34 и HBC34-V35, нт
65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKNACWYQ QKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SGTQAMDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLTVL	VL HBC34-V23, а.к.
66	INQDGSEK	CDRH2 HBC34wt, а.к.
67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSW VRQAPGKGLEWVANINQDGSEKLYVDSVKGRFTISR DNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGM DVWGQGTTVTVSS	VH HBC34-V31 HBC34- V32 и HBC34-V33
68	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCCGGCGGGGGACTGG TGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGTGCA GCTTCTGGAAGAATCTTCAGATCTTTTACATGAGT TGGGTGAGACAGGCTCCTGGGAAGGGACTGGAGT GGGTCGAAACATCAATCAGGACGGATCAGAAAA GCTGTATGTGGATAGCGTCAAAGGCAGGTTCACTA TTTCCCGCGACAACGCCAAAAATTCTCTGTTTCTGC AGATGAACAATCTGCGGGTGGAGGATACCGCTGTC TACTATTGTGCAGCCTGGTCTGGCAACAGTGGAGG CATGGACGTGTGGGGACAGGGAACCACAGTGACA GTCAGCTCC	VH HBC34-V31, HBC34- V32 и HBC34-V33 (нт)
69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTGTCCGT	VL HBC34v23 нт

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	CTCTCCAGGCCAGACAGCATCCATCACTTGCTCTG GCGACAAGCTGGGGAACAAAAATGCCTGTTGGTA TCAGCAGAAGCCAGGGCAGAGTCCCGTGCTGGTCA TCTACGAGGTGAAATATCGGCCTTCAGGAATTCCA GAAAGATTCAGTGGATCAAACAGCGGCAATACTGC TACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCATGGACG AAGCTGATTACTATTGCCAGACATTCGATTCCAC CACAGTGGTCTTTGGCGGGGGA ACTAAGCTGACC GTGCTG	
70	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCAGGAGGAGGGTGGG TCCAGCCCGGAGGGAGCCAGAGACTGTCTTGTGCC GCATCAGGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTACATGT CCTGGGTGCGCCAGGCACCAAGGCAAGGGACTGGA GTGGGTGCGCCACCATCAACCAGGACGGATCTGAA AAGCTGTATGTGGATAGTGTCAAAGGCCGGTTCAC AATTAGCAGAGACAACGCTAAAAATTCTCTGTTC TGCAGATGAACAATCTGCGAGTGGAGGATACCGCC GTCTACTATTGCGCCGCTTGGTCTGGCAACAGCG GCGGGATGGATGTCTGGGGGCAGGGCACAACAG TGAGCGTCTCTTCC	VH HBC34 wt, кодон- оптимизированная
71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTCTCCGTC TCACCTGGACAGACCGTCTCAATCCCCTGCTCCGG CGAT AAACTGGGCAACAAGAAC GTGTGCTGGTTCCAGC ACAAACCCGGACAGAGTCCTGTGCTGGTCATCTAC GAGGTCAAGTATCGGCCAAGCGGCATTCCCGAAA GATTCAGCGGCTCCAACCTCTGGGAATACCGCAACA CTGACTATCTCTGGAACCCAGGCAATGGACGAGGC AGCTTACTTTTGCCAGACTTGGGATTCAACTACT GTCGTGTT CGGCGGCGGAAGTAGACTGACTGTCCT G	VL HBC34 wt, кодон- оптимизированная
72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC	CDRH1 HBC34 wt,

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
		кодон-оптимизированная
73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG	CDRH2 HBC34 wt, кодон-оптимизированная
74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATGT C	CDRH3 HBC34 wt, кодон-оптимизированная
75	AAACTGGGCAACAAGAAC	CDRL1 HBC34 wt, кодон-оптимизированная
76	GAGGTCAAG	CDRL2 HBC34 wt, кодон-оптимизированная
77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA	CDRL2 HBC34 wt, длинная, кодон- оптимизированная
78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTG	CDRL3 HBC34 wt, кодон-оптимизированная
79	GGSGG	Линкер
80	TGPCRTC	Эпитоп
81	GNCTCIP	Эпитоп
82	CCIPSSWAFGCSTTSTGPCRTCC Где, в частности, к остаткам цистеина в положениях 2, 21 и 24 присоединен ацетамидометил.	Непрерывный миметик эпитопа
83	<u>CGNCTCIPSSWAFGCSTTSTGPCRTCC</u> Где, в частности, к остаткам цистеина в положениях 4, 6, 24 и 27 присоединен ацетамидометил.	Непрерывный миметик эпитопа
84	CGGGCSTTSTGPCRTCC Где, в частности, к остаткам цистеина в положениях 13 и 16 присоединен ацетамидометил.	Петлевой миметик эпитопа
85	STTSTGPCRTC	Эпитоп
86	GNCTCIPSSWAF	Эпитоп
87	GNCTCIPSSWAF	Эпитоп
88	PCRXC	эпитоп
89	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVAVWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS	VL HBC34-V35

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	GTQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	
90	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVSWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	VL HBC34-V34
91	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSW VRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISR DNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGM DVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVLHEA LHSHYTQKSLSLSPGK	HC HBC34-V35-MLNS- GAALIE и HBC34-V34- MLNS-GAALIE (g1M17, 1)
92	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSW VRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISR DNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGM DVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVLHEA LHSHYTQKSLSLSPGK	HC HBC34-V35-MLNS и HBC34-V34-MLNS (g1M17, 1)
93	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVAWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS	LC HBC34-V35

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	GTQAMDEAA YFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
94	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNSWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAA YFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	LC HBC34-V34
95	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTKYAMSW VRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDTYYADSVKGRF TISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDVG VIG SYYYYAMDVWGQGTAVTVSS	VH HBC24
96	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQGLSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYAYS PRWTFGQGTKVEIK	VL HBC24
97	GSTFTKYA	CDRH1 HBC24
98	ISGSVPGF	CDRH2 HBC24
99	LYYCAKDVG VIGSYYYYAMDV	CDRH3 HBC24
100	QGLSSSY	CDRL1 HBC24
101	SAS	CDRL2 HBC24
102	QQYAYS PRWT	CDRL3 HBC24
103	gagctgcagctggaggagtcggcgcggtgggtgcagcctggcggtcccag aggctgagctgtccgcttctggcaggatctccggtcctttacatgtcttgggtgcg gcaggctccaggcaaggcctggagtgggtggctaccatcaaccaggacggctc cgagaagctgtat gtggatagcgtgaagggcagattcacaatctctcgcgacaacgccaagaactccct gtttctgcagatgaacaatctgagggtggaggataccgccgtgtactattgcgccgc ttggcttggaatagcggcgcatggacgtgtggggacagggcaccaccgtgtcc gtgtccagc	VH HBC34-V7, HBC34-V35, и HBC34-V34 (кодон-оптимизированная)
104	agctacgagctgacacagcccccttcggtgtccgtgtccctggacagaccgtgc	VL HBC34-V34

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	catcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgtgtcctggttcagcata agcctggccagtcctcccgctgctggtcatctacgaggtgaagtataggcccagcggc atccctgagcgggttctctggctccaacagcggcaatacagccacctgacaatctct ggcacacaggctatggacgagggcgcttatttctgccagaccttgattccaccaca gtggtgttcggcgggcgccaccagactgacagtgtctg	(кодон- оптимизированная)
105	agctacgagctgacacagcccccttccgtgtccgtgtccctggacagaccgtgtc catcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgtggcctggttcagcat aagcctggccagtcctcccgctgctggtcatctacgaggtgaagtataggcccagcgg catccctgagcgggttctctggctccaacagcggcaatacagccacctgacaatctc tggcacacaggctatggacgagggcgcttatttctgccagaccttgattccaccaca gtggtgttcggcgggcgccaccagactgacagtgtctg	VL HBC34-V35 (кодон- оптимизированная)
106	gaggtgcagttgttgagctctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctgag actctctgtgcagcctctGGATCCACTTTTACCAAATATGCCa tgagctgggtccgtcaggctccagggaaggggctggagtgggtcgcaagtATT AGTGGAAGTgttctctggttttGGTATTGACACAatctacgcagact ccgttaagggccggttcaccatctccagagacactccaagaacaccctgtatctgc aaatgaacagcctgagagccgaggacacggccttatattactgtGCGAAAG ATGTCGGGGTTATCGGGTCATACTATTACTACGCT ATGGACGTCtgggggtcaa Gggaccgcggtcaccgtctctcag	VH HBC24 (дикого типа)
107	aaattgtgttgacgcagctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagcca ccctctctgcagggccagtCAGGGTCTTAGCAGCAGTTACtta gcctgtgaccagcagaaacctggccaggctcccaggtcctcatctatAGTGC GTCCaccagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtggtctggga cagacttactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgt CAACAGTATGCTTACTCACCTCGGTGGACGttcggccaa gggaccaaggtggagatcaaac	VL HBC24 (дикого типа)
108	GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGG TGCAGCCCCGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCC GCCTCTGGCAGCACCTTCACAAAGTATGCAATGTC TTGGGTGCGCCAGGCACCAGGCAAGGGCCTGGAGT GGGTGGCCTCCATCTCTGGCAGCGTGCCTGGCTTC	VH HBC24 (кодон- оптимизированная)

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	GGCATCGACACCTACTATGCCGATTCCGTGAAGGG CCGGTTTACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACA CACTGTATCTGCAGATGAATTCTCTGCGGGCCGAG GACACCGCCCTGTACTATTGTGCCAAGGATGTGGG CGTGATCGGCAGCTACTATTACTATGCAATGGACG TGTGGGGACAGGGAACAGCAGTGACAGTGAGCTC C	
109	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCACACTGTC CCTGTCCCCTGGAGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCA GAGCCTCTCAGGGCCTGAGCTCCTCTTACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCCCTCGGCTG CTGATCTACTCTGCCTCCACCAGAGCAACAGGCAT TCCTGACCGCTTCTCCGGATCTGGAAGCGGCACAG ACTTCACCCTGACAATCAGCCGGCTGGAGCCTGAG GACTTCGCCGTGTACTATTGTCAGCAGTACGCCTAT TCCCCAAGGTGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGGT GGAGATCAAG	VL HBC24 (кодон- оптимизированная)
110	agctacgagctgacacagcccccttccgtgtccgtgtccctggacagaccgtgtc catcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgtgtgctggtttcagcata agcctggccagtccccctgtgtggtcatctacgaggtgaagtataggcccagcggc atccctgagcgggttctgtggtccaacagcggcaatacagccacctgacaatctct ggcacacaggctatggacgaggccgcttatttctgccagaccttgattccaccaca gtggtgttcggcgggcgccaccagactgacagtgtgtg	VL HBC34-V7 (кодон- оптимизированная)
111	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNASWYQQ KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLTVL	HBC34v23-L_C40S
112	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNAAWYQ QKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SGTQAMDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLTVL	HBC34v23-L_C40A
113	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVSWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34v31-L_C40S

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
114	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNVAWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTDSTTVVFEGGGTRLTVL	HBC34v31-L_C40A
115	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNVSWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFEGGGTRLTVL	HBC34v32-L_C40S
116	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNVAWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTDSTTVVFEGGGTRLTVL	HBC34v32-L_C40A
117	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKNKNASWYQQ KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEADYYCQTFDSTTVVFEGGGTKLTVL	HBC34v33-L_C40S
118	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKNKNAAWYQ QKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SGTQAMDEADYYCQTFDSTTVVFEGGGTKLTVL	HBC34v33-L_C40A
119	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNVSWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTDSTTVVFEGGGTRLTVL	HBC34-L_C40S
120	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNVAWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTDSTTVVFEGGGTRLTVL	HBC34-L_C40A
121	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGSTFTKYAMSW VRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDTYADSVKGRF TISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDVG VIGSYYYIAMDVWGQGTAVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN	HBC24-MLNS

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	
122	EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGSTFTKYAMSW VRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDTYYADSVKGRF TISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDVGVI SYYYYAMDVWGQGTAVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	HBC24-MLNS-GAALIE
123	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSW VRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISR DNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGM DVWGQGTTVSVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSV TLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL LSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNN KDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK	HC HBC34-V7-mu (IgG2a)
124	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVCWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPKS SPSVTLFPPSSEELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWK	LC HBC34-V7-mu (IgG2a)

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	VDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARA WERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	
125	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSW VRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISR DNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGM DVWGQGTTVSVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSV TLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNN KDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCTMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK	HC HBC34-V35-mu (IgG2a)
126	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNAWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVLGQPKS SPSVTLFPPSSEELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWK VDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARA WERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	LC HBC34-V35-mu (IgG2a)
127	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTKYAMSW VRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDTYYADSVKGRF TISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDVGVI SYYYYAMDVWGQGTAVTVSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK IKDVLMI LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEF KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEE MTKKQVTLTCTMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK	HC HBC24-mu (IgG2a)

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	NTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVV HEGLHNHHTTKSFSRTPGK	
128	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGLSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYAYS PRWTFGQGTKVEIKADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT KDEY ERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	LC HBC24-mu (IgG2a)
129	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSW VRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISR DNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGM DVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTP PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	HC HBC34-V7, HBC34- V34, HBC34-V35 (дикого типа)
130	gcctccacaaaggcccaagcgtgttccactggctccctcttccaagtctacctccg gcggcacagccgctctgggatgtctggtgaaggattacttcccagagcccgtgacc gtgtcttggaaactccggcgccctgaccagcggagtgacatacttccagctgtgctg cagagctctggcctgtactctctgtccagcgtggtgaccgtgccctcttccagcctgg gcacccagacatatctgcaacgtgaatcacaaagcaatacaaaaggtggac aagaaggtggagcccaagtctgtgataagaccatacatgccctccatgtccagct ccagagctgctggcgcccaagcgtgttctgttccaccaagcctaaggatac cctgatgatctccagaacccccgaggtgacatgcgtggtggagcgtgagccac gaggatcctgaggtgaagtcaactgttacgtggacggcgtggaggtgcataatgc taagaccaagcccaggaggagcagtagaactctacatcggtggtgtccgtgc tgacagtgtgcaccaggattggctgaacggcaaggagtataagtgaaggtgtct	CH1-шарнирная область- CH2-CH3 HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 (кодон- оптимизированная)

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	aataaggccctgcccgtcctatcgagaagaccatctccaaggccaaggccagc ctagagagccacaggtgtacacactgcctccatctcgcatgagctgaccaagaac caggtgtccctgacatgtctggtgaagggttctatccttccgacatcgctgtggagt gggagagcaatggccagccagagaacaattacaagaccacacccctgtgctgg acagcgatggctctttcttctgtatagcaagctgaccgtggacaagtctcgctggca gcagggcaacgtgttagctgttctgtgatgcatgaggccctgcacaatcattataca cagaagtcctgagcctgtctcctggcaag	
131	gagctgcagctggtggagtccggcggcggtgggtgcagcctggcggtcccag aggctgagctgtgccgttctggcaggatcttccggctctttacatgtcttgggtgcg gcaggtccaggcaaggccctggagtgggtggctaccatcaaccaggacggctc cgagaagctgtatgtgtagcgtgaagggcagattcacaatctctcgcgacaacg ccaagaactccctgtttctgcagatgaacaatctgagggtggaggataccgccgtgt actattgcgccgttggcttggaatagcggcggcatggacgtgtggggacaggg caccaccgtgtccgtgtccagcgcctccacaaagggcccaagcgtgttccactgg ctccctcttccaagtctacctccggcggcacagccgctctgggatgtctggtgaagg attactccagagcccgtgaccgtgtcttggaaactccggcgccctgaccagcgga gtgcatacatttccagctgtgctgcagagctctggcctgtactctctgtccagcgtgt gaccgtgccctcttccagcctgggcacccagacatatactgcaacgtgaatcaca gccaagcaatacaaaagggtggacaagaagggtggagcccaagtctgtgataagacc catacatgccctccatgtccagctccagagctgctggcgggcccaagcgtgttctg ttccacccaagcctaaggataccctgatgatctccagaacccccgaggtgacatgc gtggtggtggacgtgagccacgaggatcctgagggtgaagtcaactggtacgtgga cggcgtggaggtgcataatgctaagaccaagcccaggaggagcagtacaactct acctatcggtggtgtccgtgctgacagtgtgcaccaggattggctgaacggcaa ggagtataagtgaaggtgtctaataaggccctgcccgtcctatcgagaagaccat ctccaaggccaaggccagcctagagagccacaggtgtacacactgcctccatct cgcatgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacatgtctggtgaagggttctat ccttccgacatcgctgtggagtgggagagcaatggccagccagagaacaattaca agaccacacccctgtgctggacagcgtggctctttcttctgtatagcaagctgac cgtggacaagtctcgctggcagcagggaacgtgttagctgttctgtgatgcatga ggccctgcacaatcattatacacagaagtcctgagcctgtctcctggcaagtgatg aggtaccgtgcgacggccggaagccccgctccccgggctctcgcggtcgtac gaggaaagctt	ВН-СН1-шарнирная область-СН2-СН3 НВС34-V7, НВС34-V34, НВС34-V35 (кодон- оптимизированная)

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
132	ggacagccaaaggctgtccatctgtgacctgtttccacctcttccgaggagctg caggccaacaaggccacctgggtgtgcctgactctgacttctaccctggagctgtg acagtggcttggaggctgatagctctcccgtaaggctggcgtggagacaaca cccctagcaagcagtctaacaataagtagccgcttccagctatctgtctctgacacc agagcagtggaggtcccaccgctcttattcctgccaggtgacctatgagggcagca ccgtggagaagacagtggccccaccgagtgttct	CL HBC34-V7 (кодон- оптимизированная)
133	agctacgagctgacacagcccccttccgtgtccgtgtccctggacagaccgtgtc catcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgtgtgctggtttcagcata agcctggccagtccccctgtgtggtcatctacgaggtgaagtataggcccagcggc atccctgagcgggttctgtggtccaacagcggcaatacagccacctgacaatctct ggcacacaggctatggacgaggccgcttatttctgccagaccttgattccaccaca gtggtgttcggcgggcaccagactgacagtgtggacagccaaaggctgtc catctgtgacctgtttccacctcttccgaggagctgcaggccaacaaggccacc tggtgtgcctgactctgacttctaccctggagctgtgacagtggcttggaggctga tagctctcccgtaaggctggcgtggagacaacaaccctagcaagcagtctaaca ataagtagccgcttccagctatctgtctctgacaccagagcagtggaggtcccacc gctcttattcctgccaggtgacctatgagggcagcaccgtggagaagacagtggcc cccaccgagtgttct	LC HBC34-V7 (VL-CL) (кодон- оптимизированная)
134	ggacagccaaaggctgtccatctgtgacctgtttccacctcttccgaggagctg caggccaacaaggccacctgggtgtgcctgactctgacttctaccctggagctgtg acagtggcttggaggctgatagctctcccgtaaggctggcgtggagacaaca cccctagcaagcagtctaacaataagtagccgcttccagctatctgtctctgacacc agagcagtggaggtcccaccgctcttattcctgccaggtgacctatgagggcagca ccgtggagaagacagtggccccaccgagtgttct	CL HBC34-V34, HBC34- V35 (кодон- оптимизированная)
135	agctacgagctgacacagcccccttccgtgtccgtgtccctggacagaccgtgtc catcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgtgtcctggtttcagcata agcctggccagtccccctgtgtggtcatctacgaggtgaagtataggcccagcggc atccctgagcgggttctgtggtccaacagcggcaatacagccacctgacaatctct ggcacacaggctatggacgaggccgcttatttctgccagaccttgattccaccaca gtggtgttcggcgggcaccagactgacagtgtggacagccaaaggctgtc catctgtgacctgtttccacctcttccgaggagctgcaggccaacaaggccacc tggtgtgcctgactctgacttctaccctggagctgtgacagtggcttggaggctga	LC HBC34-V34 (VL-CL) (кодон- оптимизированная)

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	tagctctcccgtagaggtggcgtggagacaacaaccctagcaagcagtctaaca ataagtagccgcttccagctatctgtctctgacaccagagcagtggagtcacc gctcttattcctgccaggtgacccatgagggcagcaccgtggagaagacagtggcc cccaccgagtgttct	
136	agctacgagctgacacagcccccttccgtgtccgtgtcccctggacagaccgtgtc catcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgtggcctggtttcagcat aagcctggccagtcctccctgctgtgtcatctacgaggtgaagtagggccagcgg catccctgagcggttctctggctccaacagcggcaatacagccacctgacaatctc tggcacacaggctatggacgaggccgttatttctgccagaccttgattccaccaca gtgtgttccggcgccgaccagactgacagtgtgtggacagccaaaggctgtc catctgtgacctgtttccacctcttccgaggagctgcaggccaacaaggccacc tgggtgtcctgatctctgactctaccctggagctgtgacagtggcttgaaggctga tagctctcccgtagaggtggcgtggagacaacaaccctagcaagcagtctaaca ataagtagccgcttccagctatctgtctctgacaccagagcagtggagtcacc gctcttattcctgccaggtgacccatgagggcagcaccgtggagaagacagtggcc cccaccgagtgttct	LC HBC34-V35 (VL-CL) (кодон- оптимизированная)
137	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc hIgG1 WT
138	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSFYMSW VRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISR DNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGM DVWGQGTTVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL	HBC34, HBC34v7, HBC34v23, HBC34v34, HBC34v35, HBC34_C40S, HBC34_C40A, HBC34v23_C40S, HBC34v23_C40A HC с мутацией GAALIE

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
	KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	В hIgG1 Fc

Все патенты США, публикации заявок на патент США, патентные заявки США, иностранные патенты, иностранные заявки на патент и непатентные публикации, упоминаемые в настоящем описании или прилагаемом информационном листке заявке включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме в той степени, в которой они не являются противоречащими настоящему описанию.

Предварительная заявка США 62/893742, поданная 29 августа 2019 года, включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Из приведенного выше, будет понятно, что, хотя конкретные конкретный варианты осуществления изобретения описаны в настоящем описании для целей иллюстрации, различные модификации могут быть внесены без отклонения от сущности и объема изобретения. Таким образом, изобретение не ограничивается ничем кроме прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения инфекции вирусом гепатита В (HBV) у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму однократной дозы фармацевтической композиции, содержащей антитело, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO.:91 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO.:93.

2. Способ по п.1, где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в диапазоне от 2 до 18 мг/кг (массы тела индивидуума).

3. Способ по п.1 или 2, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 6 мг, вплоть до 18 мг, вплоть до 75 мг, вплоть до 90 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 900 мг или вплоть до 3000 мг антитела.

4. Способ по любому из пп.1-3, где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в концентрации в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл, как например, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.

5. Способ по любому из пп.1-4, где однократная доза фармацевтической композиции содержит приблизительно 75 мг антитела.

6. Способ по любому из пп.1-4, где однократная доза фармацевтической композиции содержит приблизительно 90 мг антитела.

7. Способ по любому из пп.1-4, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 300 мг антитела.

8. Способ по любому из пп.1-4, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 900 мг антитела.

9. Способ по любому из пп.1-4, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 3000 мг антитела.

10. Способ по любому из пп.1-9, где способ включает введение однократной дозы посредством подкожной инъекции.

11. Способ по любому из пп.1-9, где способ включает введение однократной дозы посредством внутривенной инъекции.

12. Способ по любому из пп.1-11, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду, необязательно воду USP.

13. Способ по любому из пп.1-12, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит гистидин, необязательно в концентрации в диапазоне от 10 mM до 40 mM, как например, 20 mM, в фармацевтической композиции.

14. Способ по любому из пп.1-13, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит дисахарид, такой как сахароза, необязательно в количестве 5%, 6%, 7%, 8% или 9%, предпочтительно приблизительно 7% (масс./об.).

15. Способ по любому из пп.1-14, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество или триблоксополимер, необязательно полисорбат или полуксамер-188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80),

где необязательно полисорбат или полоксамер-188 присутствует в диапазоне от 0,01% до 0,05% (масс./об.), предпочтительно 0,02% (масс./об.).

16. Способ по любому из пп.1-15, где фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от 5,8 до 6,2, в диапазоне от 5,9 до 6,1 или 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2.

17. Способ по п.16, где фармацевтическая композиция содержит:

(i) антитело в количестве 150 мг/мл;

(ii) воду USP;

(iii) 20 mM гистидин;

(iv) 7% сахарозу; и

(v) 0,02% PS80,

где фармацевтическая композиция имеет pH 6.

18. Способ по любому из пп.1-17, где индивидуумом является взрослый.

19. Способ по п.18, где возраст индивидуума находится в диапазоне от 18 лет до 65 лет.

20. Способ по любому из пп.1-19, где масса тела индивидуума составляет от 40 кг до 125 кг.

21. Способ по любому из пп.1-20, где индивидуум имеет хроническую инфекцию HBV; например, определяемую положительным сывороточным HBsAg, ДНК HBV и/или HBeAg 2 раза, где интервал между этими 2 разами составляет по меньшей мере 6 месяцев.

22. Способ по любому из пп.1-21, где индивидуум не имеет цирроза.

23. Способ по п.22, где отсутствие цирроза определяют посредством:

оценки с использованием Fibroscan (например, в пределах 6 месяцев до введения однократной дозы фармацевтической композиции); или

биопсии печени (например, в пределах 12 месяцев перед введением однократной дозы фармацевтической композиции),

где предпочтительно отсутствие цирроза определяют по отсутствию фиброза F3 или отсутствию цирроза F4 Metavir.

24. Способ по любому из пп.1-23, где индивидууму вводят нуклеозидный(нуклеотидный) ингибитор обратной транскриптазы (NRTI), необязательно в пределах 120 суток, кроме того, необязательно в пределах 60 суток, перед введением однократной дозы.

25. Способ по п.24, где NRTI содержит один или несколько из: тенофовира; тенофовира дисопроксила (например, тенофовир фумарат); тенофовира алафенамида; энтекавира; ламивудина; адефовира и адефовира дипивоксила.

26. Способ по любому из пп.1-25, где индивидуум имеет сывороточную концентрацию ДНК HBV менее 100 МЕ/мл не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

27. Способ по любому из пп.1-26, где индивидуум имеет сывороточную концентрацию HBsAg менее 1000 МЕ/мл перед введением однократной дозы.

28. Способ по любому из пп.1-26, где индивидуум имеет сывороточную

концентрацию HBsAg более или ровно 1000 МЕ/мл не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

29. Способ по любому из пп.1-28, где индивидуум был негативным по е-антигену HB (HBeAg) не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

30. Способ по любому из пп.1-29, где индивидуум был негативным в отношении антител против HBs не более чем за 28 суток до введения однократной дозы.

31. Способ по любому из пп.1-30, где индивидуум перед введением однократной дозы:

(i) не имеет фиброза и/или не имеет цирроза; и/или

(ii) имеет аланинаминотрансферазу (ALT) $< 2 \times$ верхняя граница нормы (ULN).

32. Способ по любому из пп.1-31, где через 56 суток после введения однократной дозы индивидуум имеет > 2 -кратное снижение сывороточного HBsAg (например, концентрация HBsAg в сыворотке, например, при определении с использованием анализа Abbott ARCHITECT) по сравнению с сывороточным HBsAg индивидуума за от 0 суток до 28 суток до введения однократной дозы.

33. Способ по любому из пп.1-32, где после введения однократной дозы (например, через 56 суток после введения однократной дозы), индивидуум:

(i) имеет сниженное или менее тяжелое внутрипеченочное распространение HBV по сравнению с эталонным индивидуумом; и/или

(ii) имеет адаптивный иммунный ответ против HBV.

34. Способ по любому из пп.1-33, где индивидуумом является мужчина.

35. Способ по любому из пп. 1-33, где индивидуумом является женщина.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO.:91 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO.:93, где фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл, как например, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, предпочтительно 150 мг/мл.

37. Фармацевтическая композиция по п.36, где фармацевтическая композиция содержит вплоть до 6 мг, вплоть до 18 мг, вплоть до 75 мг, вплоть до 90 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 900 мг или вплоть до 3000 мг антитела.

38. Фармацевтическая композиция по п.36 или 37, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 75 мг антитела.

39. Фармацевтическая композиция по п.36 или 37, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 90 мг антитела.

40. Фармацевтическая композиция по п.36 или 37, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 300 мг антитела.

41. Фармацевтическая композиция по п.36 или 37, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно 900 мг антитела.

42. Фармацевтическая композиция по п.36 или 37, где фармацевтическая

композиция содержит приблизительно 3000 мг антитела.

43. Фармацевтическая композиция по любому из пп.36-42, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду, необязательно воду USP.

44. Фармацевтическая композиция по любому из пп.36-43, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит гистидин, необязательно в концентрации от 10 мМ до 40 мМ, такой как 20 мМ, в фармацевтической композиции.

45. Фармацевтическая композиция по любому из пп.36-44, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит дисахарид, такой как сахароза, необязательно в количестве 5%, 6%, 7%, 8% или 9%, предпочтительно приблизительно 7% (масс./об.).

46. Фармацевтическая композиция по любому из пп.36-45, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, необязательно полисорбат, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), где необязательно полисорбат присутствует в диапазоне от 0,01% до 0,05% (масс./об.), предпочтительно 0,02% (масс./об.).

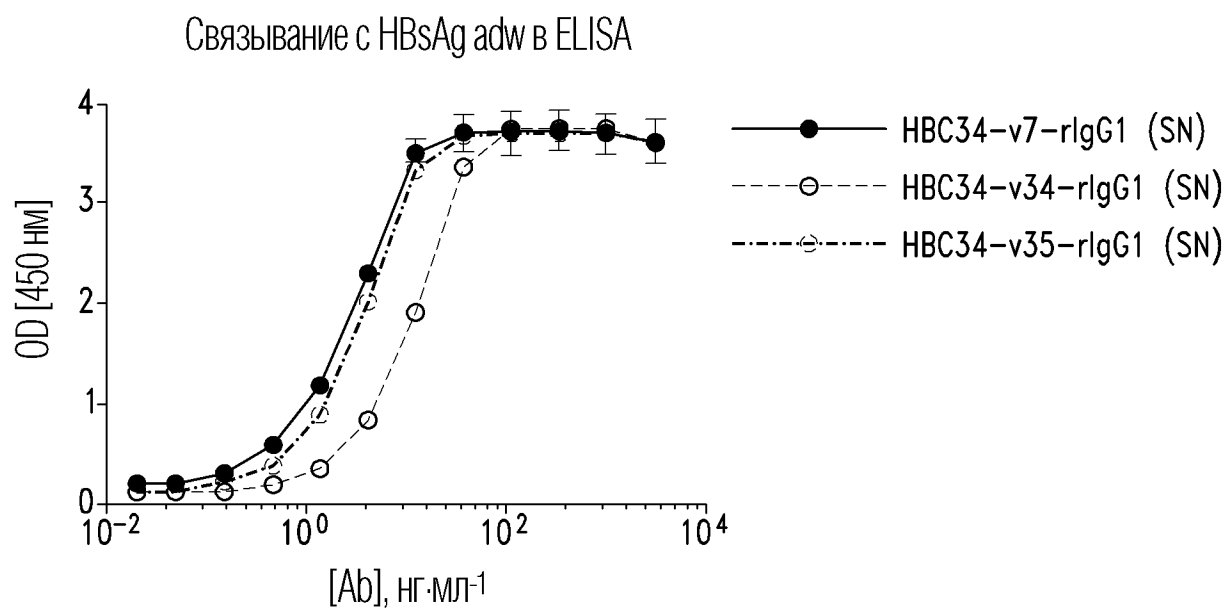
47. Фармацевтическая композиция по любому из пп.36-46, где фармацевтическая композиция имеет рН в диапазоне от 5,8 до 6,2, в диапазоне от 5,9 до 6,1 или 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2.

48. Фармацевтическая композиция по любому из пп.36-47, где фармацевтическая композиция содержит:

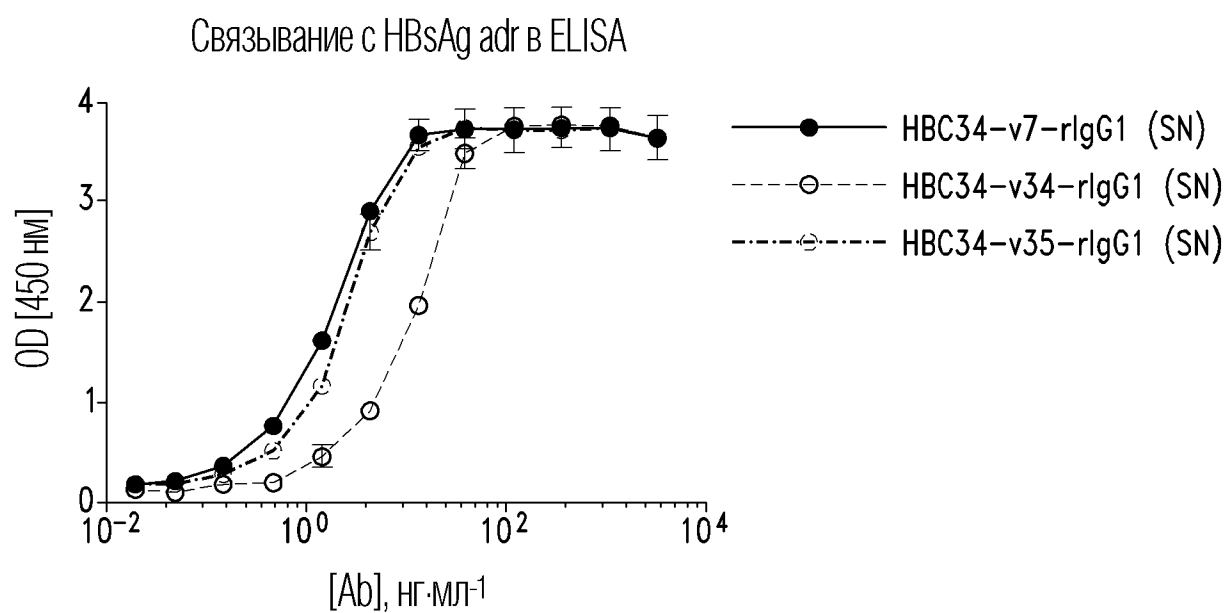
- (i) антитело в количестве 150 мг/мл;
- (ii) воду USP;
- (iii) 20 мМ гистидин;
- (iv) 7% сахарозу; и
- (v) 0,02% PS80,

где фармацевтическая композиция имеет рН 6.

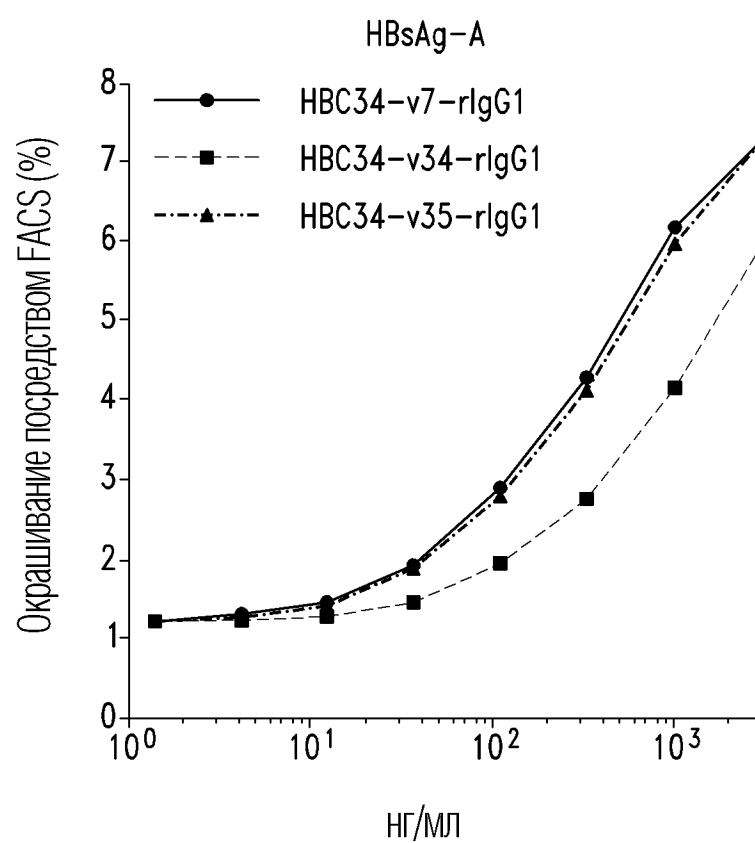
1/45



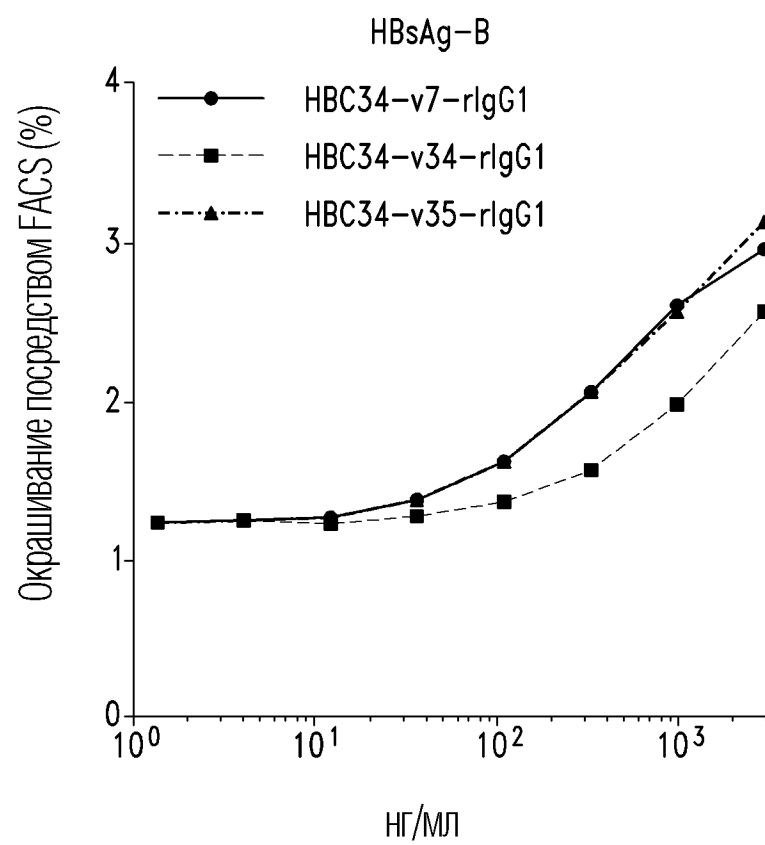
ФИГ. 1А



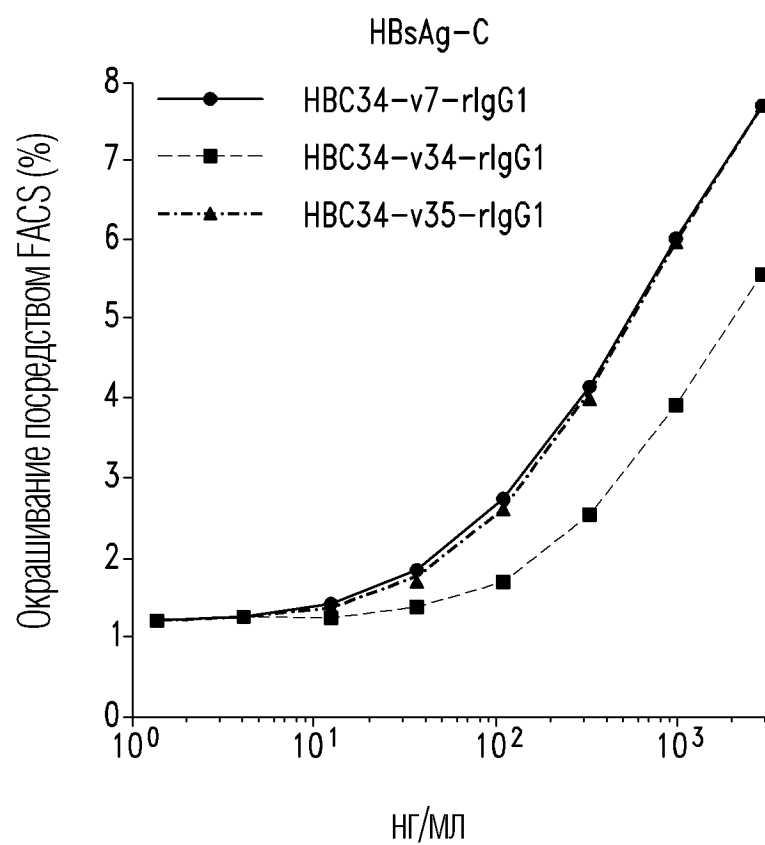
ФИГ. 1В



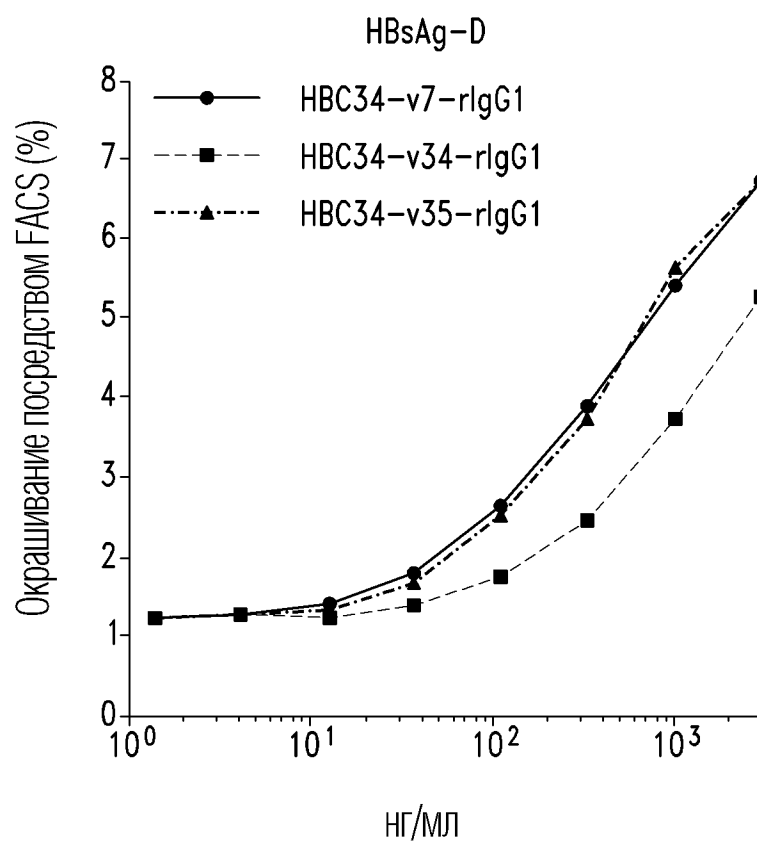
ФИГ. 2А



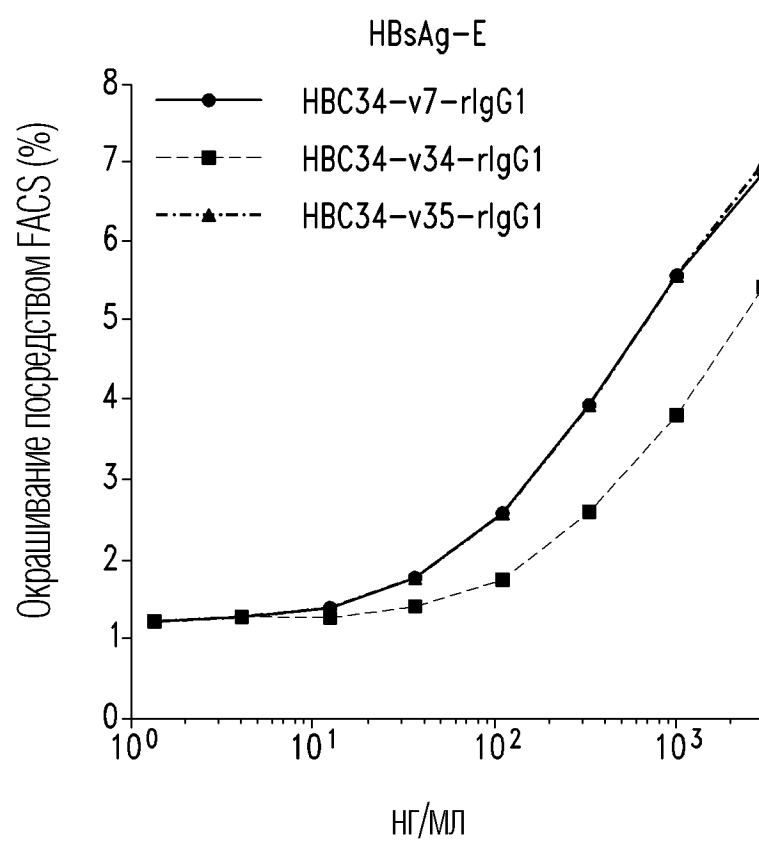
ФИГ. 2В



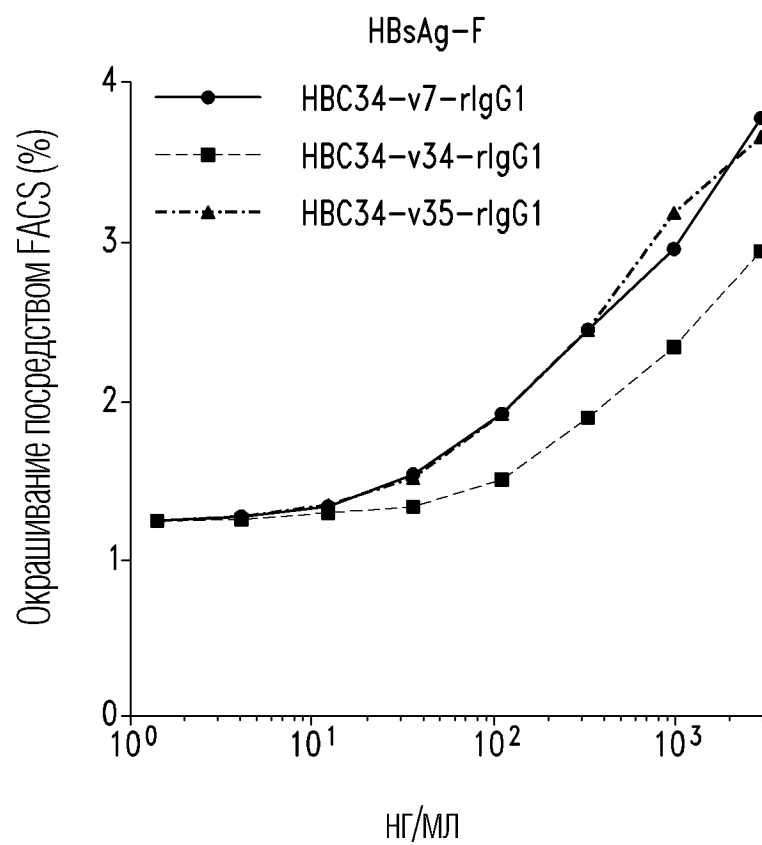
ФИГ. 2С



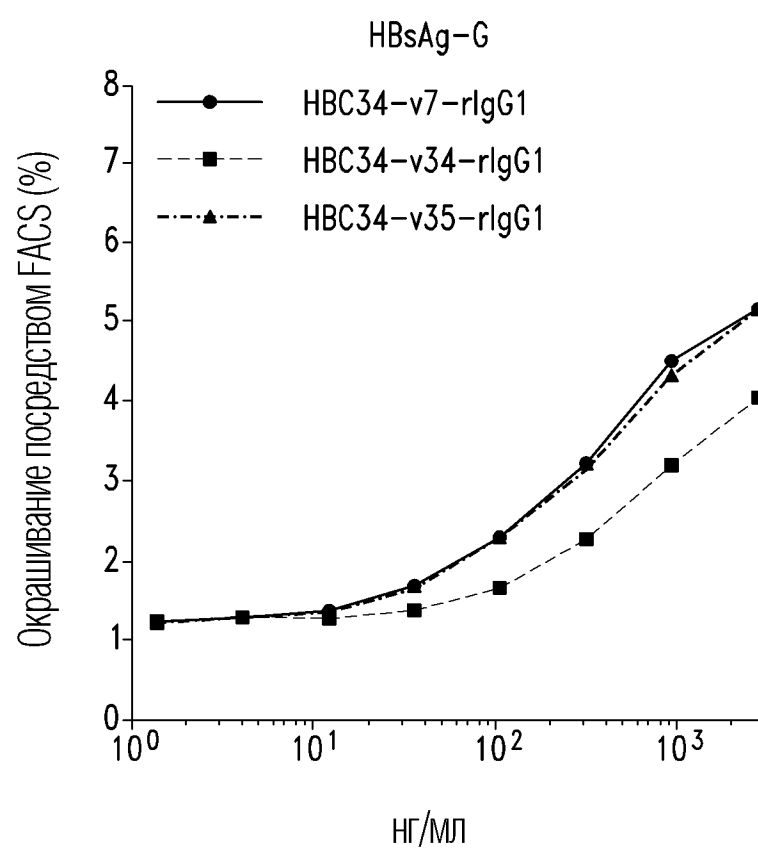
ФИГ. 2D



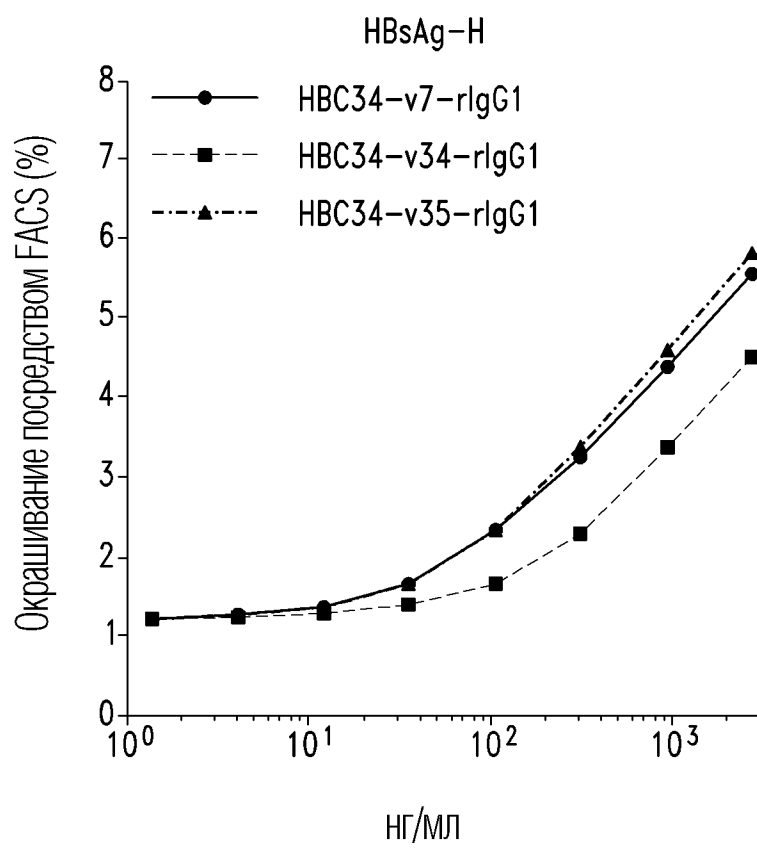
ФИГ. 2Е



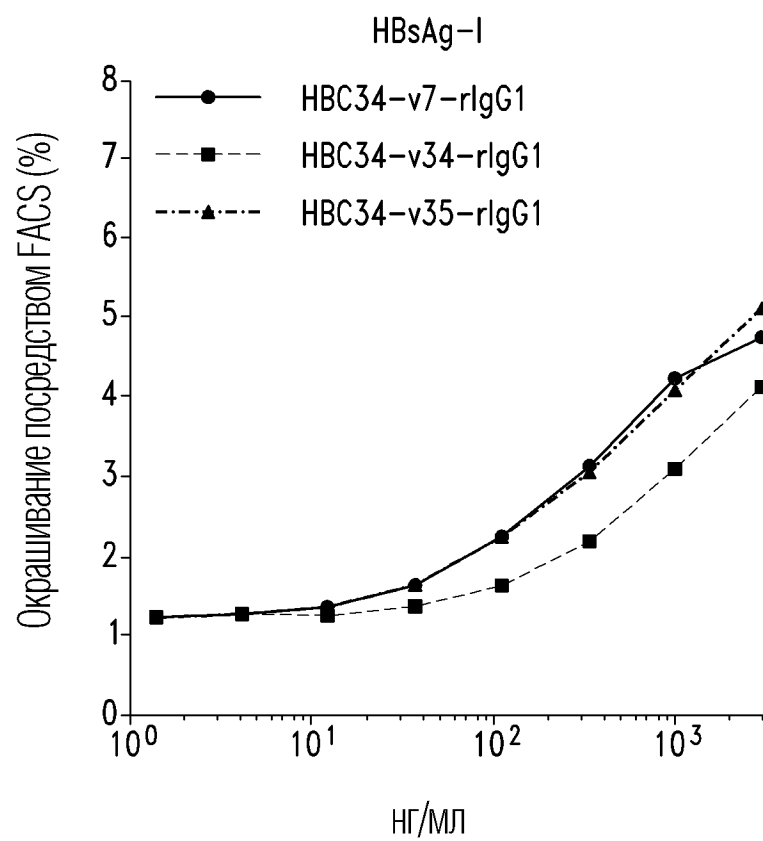
ФИГ. 2F



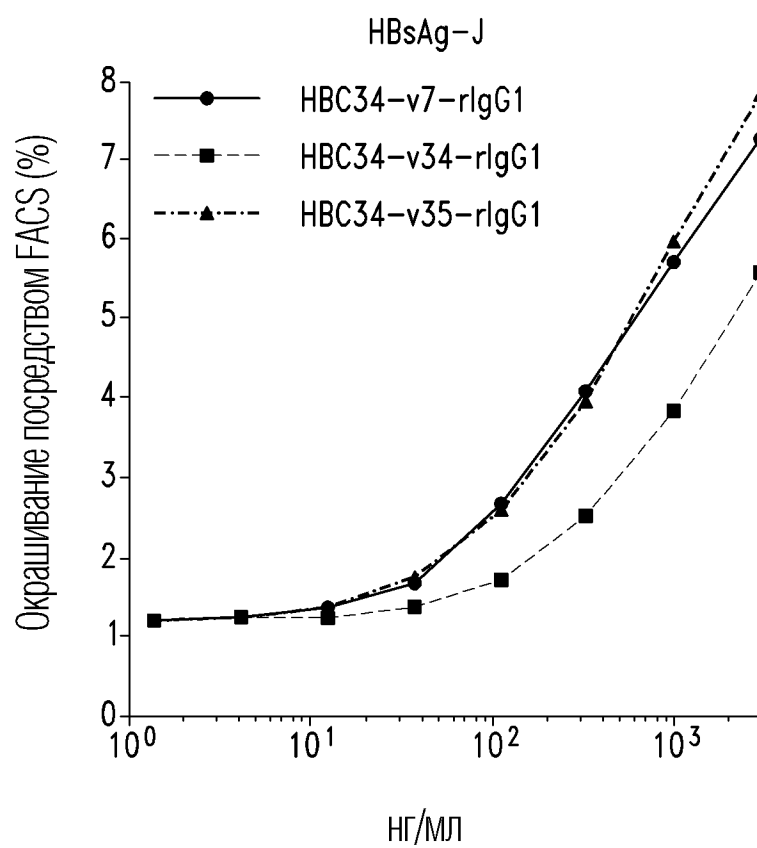
ФИГ. 2G



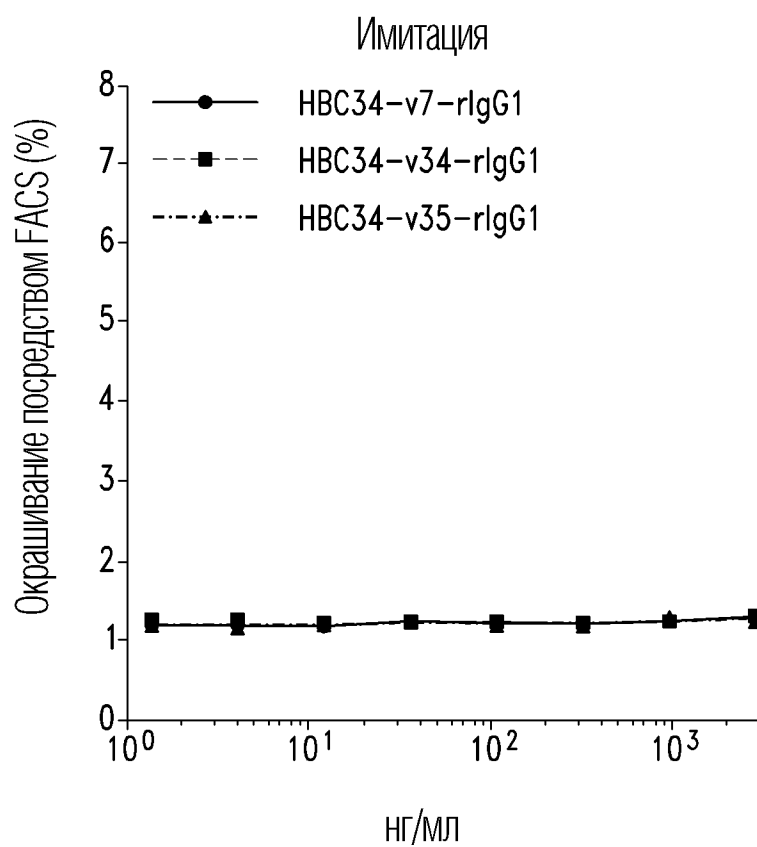
ФИГ. 2Н



ФИГ. 21

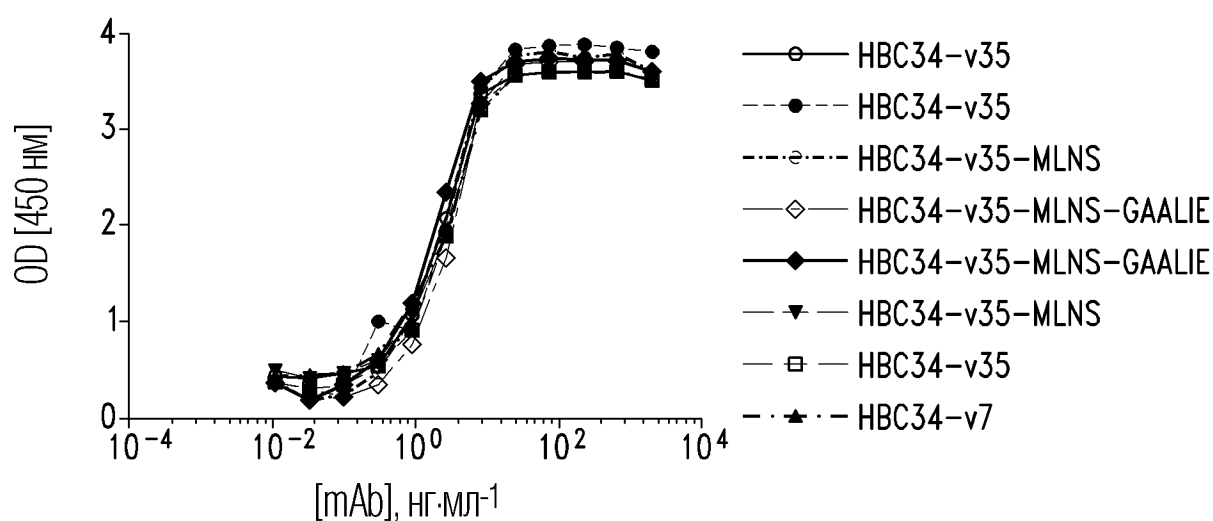


ФИГ. 2J



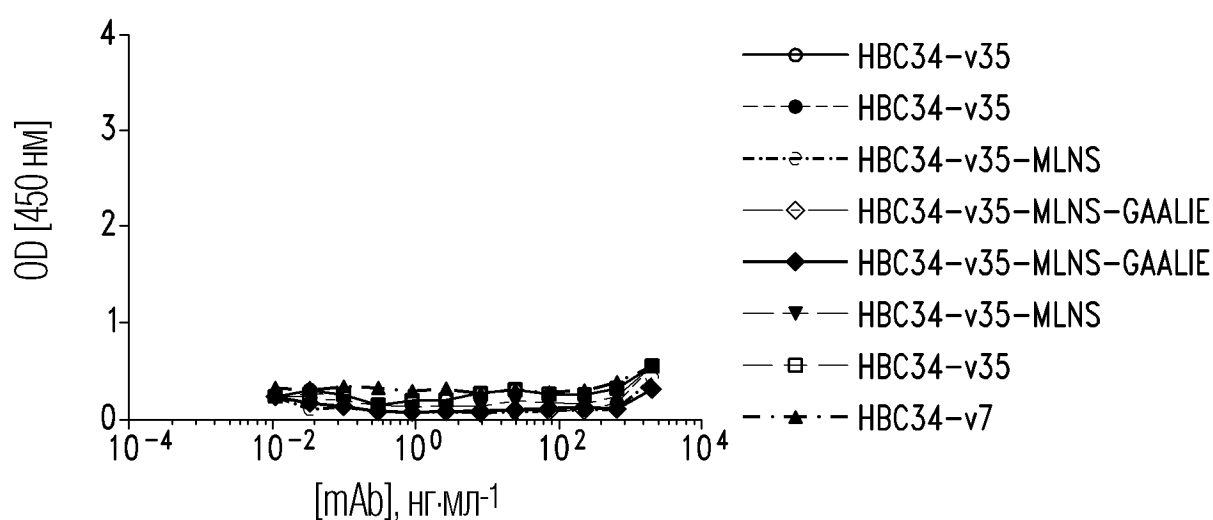
ФИГ. 2К

Связывание с HBsAg (adw), эксперимент 1



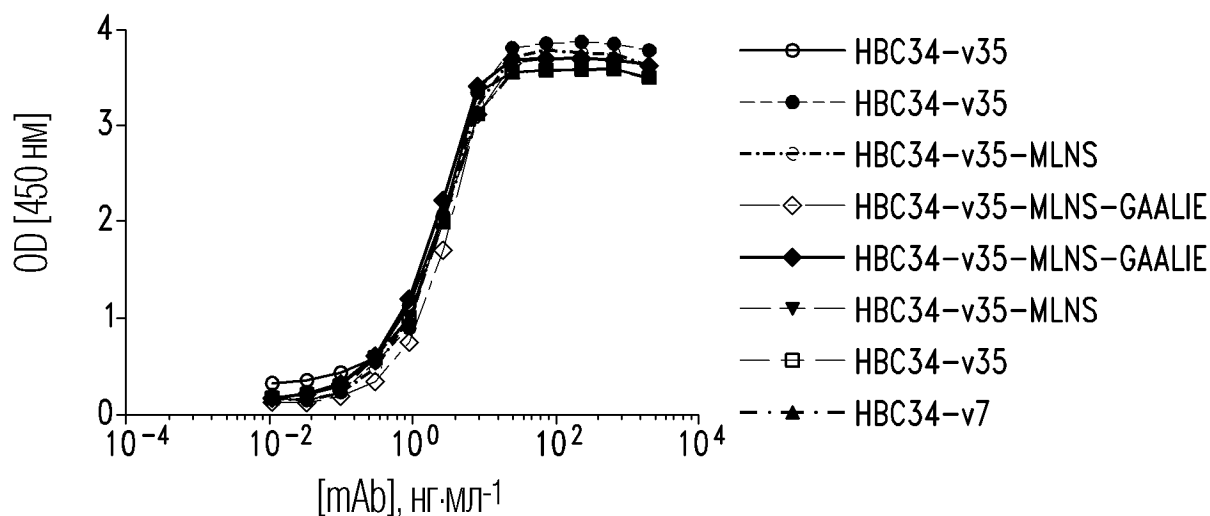
	EC50
HBC34-v35	2.43
HBC34-v35	2.799
HBC34-v35-MLNS	2.565
HBC34-v35-MLNS-GAALIE	3.186
HBC34-v35-MLNS-GAALIE	1.982
HBC34-v35-MLNS	2.309
HBC34-v35	2.662

Связывание с непокрытыми планшетами, эксперимент 1



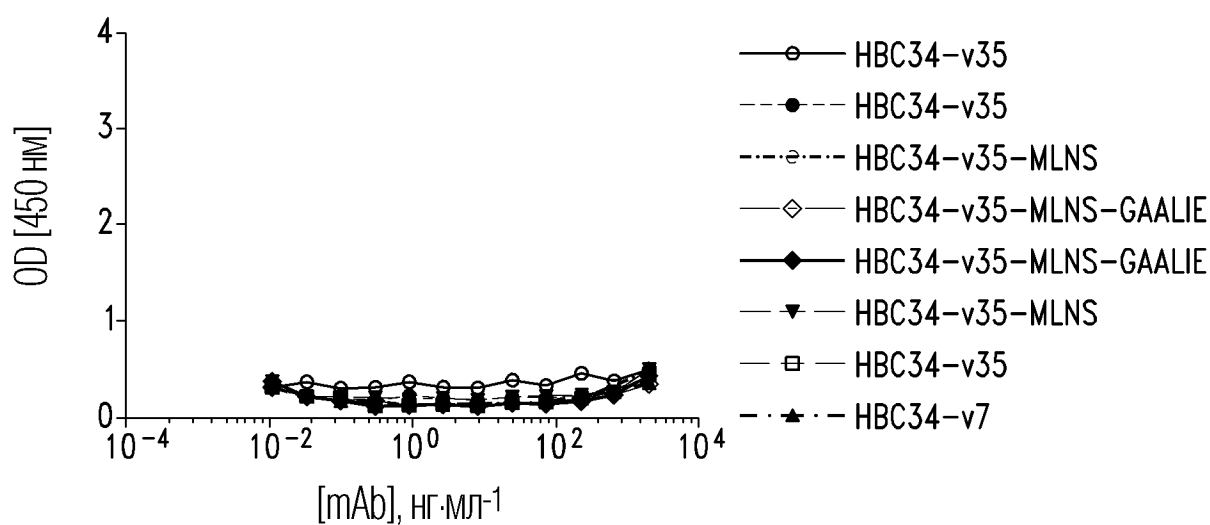
ФИГ. 3А

Связывание с HBsAg (adw), эксперимент 2



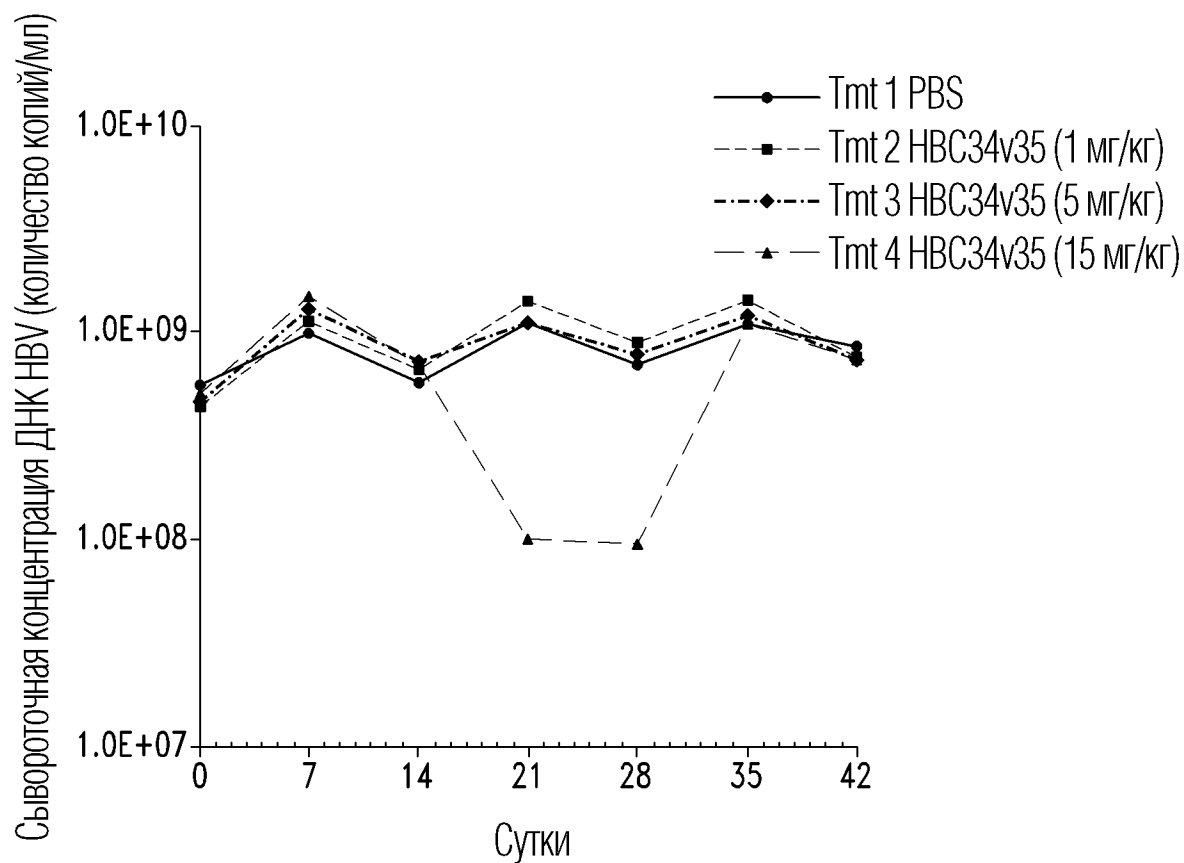
	EC50
HBC34-v35	2.278
HBC34-v35	2.651
HBC34-v35-MLNS	2.484
HBC34-v35-MLNS-GAALIE	3.018
HBC34-v35-MLNS-GAALIE	1.958
HBC34-v35-MLNS	2.174
HBC34-v35	2.358

Связывание с непокрытыми планшетами, эксперимент 2

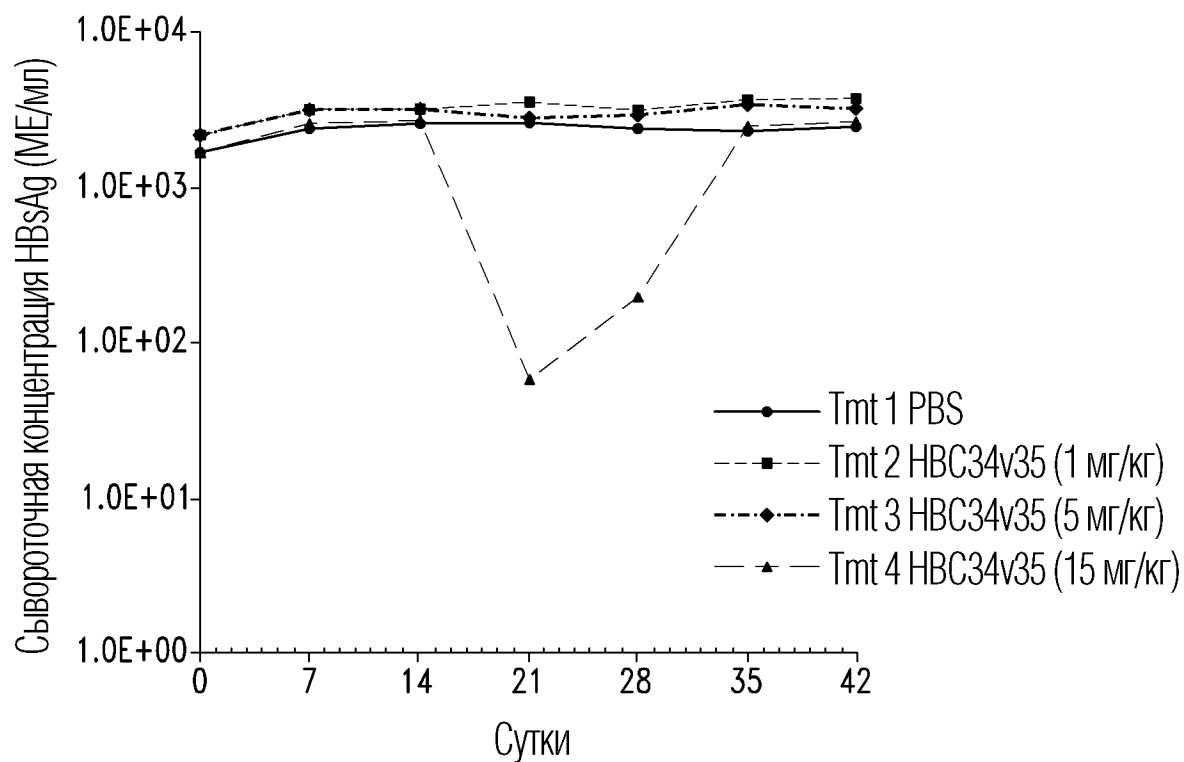


ФИГ. 3В

15/45

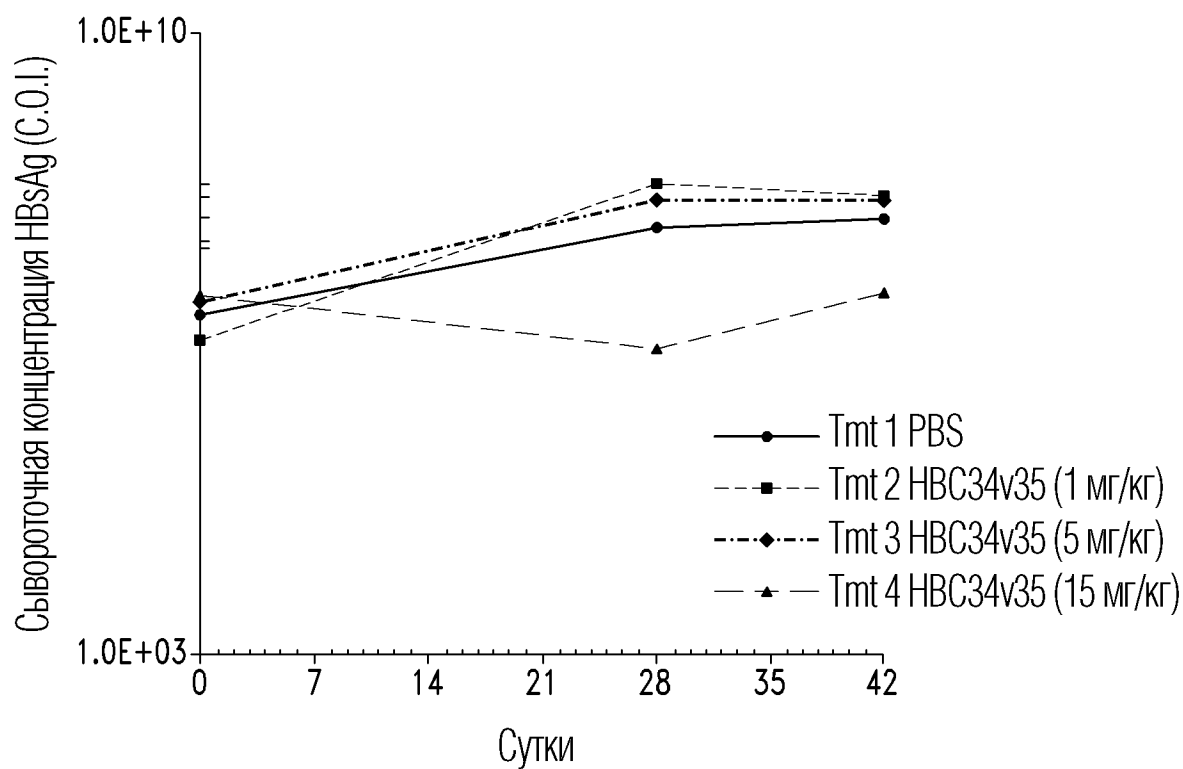


ФИГ. 4

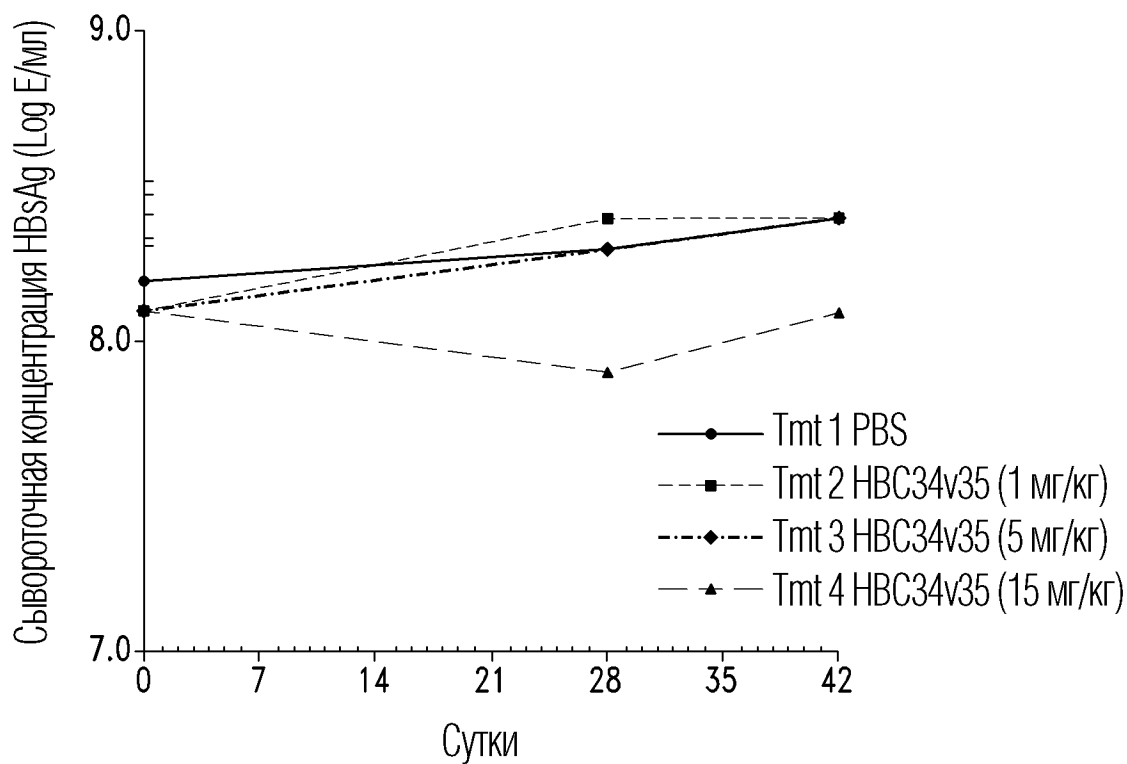


ФИГ. 5

16/45

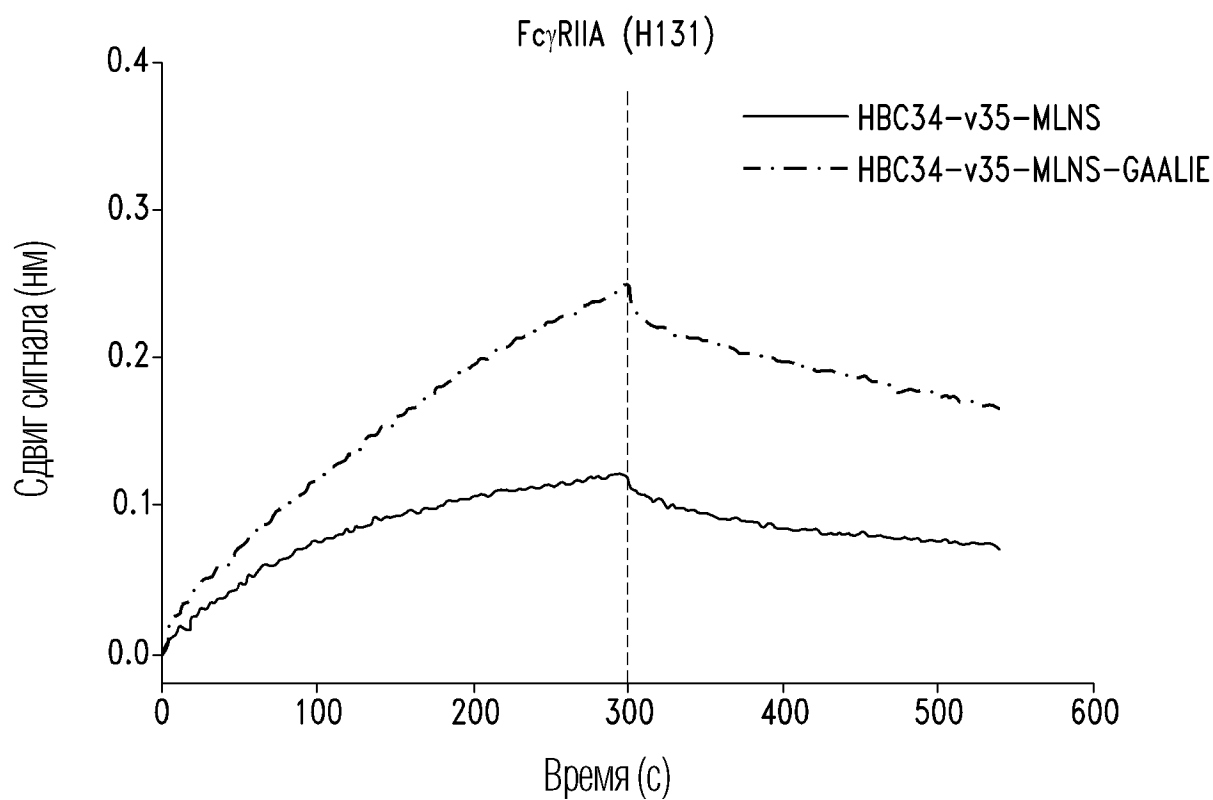


ФИГ. 6

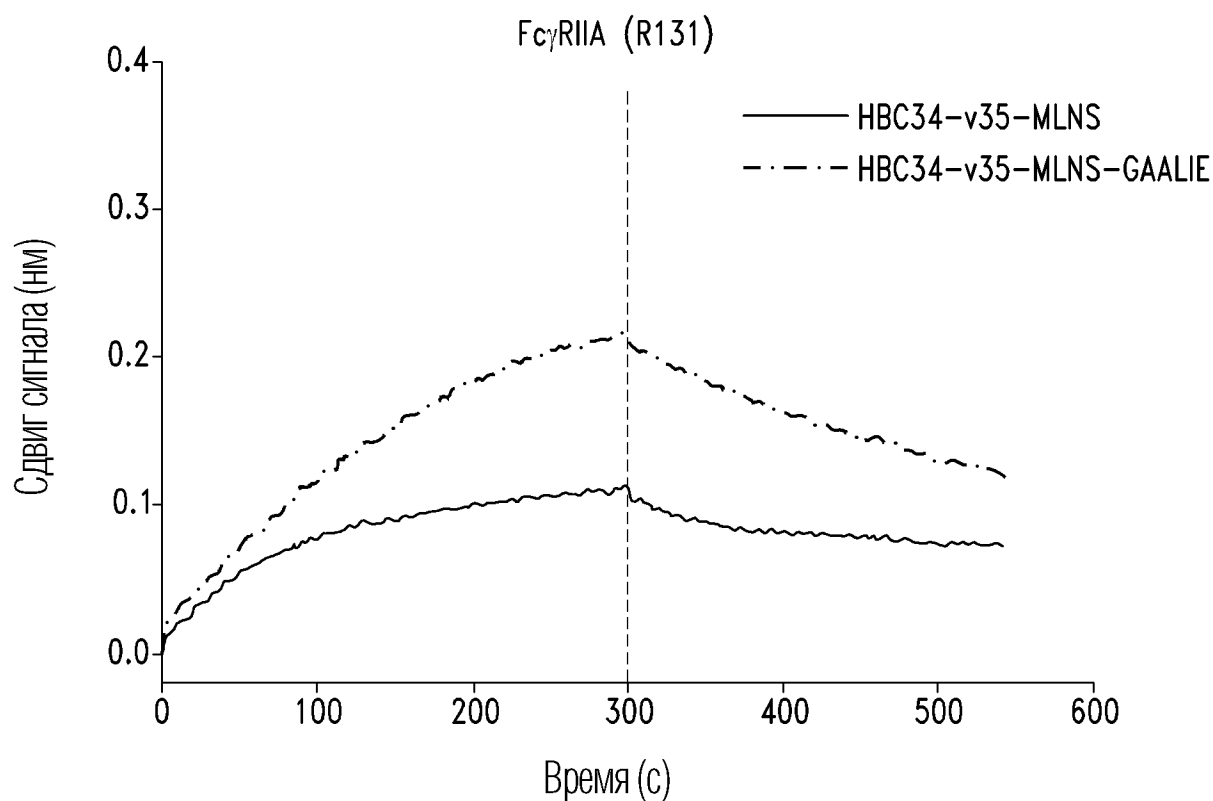


ФИГ. 7

17/45

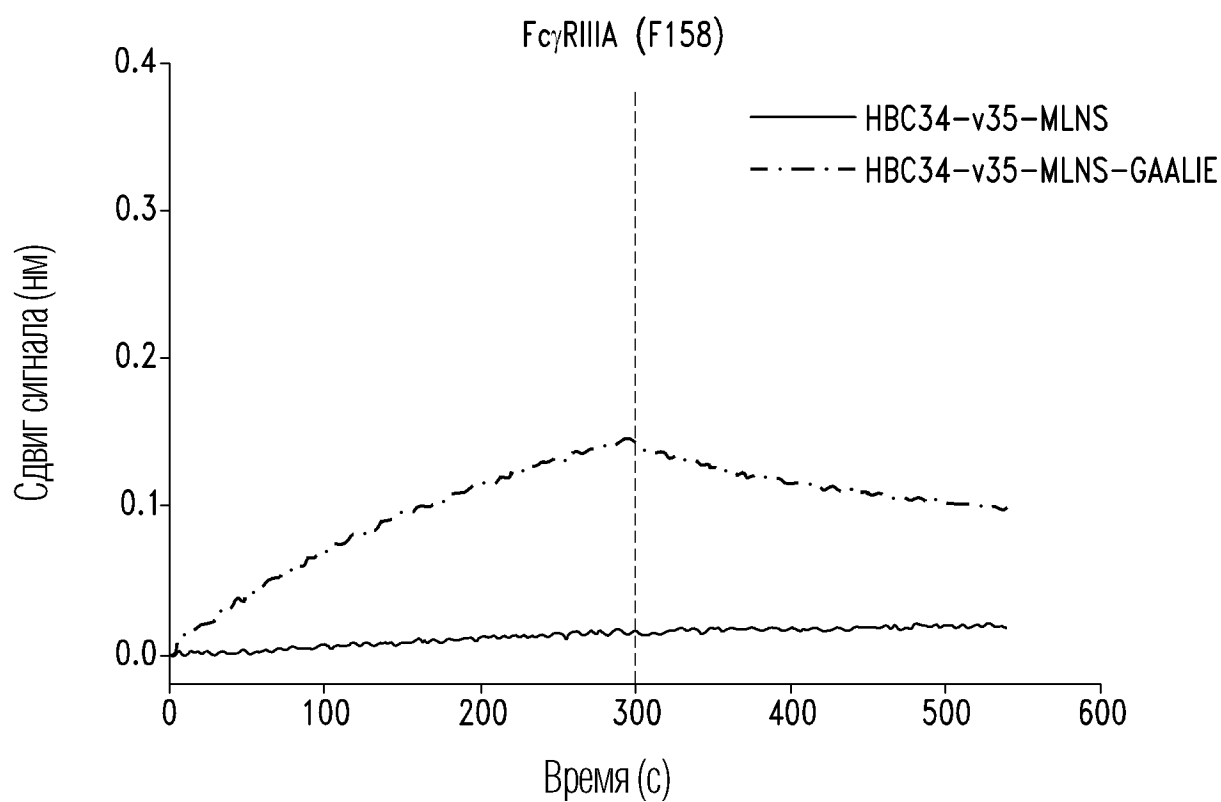


ФИГ. 8А

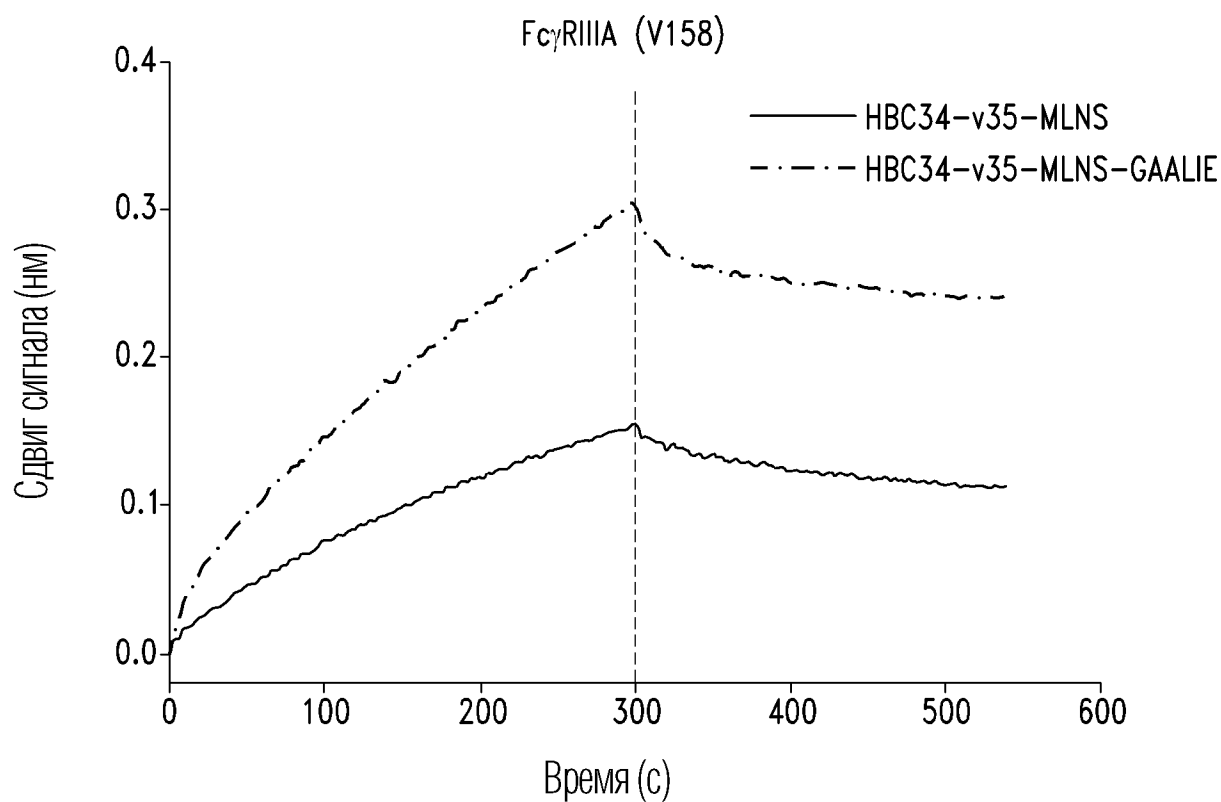


ФИГ. 8В

18/45

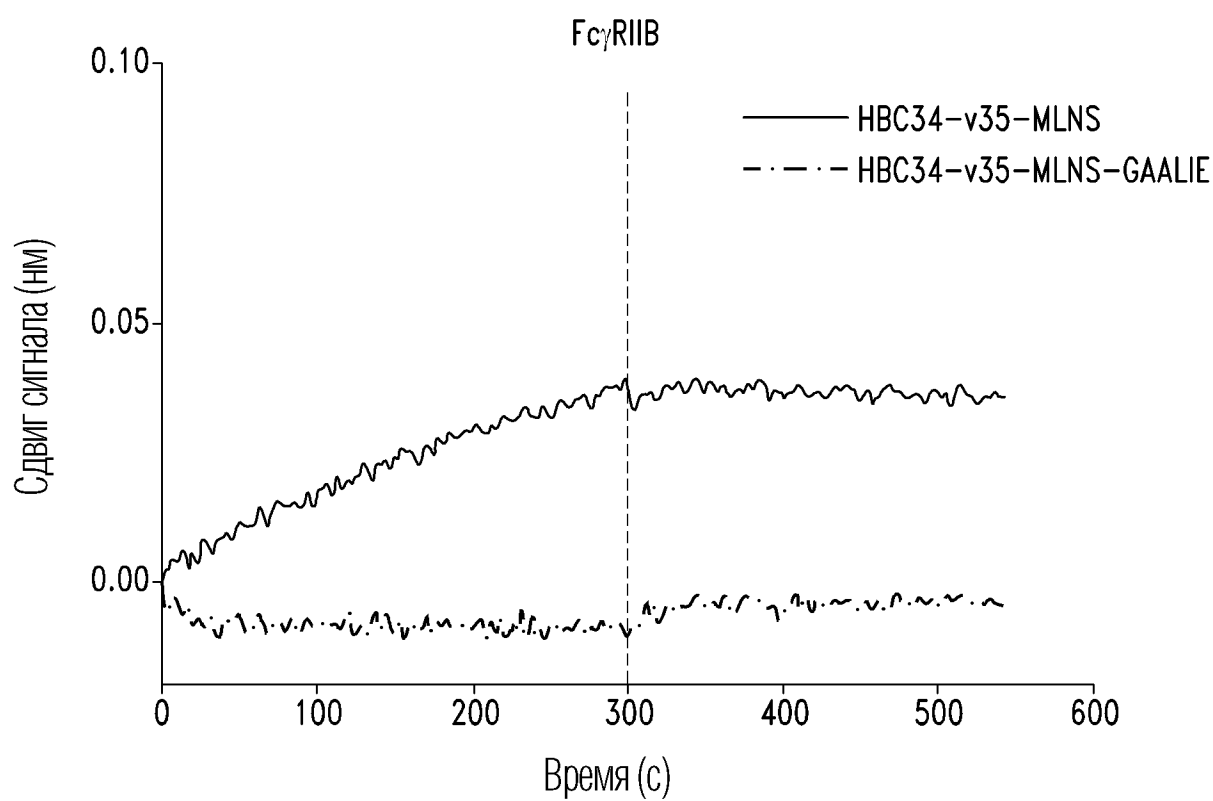


ФИГ. 8С

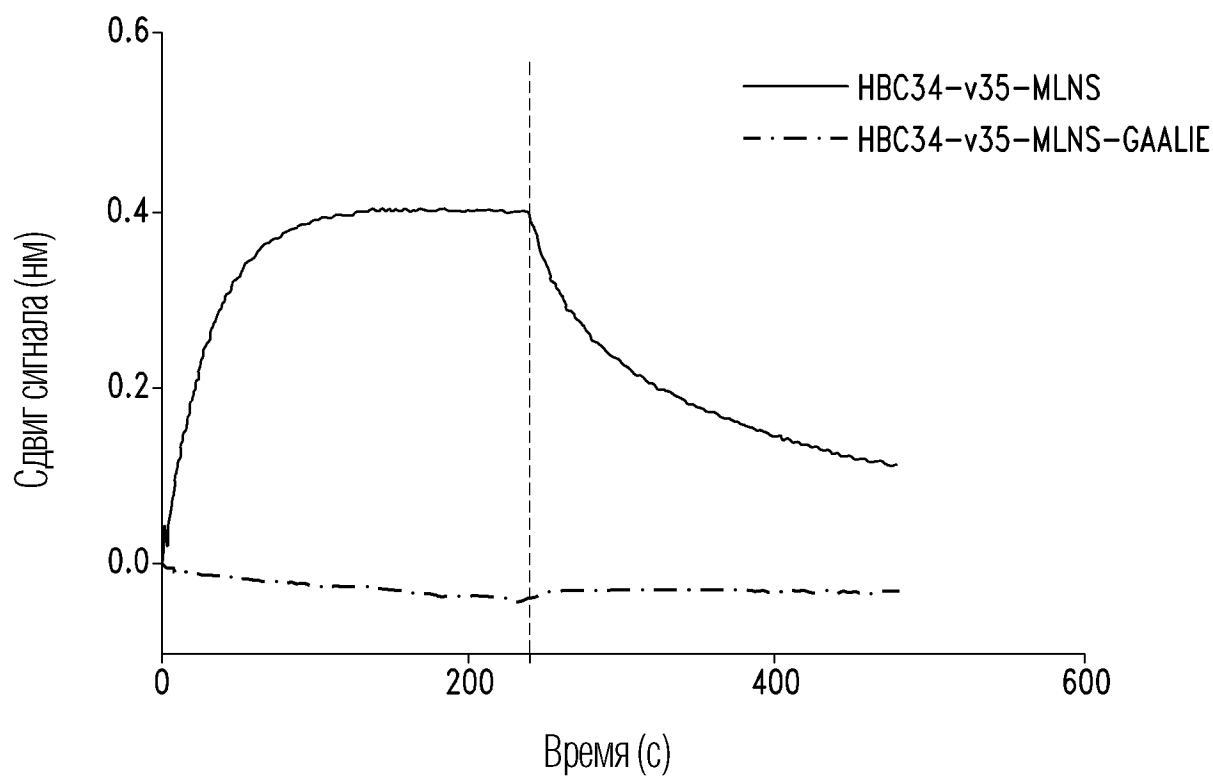


ФИГ. 8D

19/45

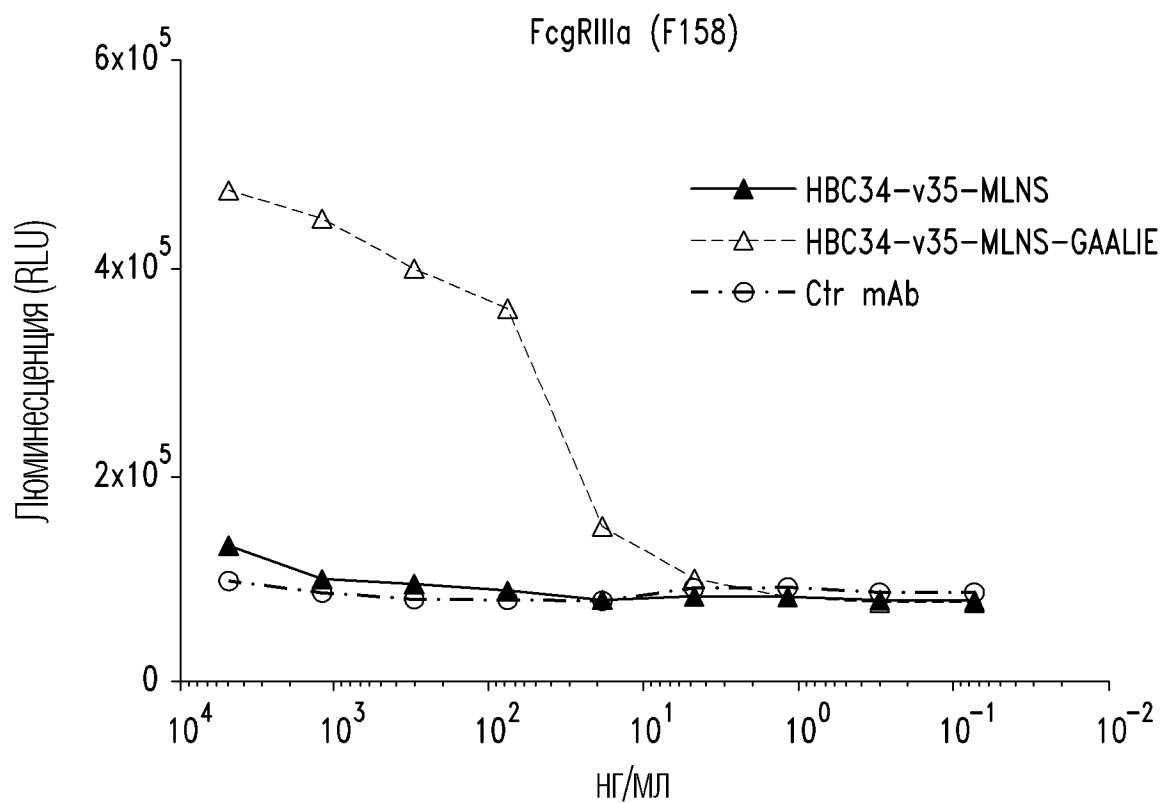


ФИГ. 8Е

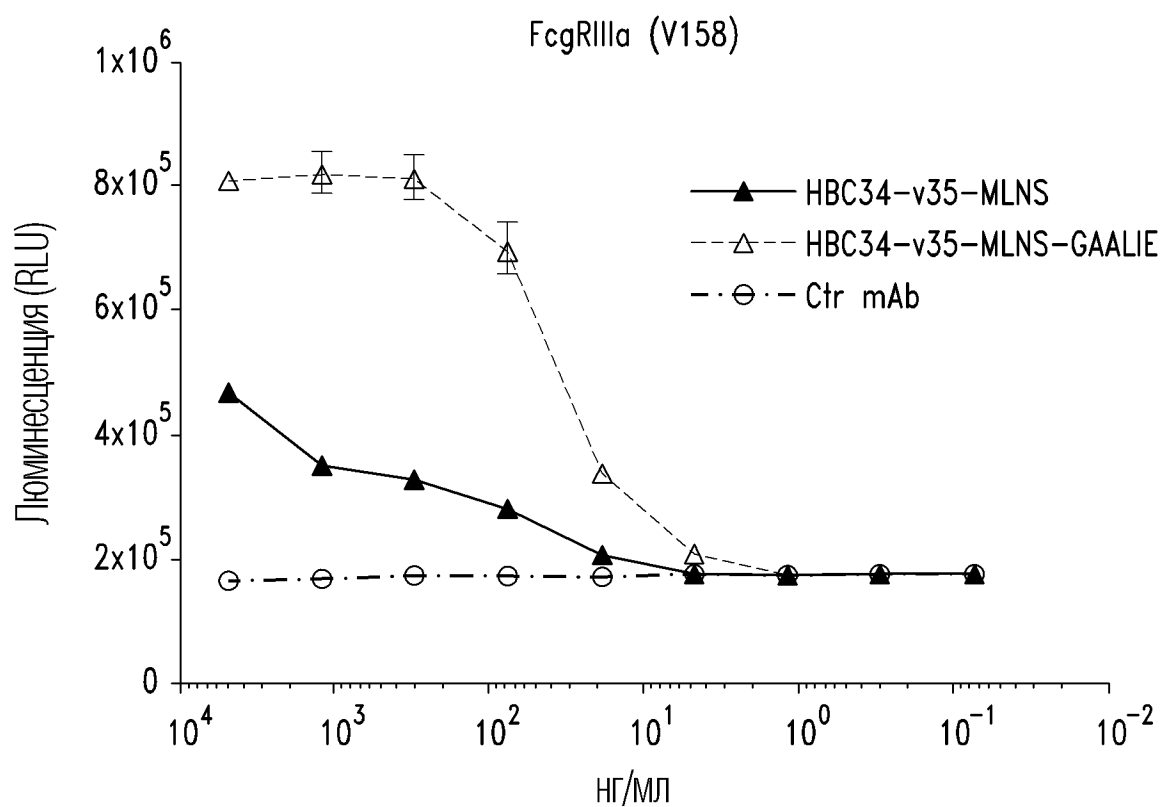


ФИГ. 9

20/45

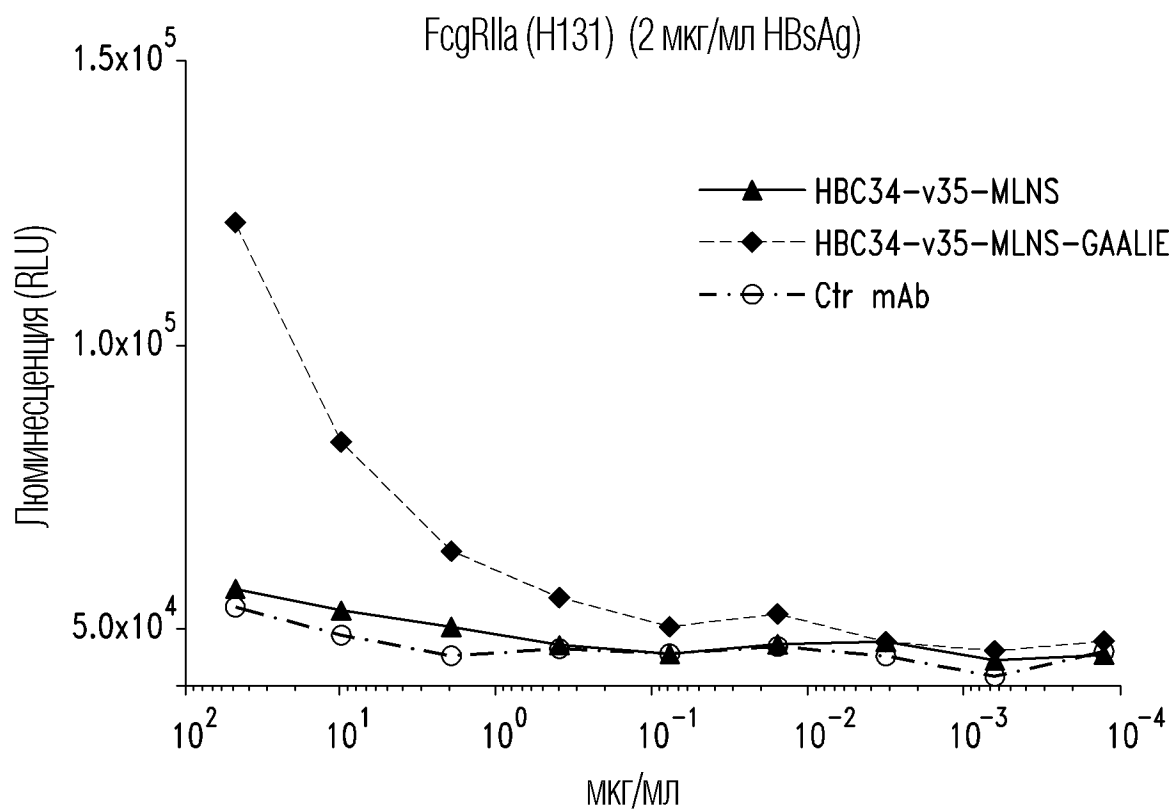


ФИГ. 10А

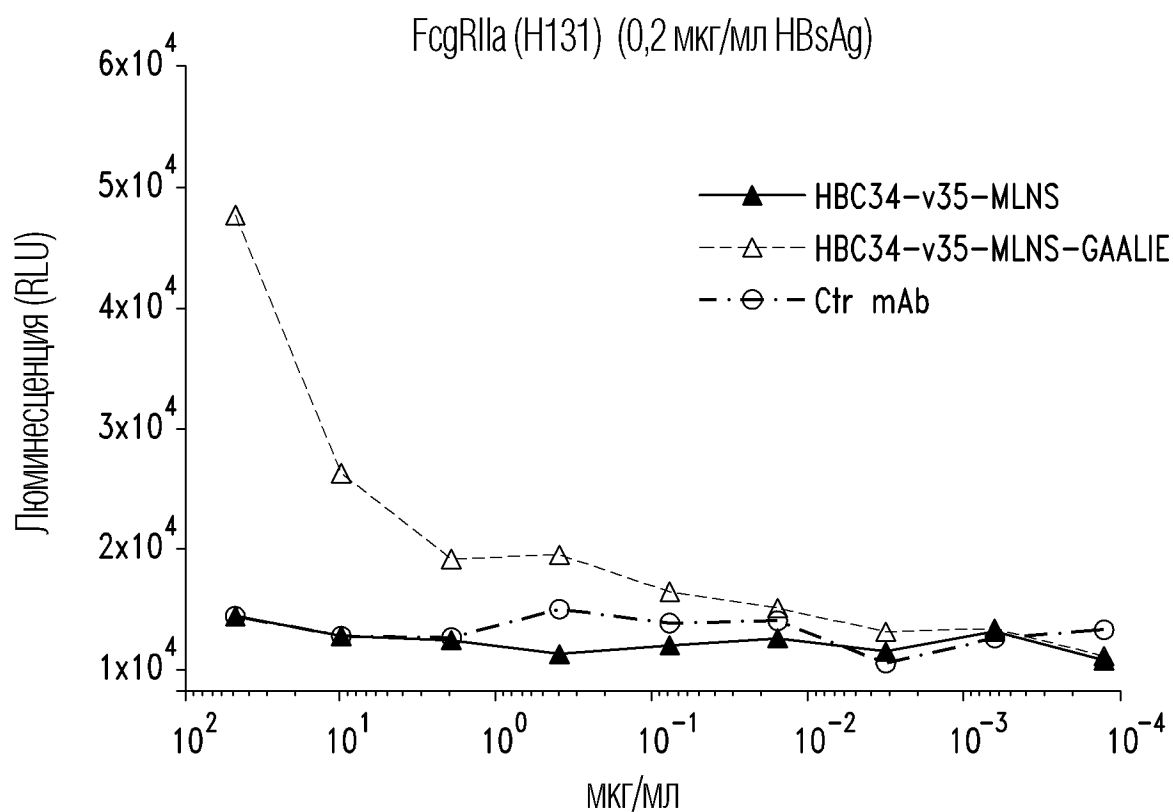


ФИГ. 10В

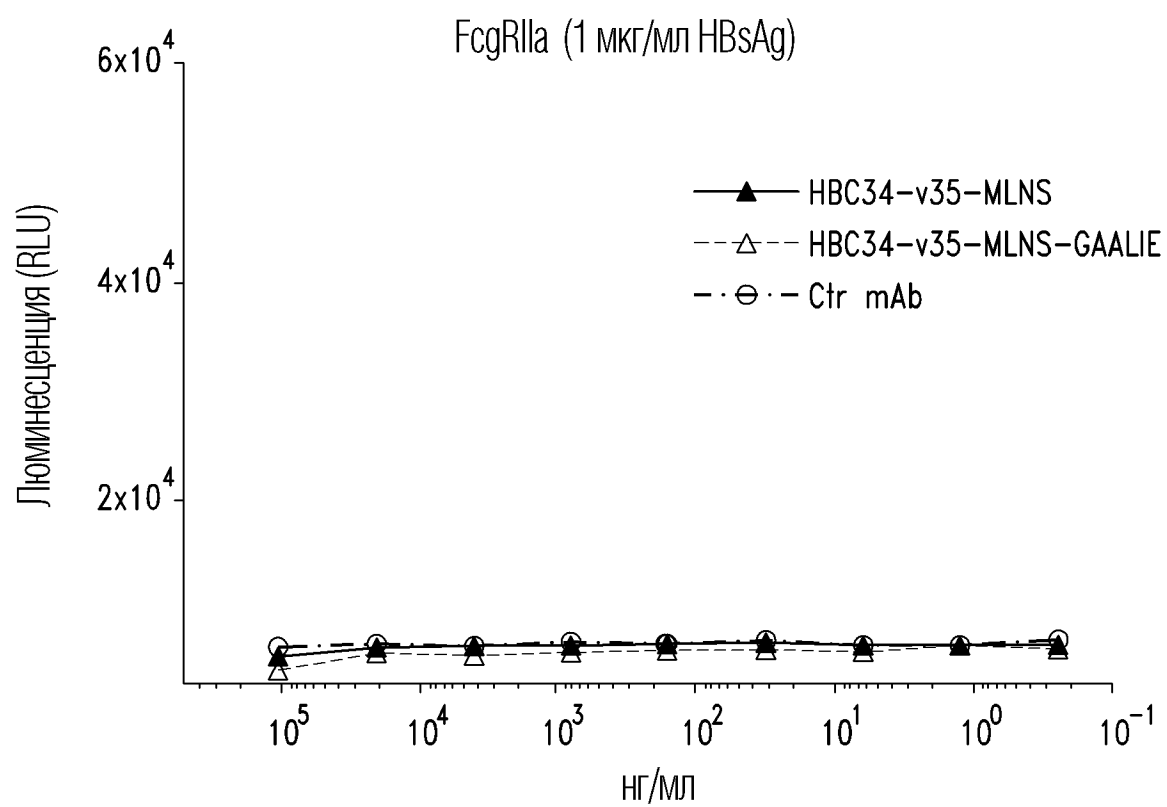
21/45



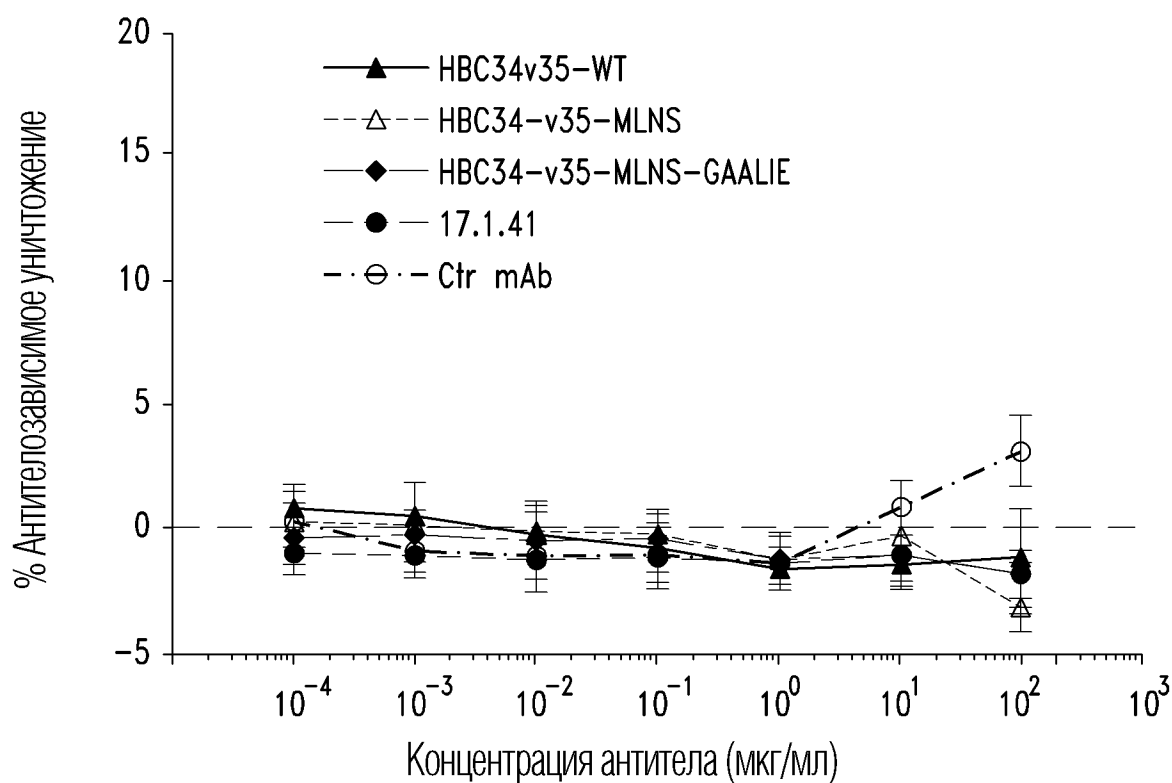
ФИГ. 11А



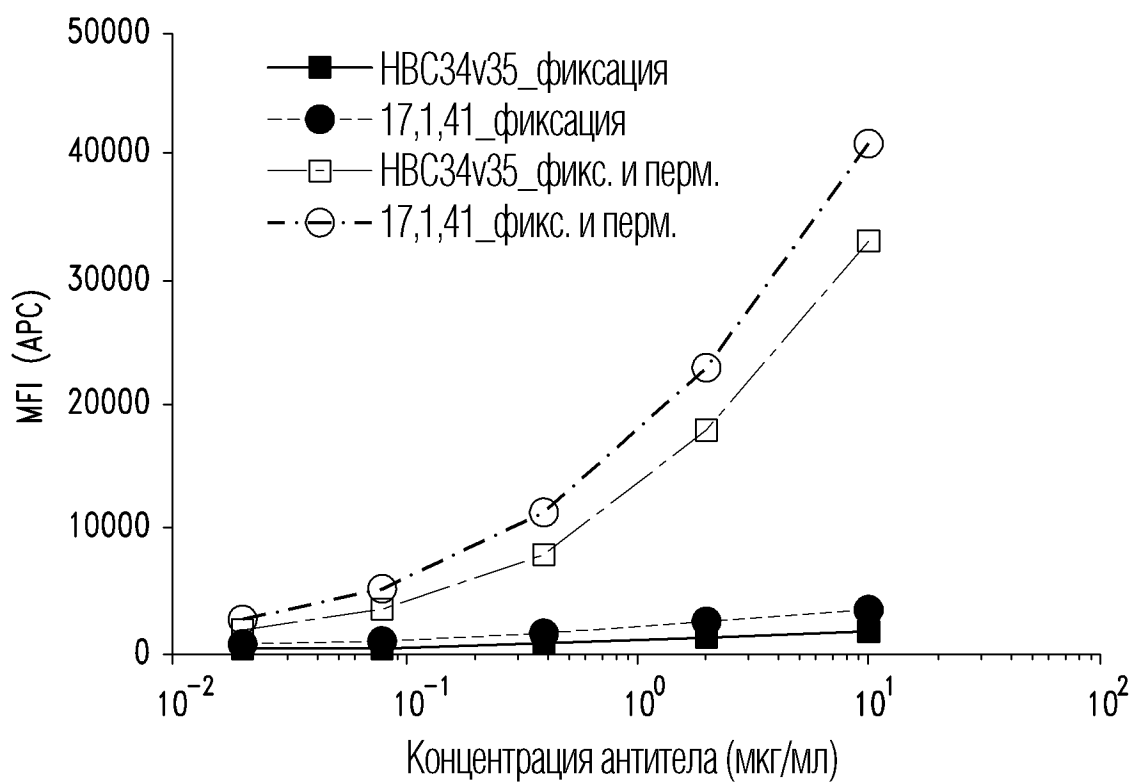
ФИГ. 11В



ФИГ. 12

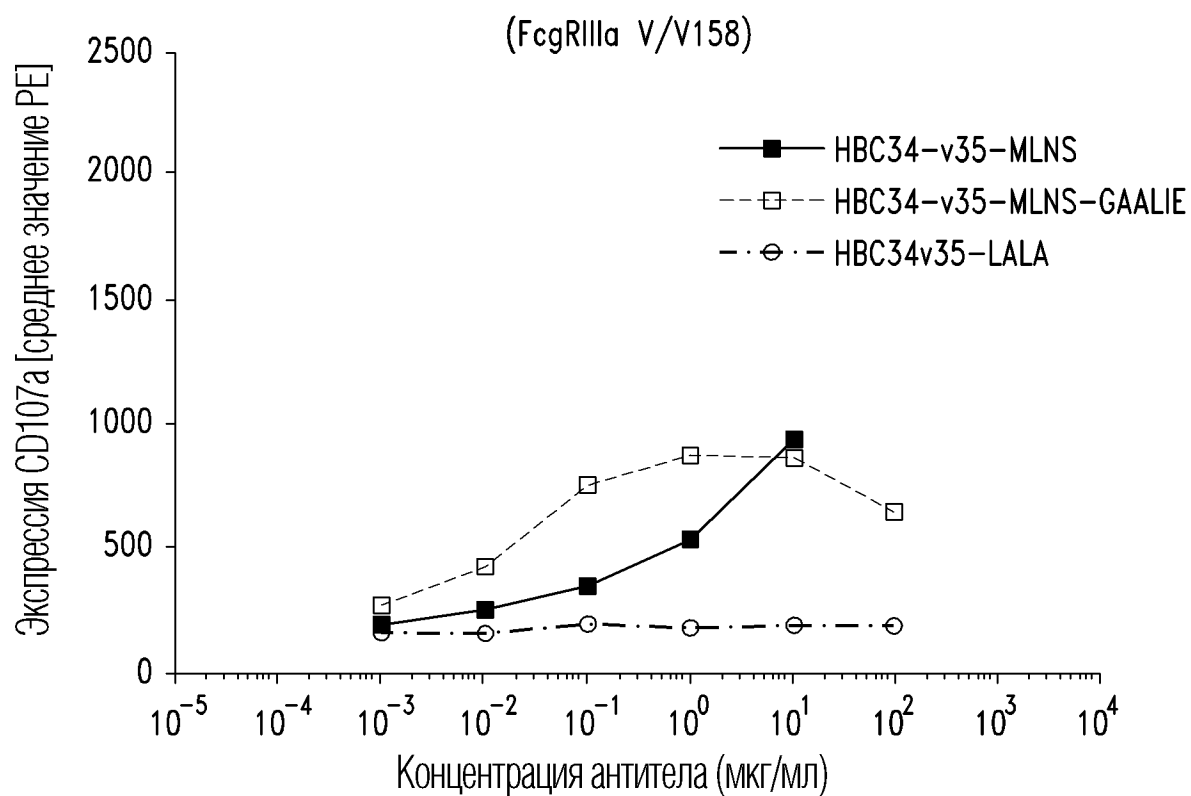


ФИГ. 13А

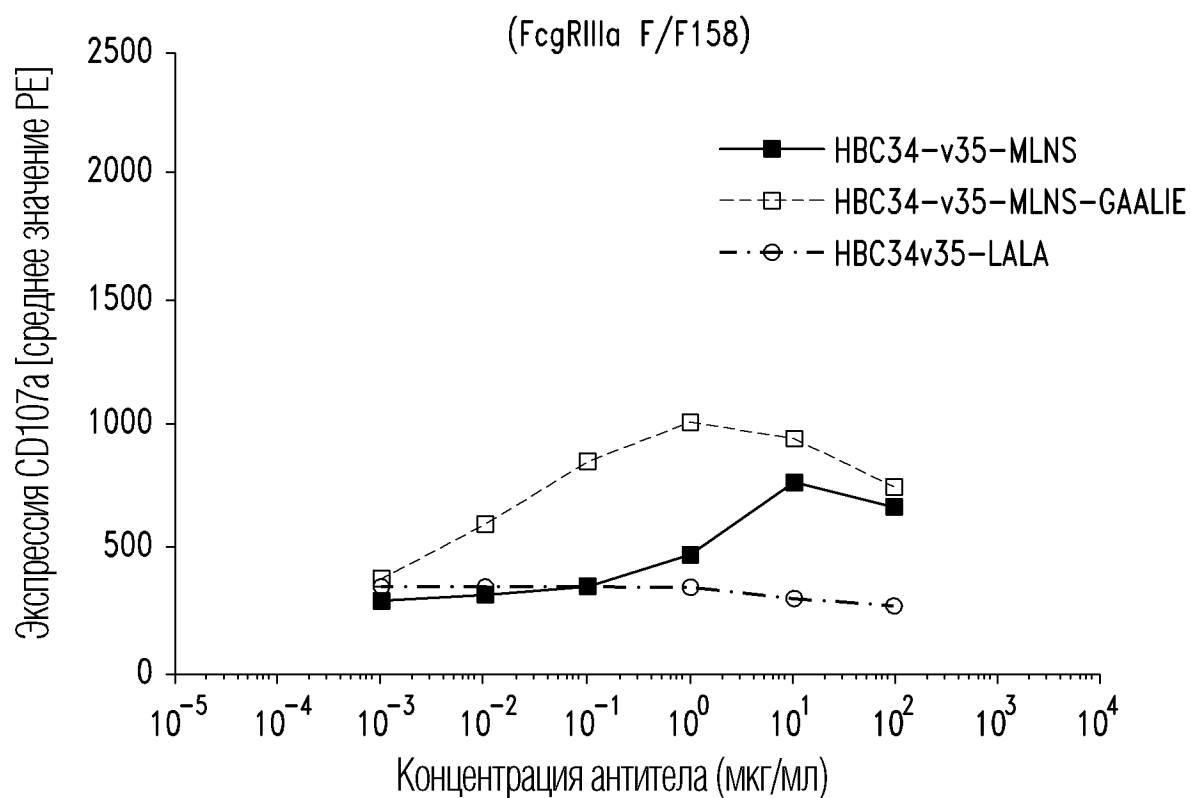


ФИГ. 13В

24/45



ФИГ. 14А



ФИГ. 14В

Часть А											
		Стационар ^а		Амбулаторно							
Стадия испытания	Скрининг	Сутки дозир.	Период наблюдения после введения дозы								
Неделя посещения в испытании					W1	W2	W4	W8	W12	W18	W24/ET ^б
Сутки посещения в испытании ± окно для посещения	D от -28 до -1	D1 ^с	D2	D4±1	D8±1	D15±2	D29±2	D57±7	D85±7	D127±7	D169±7
Информированное согласие	X										
Демография	X										
Медицинский анамнез ^д	X										
Критерии включения/исключения	X	X ^е									
Полное физикальное обследование ^г	X										X
Направленное на симптомы физикальное обследование		X	X	X	X		X	X	X	X	
Масса тела	X										
Рост	X										
Основные показатели жизнедеятельности ^в	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ЭКГ для определения безопасности ^и	X	X	X	X	X						
Тест на беременность ^г	X	X					X	X	X	X	X
Скрининг вирусной серологии ^г	X										
Тесты функции печени ^к	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Биохимический анализ сыворотки ^к	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ФИГ. 15А

Часть А											
		Стационар ^а			Амбулаторно						
Стадия испытания	Скрининг	Сутки дозир.	Период наблюдения после введения дозы								
Неделя посещения в испытании					W1	W2	W4	W8	W12	W18	W24/ET ^б
Сутки посещения в испытании ± окно для посещения	D от -28 до -1	D1 ^с	D2	D4±1	D8±1	D15±2	D29±2	D57±7	D85±7	D127±7	D169±7
Гематология ^к	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Параметры свертывания ^к	X	X			X		X	X	X		X
Анализ мочи ^к	X										
Анализ мочи на вызыв. пристрастие наркотики	X	X									
Рандомизация		X									
Введение исслед. лек. сред. ^м		X									
Образцы крови для анализа РК ^н		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Образцы крови для анализа иммуногенности ^о		X				X	X	X	X	X	X
Локальная переносимость ^р		X	X	X	X						
Изучение/регистрация АЕ ^а	X										
Сопутствующие лек. сред.	X										

АЕ = неблагоприятное явление; ЭКГ = электрокардиограмма; ET = Окончание лечения; РК = фармакокинетика; SAD = однократная возрастающая доза

Примечание: Когда они запланированы в один и тот же момент времени, оценка основных показателей жизнедеятельности и ЭКГ в 12 отведениях должны проводиться до взятия образца крови

^а Индивидуумы могут поступать в клинический исследовательский центр на сутки -1 или сутки 1 и выписаны после оценки на сутки 2

^б Если индивидум преждевременно прекращает участие в испытании до посещения на 24 неделе, должна быть проведена оценка недели 24/ET

^с Оценка, проведенная до введения дозы, если не указано иное

^д Полный медицинский анализ будет собран при скрининге и любые изменения должны внесены перед дозированием

^е Оценка указанных критериев включения и исключения

^ф Полное физикальное обследование включает внешний вид в общем, голову, шею, грудную клетку/дыхательную систему, сердце/сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечную систему/печень, конечности, кожу и скрининговую неврологическую оценку

ФИГ. 15В

^g Основные показатели жизнедеятельности (кровяное давление, пульс, частота дыхания и температура) должны измеряться в пределах 2 часов до введения дозы и через 2 часа (+/- 1 час) после введения дозы (только п/к введение) или 2 часа (+/- 1 час) после окончания инфузии (только в/в введение). Во все другие дни посещений основные показатели жизнедеятельности необходимо регистрировать только один раз в ходе посещения

^h ЭКГ во всех случаях должна быть зарегистрирована в положении лежа на спине после того, как индивидиум комфортно пребывал в покое в течение приблизительно 10 минут. На 1 сутки регистрируют ЭКГ для определения безопасности с 12 отведениями до введения дозы (в пределах 30 минут до введения дозы) и через 2 часа (+/- 1 час) после введения дозы (только п/к введение) или 2 часа (+/- 1 час) после окончания инфузии (только в/в введение). Кроме того, ЭКГ на 4 сутки и 8 сутки должны быть получены для индивидиумов, которым вводили исследуемое лекарственное средство посредством п/к введения.

ⁱ Для WOCBP должны быть проведены тесты на беременность. Тест крови на беременность проводится при скрининге и после этого проводится тест на беременность. Тест на беременность, запланированный на 1 сутки, может быть проведен на сутки -1 согласно местной практике. Отрицательный тест на беременность должен быть подтвержден перед введением исследуемого лекарственного средства.

^j Параметры вирусной серологии описаны в примере 9

^k Клинические лабораторные параметры и параметры анализа мочи являются такими, как описано в примере 9

^l Вызывающие пристрастие наркотики, включенные в скрининг, описаны в примере 9. Сбор мочи для анализа на вызывающие пристрастие наркотики, запланированный на 1 сутки, может быть проведен на сутки -1 согласно местной практике. Результаты теста на вызывающие пристрастие наркотики должны быть изучены перед дозированием. Локальная оценка результатов теста на вызывающие пристрастие наркотики подтверждается центральным тестированием.

^m Исследуемое лекарственное средство вводят посредством в/в инфузии или п/к инъекции, как описано в примере 9

ⁿ На 1 сутки для индивидиумов, которым вводят лекарственное средство посредством п/к инъекции, проводится взятие образцов крови для анализа РК до введения дозы, в конце инфузии и через 1, 4 и 8 часов после окончания инфузии.

^o Включает образцы для определения ADA и нейтрализующих антител (NAb), если применимо. Дополнительные незапланированные образцы для анализа иммуногенности могут быть получены, если подозревается иммунологическое явление. Взятие образцов для определения иммуногенности после запланированного периода наблюдения может быть осуществлено на основе появляющихся результатов

^p Локальная переносимость должна оцениваться только для индивидиумов, которым вводят исследуемое лекарственное средство посредством п/к инъекции. На 1 сутки локальная переносимость должна оцениваться приблизительно через 1 час после введения дозы. В зависимости от мнения исследователя, незапланированные посещения допустимы при необходимости для наблюдения за какими-либо не разрешившимися симптомами, связанными с переносимостью

^q Все АЕ, связанные с активными действиями при скрининге, должны получены в момент подписания согласия; любые другие события, происходящие в ходе периода скрининга, должны быть описаны как медицинский анамнез. Все SEA должны быть получены с момента подписания согласия и далее.

ФИГ. 15C

Часть В/С														
		Стационар ^а			Амбулаторно									
Стадия испытания	Скрининг	Сутки дозир.	Период наблюдения после введения дозы							Пролонгированный период наблюдения после ^б				
Неделя посещения в испытании					W1		W2	W4	W8/ET ^с	W12	W16	W24	W32	W40 / EF ^д
Сутки посещения в испытании ± окно для посещения	D от -28 до -1	D1 ^е	D2	D4+1	D8±1	D11±1	D15±2	D29±2	D57±7	D85 ±7	D113 ±7	D169 ±7	D225 ±7	D281 ±7
Информированное согласие	X													
Демография	X													
Медицинский анамнез, включая генотип HBV ^г	X													
Критерии включения/исключения	X	X ^а												
Полное физикальное обследование ^и	X			X					X					
Направленное на симптомы физикальное обследование		X	X		X		X	X						
Масса тела	X													
Рост	X													
Основные показатели жизнедеятельности ^и	X	X	X	X	X		X	X	X					
ЭКГ для определения безопасности ^и	X													
Тест на беременность ^к	X	X						X	X	X	X	X	X	X
FibroScan ^л	X													
Скрининг вирусной серологии ^м	X													

28/45

ФИГ. 16А

Часть В/С														
		Стационар ^а			Амбулаторно									
Стадия испытания	Скрининг	Сутки дозир.	Период наблюдения после введения дозы							Пролонгированный период наблюдения после ^б				
Неделя посещения в испытании					W1		W2	W4	W8/ET ^с	W12	W16	W24	W32	W40 / EF ^д
Сутки посещения в испытании ± окно для посещения	D от -28 до -1	D1 ^е	D2	D4+1	D8±1	D11±1	D15±2	D29±2	D57±7	D85 ±7	D113 ±7	D169 ±7	D225 ±7	D281 ±7
Тесты функции печени ^п	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Биохимический анализ сыворотки ^п	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Гематология ^п	X	X	X	X	X		X	X	X					
Параметры свертывания ^п	X	X	X	X	X		X	X	X					
Тестирование комплемента ^{п,о}		X			X		X							
Анализ мочи ^{п,о}	X	X			X		X							
Анализ мочи на вызыв. пристр. наркотики ^п	X													
Введ. исслед. лек. средства ^п		X												
Образцы крови для анализа РК ^г		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Образец крови для анализа иммуногенности ^г		X					X	X	X	X	X	X	X	X
Образец крови для количественного определения HBsAg	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Образец крови для опред. антител против HBs	X				X		X	X	X	X	X	X	X	X
Образец крови для качественного определения HBeAg	X								X ^г					X ^г
Образец крови для количественного определения HBeAg ^г		X						X	X					X

ФИГ. 16В

Часть В/С														
		Стационар ^а			Амбулаторно									
Стадия испытания	Скрининг	Сутки дозир.	Период наблюдения после введения дозы							Пролонгированный период наблюдения после ^б				
Неделя посещения в испытании					W1		W2	W4	W8/ET ^с	W12	W16	W24	W32	W40 EF ^д
Сутки посещения в испытании ± окно для посещения	D от -28 до -1	D1 ^е	D2	D4+1	D8±1	D11±1	D15±2	D29±2	D57±7	D85 ±7	D113 ±7	D169 ±7	D225 ±7	D281 ±7
Обр. крови для опред. антител против HBe		X							X					X
Образец крови для количественного определения РНК HBV и количественного определения HBcrAg		X						X	X	X		X	X	X
Образец крови для количественного определения РНК HBV ^и	X	X			X		X	X	X	X		X		X
Образец крови для анализа иммунного ответа ^в		X			X		X	X	X	X		X		X
Взятие образца тонкоигольного аспирата печени ^ж		X					X	X	X					
Образец крови в пробирку RNA Raxgene tube ^х		X			X		X	X	X	X		X		X
Наблюдение за резистентностью к HBV ^{и,у}		X			X		X	X	X	X	X	X	X	X
Образец крови для генотипирования Fc-рецептора и для аллотипирования иммуноглобулинов		X												
Локальная переносимость ^z		X	X	X	X									
Изучение/регистрация АЕ ^{за}	X									X				
Сопутствующие лекар. средства	X													

ФИГ. 16С

Часть В/С														
		Стационар ^а			Амбулаторно									
Стадия испытания	Скрининг	Сутки дозир.	Период наблюдения после введения дозы							Пролонгированный период наблюдения после ^б				
Неделя посещения в испытании					W1		W2	W4	W8/ET ^с	W12	W16	W24	W32	W40 / EF ^д
Сутки посещения в испытании ± окно для посещения	D от -28 до -1	D1 ^е	D2	D4+1	D8±1	D11±1	D15±2	D29±2	D57±7	D85 ±7	D113 ±7	D169 ±7	D225 ±7	D281 ±7
Соблюдение режима лечения NRTI ^{bb}	X													

AE = неблагоприятное явление; ЭКГ = электрокардиограмма; EF = end of follow-up; ET = Окончание лечения; HBcrAg = Родственный коровому антиген гепатита В; HBeAg = e-антиген гепатита В; HBsAg = поверхностный антиген гепатита В; HBV = вирус гепатита В; NRTI = - нуклеозидный/нуклеотидный ингибитор обратной транскриптазы; PK = фармакокинетика; SAD = однократная возрастающая доза
Примечание: Когда они запланированы в один и тот же момент времени, оценка основных показателей жизнедеятельности и ЭКГ в 12 отведениях должны проводиться до взятия образца крови

^а Индивидуумы могут поступать в клинический исследовательский центр на сутки -1 или сутки 1 и выписаны после оценки на сутки 2

^б После 8 недель индивидуумы со снижением >2 раз на 8 неделе должны наблюдаться вплоть до 40 недель или до тех пор, пока снижение HBsAg не станет <2-кратным относительно исходного уровня при 2 последовательных сборах, в зависимости от того, что произойдет первым. Пролонгированное наблюдение может быть прекращено в зависимости от мнения спонсора на основе появляющихся данных

^с Если индивидуум преждевременно прекращает участие в испытании до посещения на 8 неделе, должна быть проведена оценка недели 8/ET

^д Если индивидуум преждевременно прекращает участие в испытании после посещения на 8 неделе и до посещения на 40 неделе, должна быть проведена оценка недели 40/EF

^е Оценка, проведенная до введения дозы, если не указано иное

^ф Полный медицинский анализ будет собран при скрининге, включая генотип HBV, если он доступен. Любые изменения должны внесены перед дозированием

^g Оценка указанных критериев включения и исключения. См. пример 9 для дополнительной информации

^h См. пример 9 для оценки, проводимой в ходе полного физического обследования

ⁱ Основные показатели жизнедеятельности (кровяное давление, пульс, частота дыхания и температура) должны измеряться после того, как индивидуум пребывал комфортно в покое в течение приблизительно 10 минут. На 1 сутки основные показатели жизнедеятельности должны быть измерены в пределах 2 часов до введения дозы и через 2 часа (+/- 1 час) после введения дозы. Во все другие дни посещений основные показатели жизнедеятельности необходимо регистрировать только один раз в ходе посещения

^j ЭКГ должна быть зарегистрирована в положении лежа на спине после того, как индивидуум комфортно пребывал в покое в течение приблизительно 10 минут.

^к Для WOCBP должны быть проведены тесты на беременность. Тест крови на беременность проводится при скрининге и после этого проводится тест на беременность. Отрицательный тест на беременность должен быть подтвержден перед введением исследуемого лекарственного средства.

^l Не должен проводиться, если индивидууму проводили исследование с использованием FibroScan в пределах 6 месяцев перед скринингом или биопсии печени в пределах года до скрининга, которые подтвердили отсутствие фиброза F3 или F4 Metavir

^m Параметры См. пример 9 для параметров вирусной серологии

- ⁿ Клинические лабораторные параметры и параметры анализа мочи являются такими, как описано в примере 9. Для индивидуумов и дней, когда проводят взятие образцов тонкоигольного аспирата печени, лабораторную оценку безопасности (тесты функции печени, биохимический анализ сыворотки, гематология и параметры свертывания) должны быть получены перед получением образца тонкоигольного аспирата печени
- ^o Дополнительные образцы могут быть получены в любой момент времени после дозирования, если предполагается иммунокомплексное заболевание
- ^p Вызывающие пристрастие наркотики, включенные в скрининг, описаны в примере 9
- ^q Исследуемое лекарственное средство вводят посредством п/к инъекции, как описано в примере 9
- ^r На 1 сутки для индивидуумов, которым вводят лекарственное средство посредством п/к инъекции, проводится взятие образцов крови для анализа РК до введения дозы и через 1, 4 и 8 часов после окончания дозирования. Включает образцы для анализа РК свободного вещества и тотального анализа РК
- ^s Включает образцы для определения ADA и нейтрализующих антител (NAb), если применимо. Дополнительные незапланированные образцы для анализа иммуногенности могут быть получены, если подозревается иммунологическое явление. Взятие образцов для определения иммуногенности после запланированного периода наблюдения может быть осуществлено на основе появляющихся результатов. Дополнительные детали могут быть найдены в примере 9
- ^t Должны быть получены только для индивидуумов части C, которые имели положительный результат качественного теста на HBeAg при скрининге
- ^u Если у индивидуума произошло обострение в соответствии с ALT (как определяют по увеличению >2 раза уровня ALT относительно уровня ALT на сутки 1 до введения дозы), может быть получен дополнительный образец(ы) для количественного определения ДНК HBV и наблюдения резистентности HBV
- ^v См. лабораторный справочник для инструкций по обработке и распределению на аликвоты образца для хранения и потенциального иммунного поискового анализа. Образцы крови должны быть собраны, только когда и где доступны в отдельных центрах в качестве необязательного подисследования. Поскольку эта оценка является только исследовательской, сбор и конкретный используемый анализ могут быть изменены или удалены в зависимости от мнения спонсора на основе появляющихся данных. Дальнейшие детали могут быть найдены в примере 9.
- ^w См. лабораторный справочник для инструкций по сбору и обработке образцов тонкоигольного аспирата печени. Образцы крови должны быть собраны, только когда и где доступны в отдельных центрах в качестве необязательного подисследования. Поскольку эта оценка является только исследовательской, сбор и конкретный используемый анализ могут быть изменены или удалены в зависимости от мнения спонсора на основе появляющихся данных. Дальнейшие детали могут быть найдены в примере 9.
- ^x Поскольку эта оценка является только исследовательской, сбор и конкретный используемый анализ могут быть изменены или удалены в зависимости от мнения спонсора на основе появляющихся данных. Дальнейшие детали могут быть найдены в примере 9.
- ^y См. пример 9 для более подробной информации
- ^z На 1 сутки локальная переносимость должна оцениваться приблизительно через 1 час после введения дозы. В зависимости от мнения исследователя, незапланированные посещения допустимы при необходимости для наблюдения за какими-либо не разрешившимися симптомами, связанными с переносимостью
- ^{aa} Все AE, связанные с активными действиями при скрининге, должны быть получены в момент подписания согласия; любые другие события, происходящие в ходе периода скрининга, должны быть описаны как медицинский анамнез. Все SEA должны быть получены с момента подписания согласия и далее. Все AE получают до посещения на неделе 8/ET. После недели 8 только целевые AE и SAE должны быть определяться до конца испытания. Дополнительные детали могут быть найдены в примере 9.
- ^{bb} NRTI будет продолжать применяться до конца наблюдения каждого индивидуума

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ВРЕМЕННЫЕ ТОЧКИ ЧАСТИ А (П/К ИНЪЕКЦИЯ)

Сутки испытания ± окно в сутках (неделя испытания)	Время по протоколу	РК в крови (сыворотке)
Сутки 1	До введения дозы	X
	Дозирование	
	1 час	X
	4 часа	X
	8 часов	X
Сутки 2	24 часа	X
Сутки 4 ± 1		X
Сутки 8 ± 1 (Неделя 1)		X
Сутки 15 ± 2 (Неделя 2)		X
Сутки 29 ± 2 (Неделя 4)		X
Сутки 57 ± 7 (Неделя 8)		X
Сутки 85 ± 7 (Неделя 12)		X
Сутки 127 ± 7 (Неделя 18)		X
Сутки 169 ± 7 (Неделя 24)		X

ФИГ. 17А

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ВРЕМЕННЫЕ ТОЧКИ ЧАСТИ А (В/В ИНФУЗИЯ)

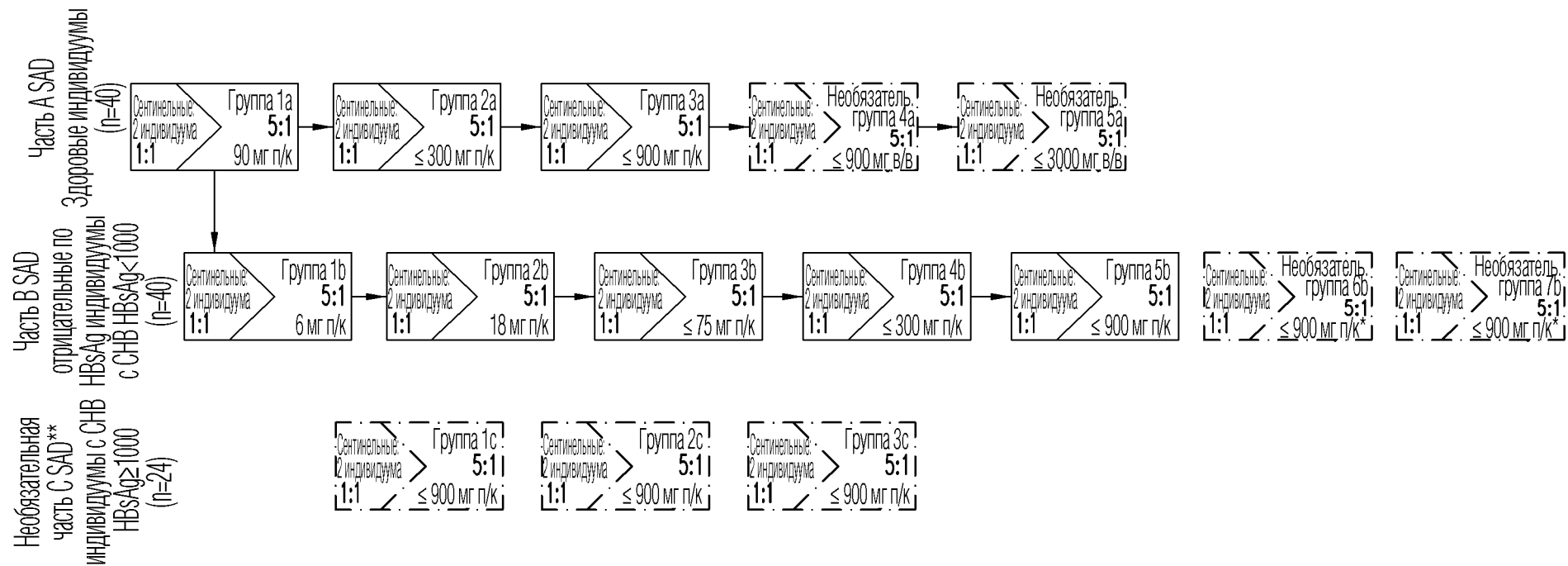
Сутки испытания ± окно в сутках (неделя испытания)	Время по протоколу	РК в крови (сыворотке)
Сутки 1	До введения дозы	X
	Дозирование	
	Окончание инфузии	X
	1 час после окончания инфузии	X
	4 часа после окончания инфузии	X
	8 часов после окончания инфузии	X
Сутки 2	24 часа после окончания инфузии	X
Сутки 4 ± 1		X
Сутки 8 ± 1 (Неделя 1)		X
Сутки 15 ± 2 (Неделя 2)		X
Сутки 29 ± 2 (Неделя 4)		X
Сутки 57 ± 7 (Неделя 8)		X
Сутки 85 ± 7 (Неделя 12)		X
Сутки 127 ± 7 (Неделя 18)		X
Сутки 169 ± 7 (Неделя 24)		X

ФИГ. 17В

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ВРЕМЕННЫЕ ТОЧКИ ЧАСТИ В/С

Сутки испытания ± окно в сутках (неделя испытания)	Время по протоколу	РК в крови (сыворотке)
Сутки 1	До введения дозы	х
	Дозирование	
	1 час	х
	4 часа	х
	8 часов	х
Сутки 2	24 часа	х
Сутки 4 ± 1		х
Сутки 8 ± 1 (Неделя 1)		х
Сутки 11 ± 1		х
Сутки 15 ± 2 (Неделя 2)		х
Сутки 29 ± 2 (Неделя 4)		х
Сутки 57 ± 7 (Неделя 8)		х
Сутки 85 ± 7 (Неделя 12)		х
Сутки 113 ± 7 (Неделя 16)		х
Сутки 169 ± 7 (Неделя 24)		х
Сутки 225 ± 7 (Неделя 32)		х
Сутки 281 ± 7 (Неделя 40)		х

ФИГ. 17С

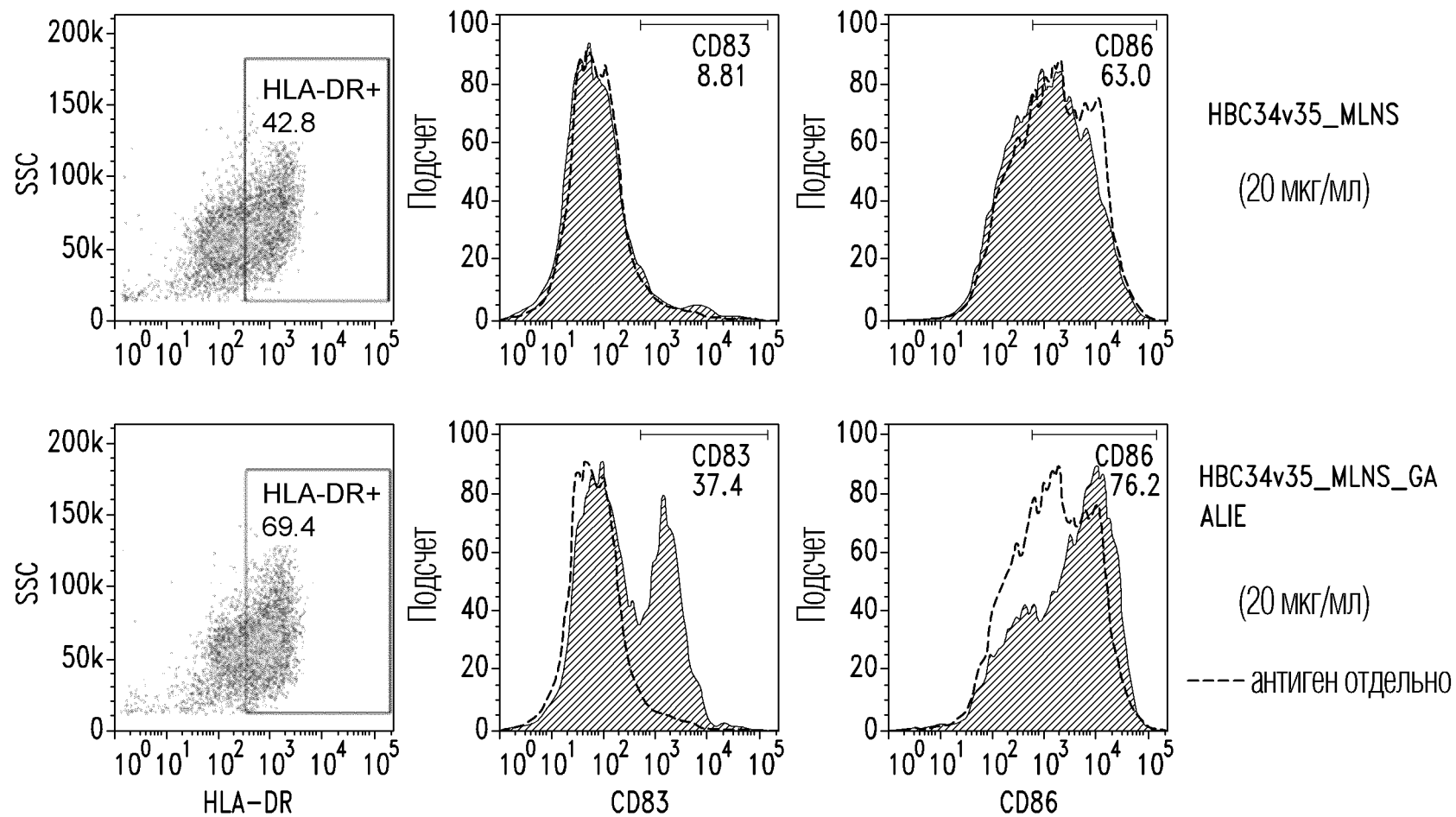


ФИГ. 18

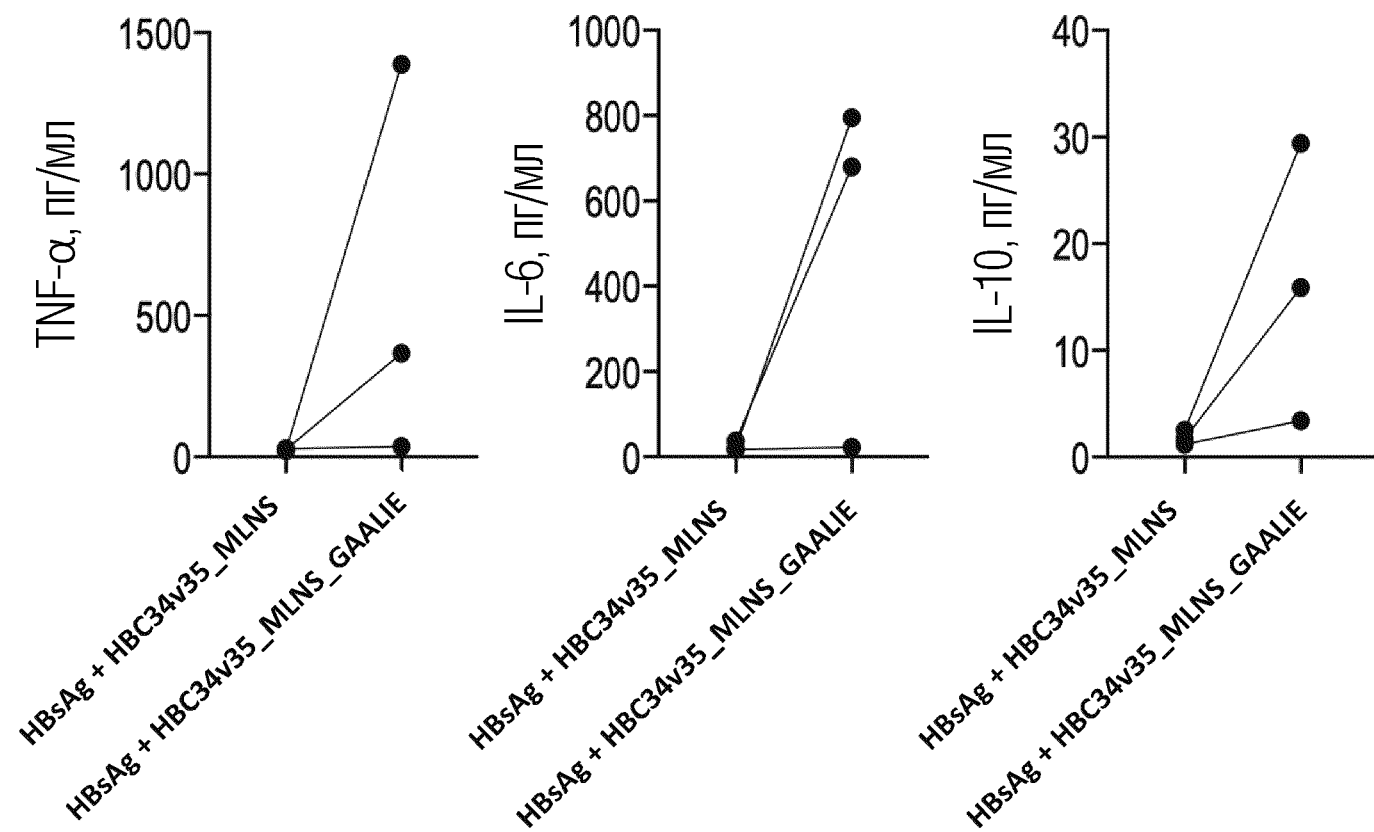
Гематология	
Аланинаминотрансфераза (ALT)	Билирубин (общий и прямой)
Параметры свертывания	
Время международного коэф. нормализации (INR)	Протромбин
Анализ мочи	
Билирубин	Белки
Глюкоза	Эритроциты (RBC)
Кетоны	Скрининг на вызывающие зависимость наркотики
Лейкоциты	Удельная плотность
Микроскопия (если клинически показана)	Уробилиноген
Нитриты	Визуальное исследование внешнего вида и цвета
рН	
Тестирование на беременность	
Хорионический бета-гонадотропин человека (только WOCBP)	Тест мочи на беременность
Скрининг вирусной серологии	
Гепатит В, С ^b и дельта	Вирус иммунодефицита человека I и II

^a Требуется только если уровень ALT и/или AST повышен >2х относительно исходной величины до введения дозы на 1 сутки

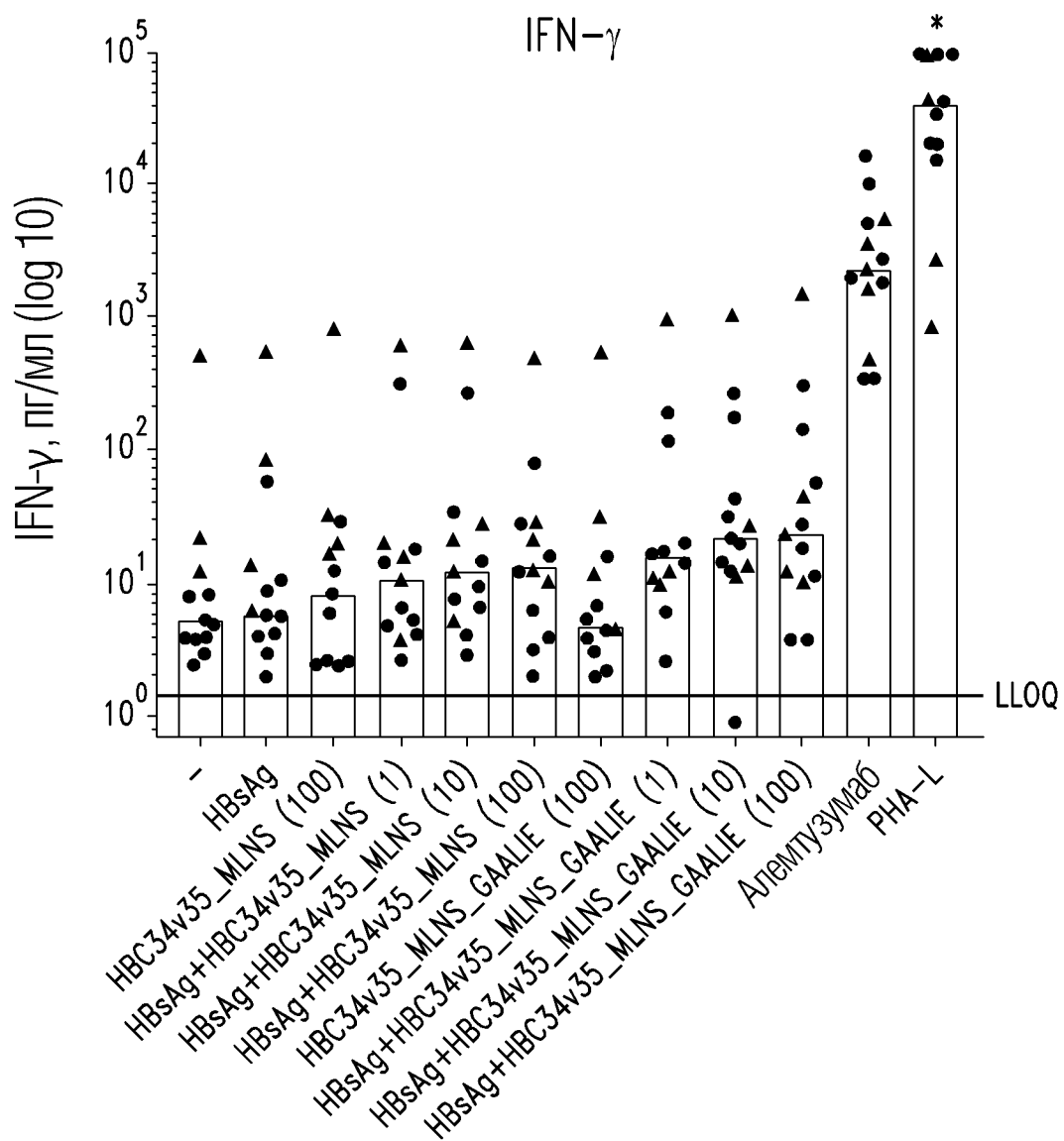
^b Индивидуумам в части В/С с положительной серологией HCV при скрининге может быть проведена ОТ-ПЦР для HCV для определения пригодности для включения в испытание



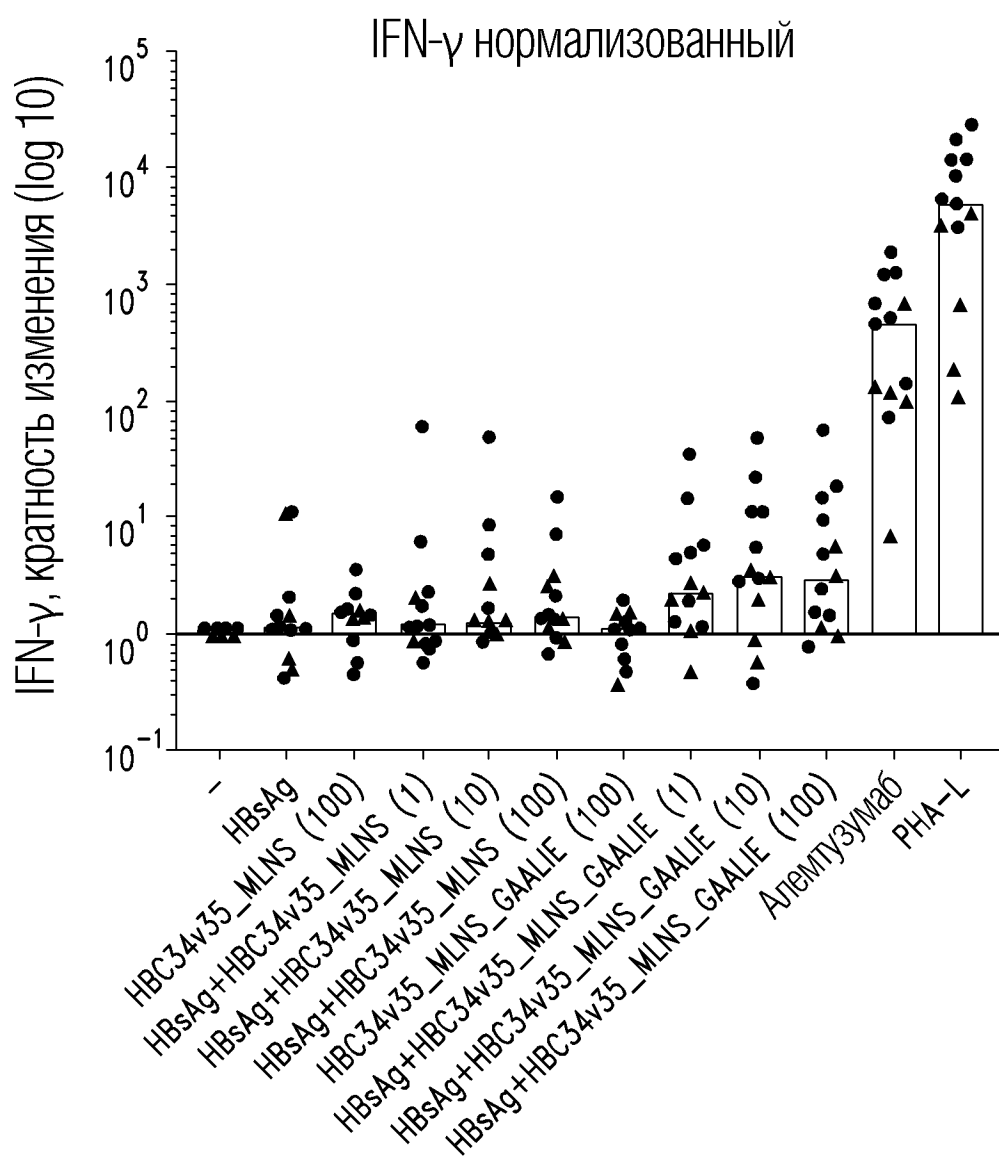
ФИГ. 20



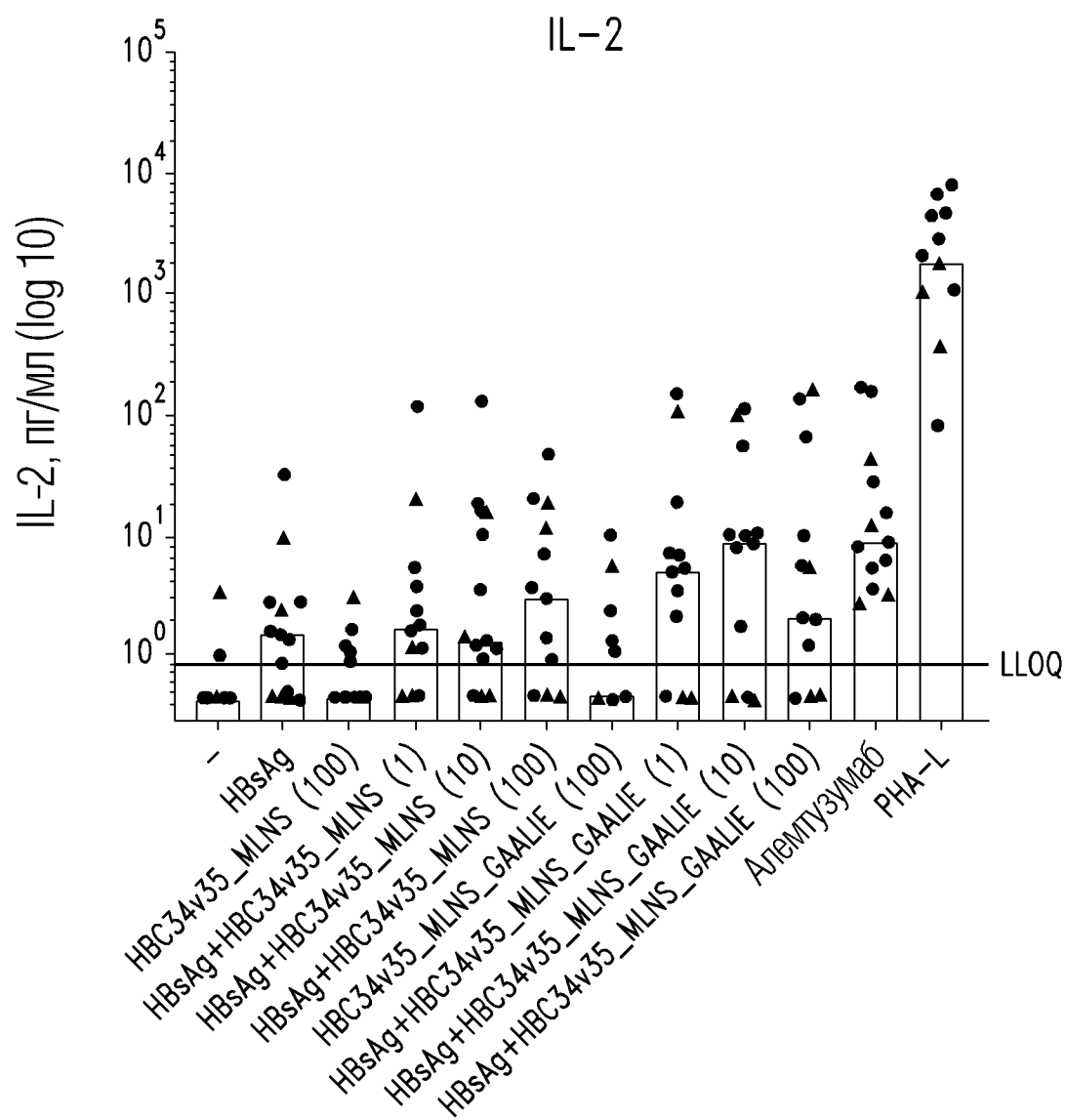
ФИГ. 21



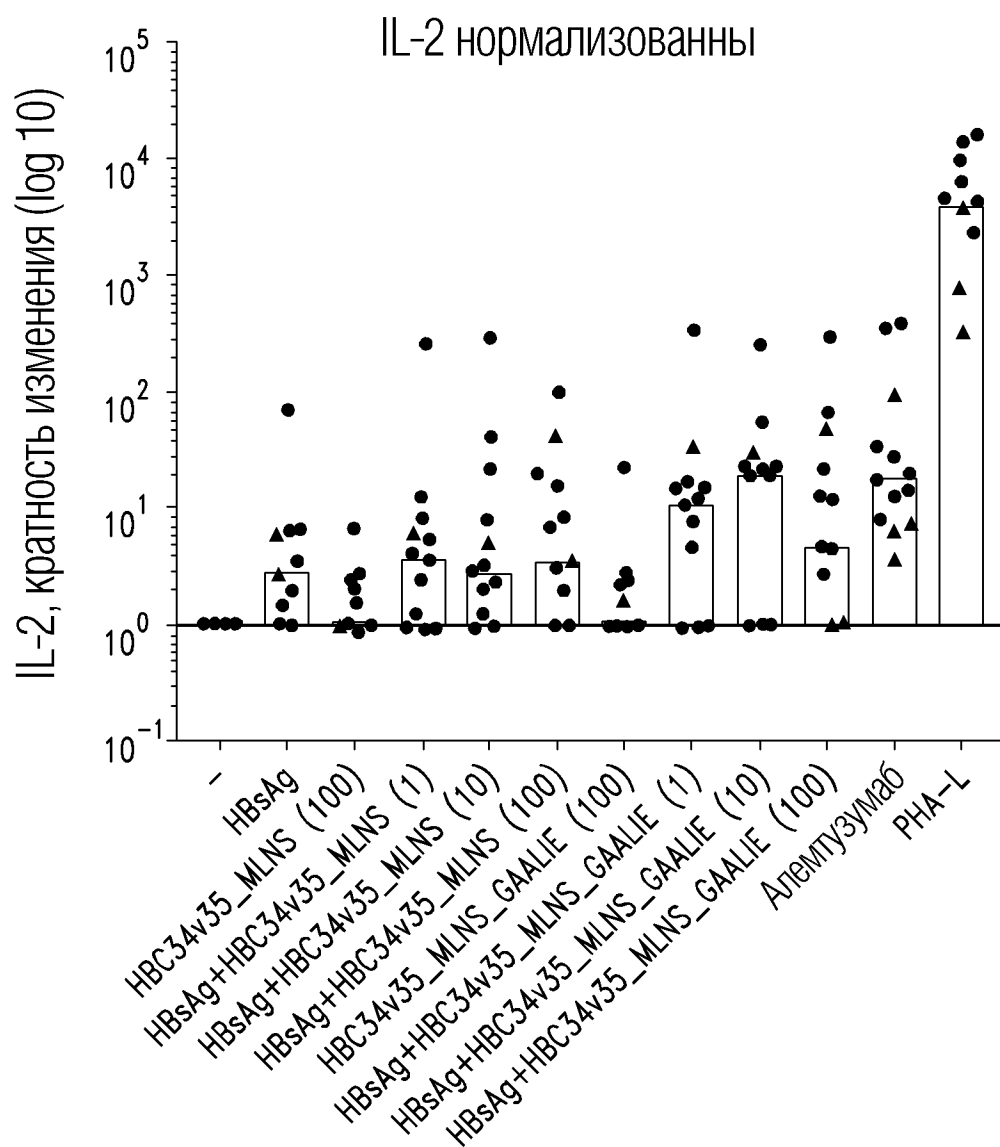
ФИГ. 22А



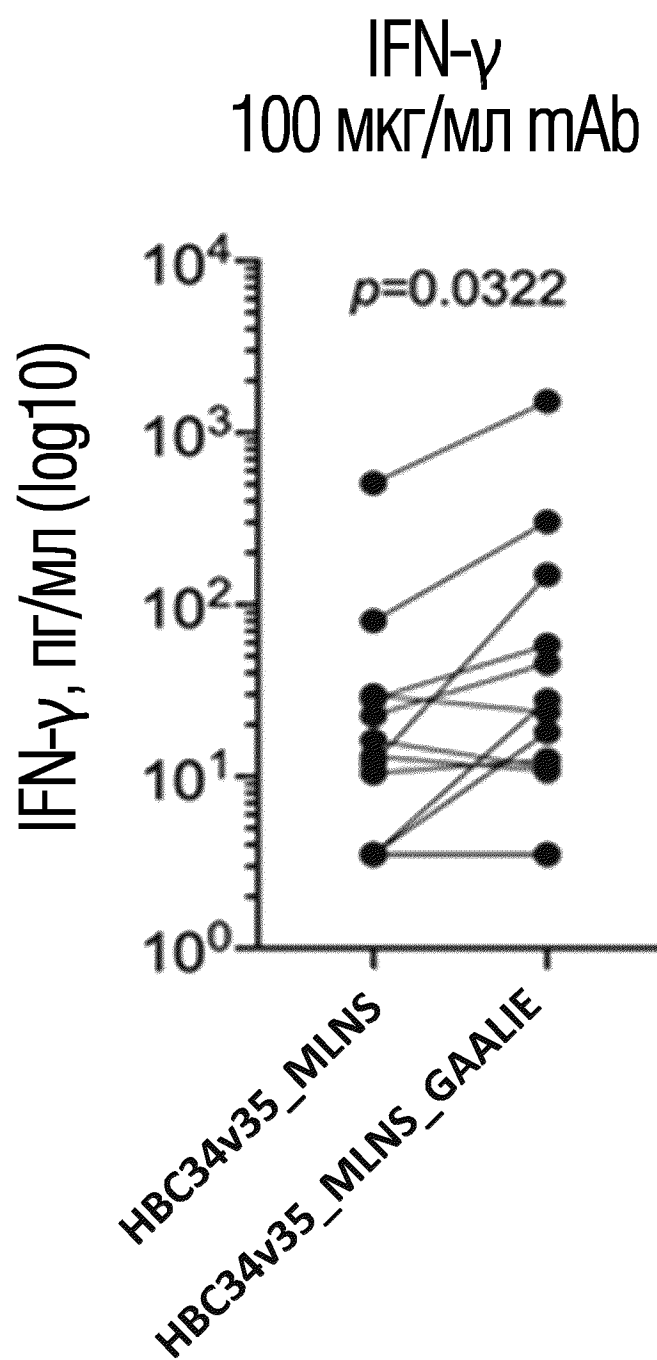
ФИГ. 22В



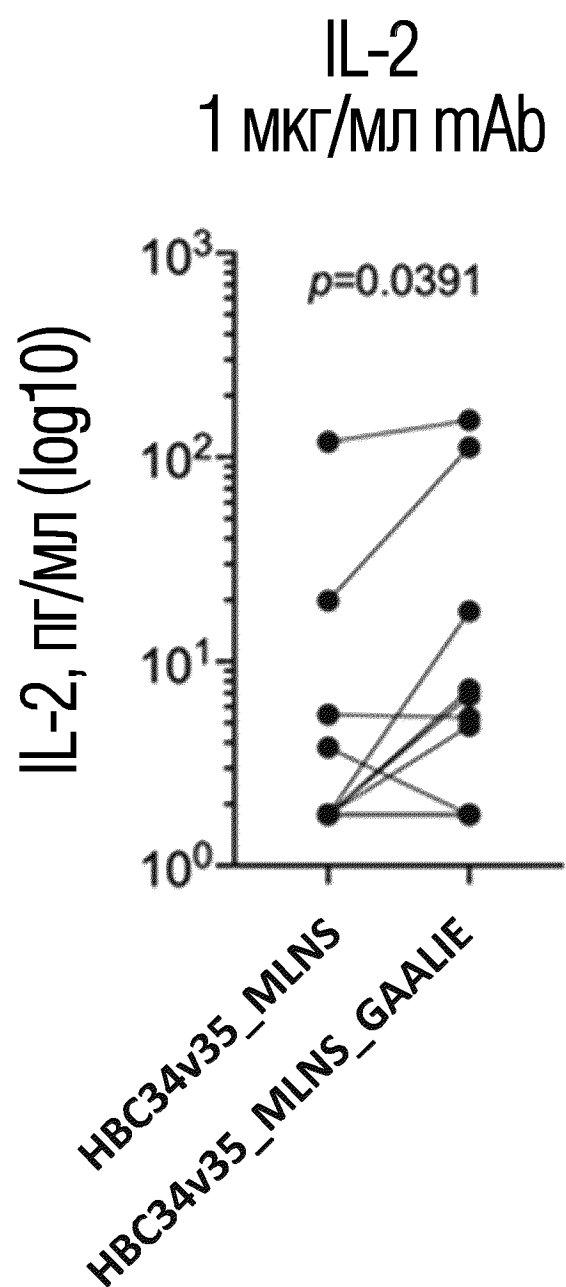
ФИГ. 23А



ФИГ. 23В



ФИГ. 24А



ФИГ. 24В