(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390063 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.25

(22) Дата подачи заявки
2021.06.23

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

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ГЕПАТИТА В И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **63/043,692**
(32) **2020.06.24**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/038667**
(87) **WO 2021/262840 2021.12.30**

(71) Заявитель:
ВИР БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК. (US); ХЬЮМАБС БАЙОМЕД СА (CH)

(72) Изобретатель:
Розен Лора, Чудноховски Надин, Лемпп Флориан А., Снелл Дьёрдь (US), Корти Давиде, Камерони Элизабетта (CH)

(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В., Галухина Д.В. (RU)

(57) Изобретение частично относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые могут связываться с антигенной петлевой областью поверхностного антигена гепатита B (HBsAg) и, необязательно, могут нейтрализовать инфекционный вирус гепатита B (HBV), а также, необязательно, вирус гепатита дельта (HDV). Раскрытые в настоящем документе антитела и антигенсвязывающие фрагменты обладают преимущественными характеристиками продукции, такими как снижение образования агрегатов и/или улучшение титра продукции в трансформированных клетках-хозяевах по сравнению с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом. Настоящее изобретение также относится к слитым белкам, которые содержат антигенсвязывающий фрагмент, и к нуклеиновым кислотам, которые кодируют, и клеткам, которые продуцируют такие антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению антител, антигенсвязывающих фрагментов, слитых белков и связанных полинуклеотидов, векторов, клеток-хозяев и композиций по настоящему изобретению в диагностике, профилактике и лечении гепатита B и гепатита D. Также предложены комбинированные терапии, содержащие (i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент и (ii) агент, который является ингибитором экспрессии гена HBV и/или который снижает антигенную нагрузку HBV.

название mAb	титр 5 мл трансфекции (мг/мл)	титр 100 мл трансфекции (мг/мл)	средний титр в 100 мл масштабе (мг/л)
HBC34-v35-rIgG1 (G1m17,1)	89.4	149.0, 172.3, 212.0 (N=3)	177.8
HBC34-v40-rIgG1 (G1m17,1)	237.261	535.5, 583.0, 669.4 (N=3)	596.0
HBC34-v44-rIgG1 (G1m17,1)	157.8	588.2, 563.0 (N=2)	575.6
HBC34-v45-rIgG1 (G1m17,1)	140.9	269.2, 256.0 (N=2)	262.6
HBC34-v50rIgG1 (G1m17,1)	163.7	363.8, 371.0 (N=2)	367.4

202390063 A1

202390063 A1

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ГЕПАТИТА В И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в настоящее описание посредством ссылки. Имя текстового файла, содержащего Перечень последовательностей: 930485.414WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл размером 101 КБ был создан 22 июня 2021 года и отправляется в электронном виде через EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирус гепатита B вызывает потенциально опасные для жизни острые и хронические инфекции печени. Острый гепатит B характеризуется виремией, с симптомами или без них, с риском возникновения молниеносного гепатита (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Авг 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Онлайн публикация до выхода печатной версии]. Несмотря на то, что эффективная вакцина против гепатита B доступна с 1982 года, ВОЗ сообщает, что 240 миллионов человек хронически инфицированы гепатитом B и более 780000 человек умирают каждый год из-за осложнений гепатита B. Примерно у трети пациентов с хроническим гепатитом B (CHB) развивается цирроз печени, печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома, что составляет 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 and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Авг 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Онлайн публикация до выхода печатной версии].

У пациентов, инфицированных HBV, могут развиться тяжелые осложнения в результате коинфекции или суперинфекции HDV. По данным ВОЗ, гепатит D поражает около 15 миллионов человек во всем мире. HDV считается субвирусным спутником, потому что он может распространяться только в присутствии HBV. HDV является одним из самых маленьких известных вирусов животных (40 нм), при этом его геном составляет всего 1,6 кб и кодирует S и L HDAg. Все другие белки, необходимые для репликации генома HDV, включая РНК-полимеразу, обеспечиваются клеткой-хозяином, а оболочка HDV обеспечивается HBV. При введении в чувствительные клетки геном РНК HDV реплицируется и связывается с несколькими копиями белков, кодируемых HDV, для сборки комплекса рибонуклеопротеина (RNP). RNP экспортируется из клетки белками

оболочки HBV, которые способны собирать липопротеиновые везикулы, которые попадают в просвет отсека до Гольджи, прежде чем секретируются. Кроме того, белки оболочки HBV также обеспечивают механизм нацеливания HDV на неинфицированную клетку, тем самым обеспечивая распространение HDV.

Осложнения, вызванные HDV, включают большую вероятность возникновения печеночной недостаточности при острых инфекциях и быстрое прогрессирование до цирроза печени с повышенной вероятностью развития рака печени при хронических инфекциях. В сочетании с вирусом гепатита B, гепатит D имеет самый высокий уровень смертности от всех инфекций гепатита, на 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 для хронической инфекции HDV является интерферон-альфа. Однако лечение HDV интерфероном-альфа относительно неэффективно и плохо переносится. Лечение интерфероном-альфа приводит к устойчивому вирусологическому ответу через шесть месяцев после лечения у одной четверти пациентов. Кроме того, нуклеотидные (нуклеозидные) аналоги (NA) были широко протестированы на гепатите дельта, но они, по-видимому, неэффективны. Комбинированное лечение с использованием 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).

Соответственно, необходимы новые терапевтические варианты, такие как новые методы лечения с нейтрализующей активностью против инфекции гепатита B и/или D.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигуры, представленные в настоящем документе, предназначены для более подробного иллюстрирования предмета изобретения, включенного в настоящее изобретение. Фигуры никоим образом не предназначены для ограничения раскрытия.

Фигура 1 иллюстрирует связывание с HBsAg (слева) и нейтрализацию инфекции HBV (справа) антителом к HBV "HBC34-v35-GAALIE-MLNS" (rIgG1m17, 1), содержащим VH согласно SEQ ID NO: 38 и VL согласно SEQ ID NO: 57, и в Fc мутации G236A, A330L, I332E, M428L и N434S. Связывание при различных концентрациях антитела с HBsAg десяти ((A)-(J)) генотипов показано слева. Нейтрализацию измеряли по концентрации HBsAg (МЕ/мл) и индексу HBeAg, как указано. HBC34-v35-GAALIE-MLNS связывается с консервативным конформационным эпитопом HBsAg с пикомолярной аффинностью и эффективно нейтрализует 10 генотипов HBV.

На Фигуре 2 представлены данные эксклюзионной хроматографии (ЭХ), демонстрирующие высокомолекулярные виды, присутствующие в очищенном HBC34-v35-GAALIE-MLNS и HBC34-v35-MLNS (который отличается от HBC34-v35-GAALIE-MLNS отсутствием мутаций G236A, A330L и I332E Fc) IgG после одной недели инкубации RT (приблизительно 75 мг/мл). Максимальный пик показан на вставке в правом верхнем углу графика.

Фигура 3 иллюстрирует данные эксклюзионной хроматографии (ЭХ), демонстрирующие виды с высокой молекулярной массой в очищенном Fab HBC34-v35 с течением времени. Максимальный пик показан на вставке в правом верхнем углу графика.

Фигура 4 иллюстрирует связывание HBC34-v35 IgG (верхний ряд панелей) и мономеров Fab (нижний ряд панелей) (центральные панели) и обогащенных димеров (правые панели) с HBsAg, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Слева приведены схематические иллюстрации, демонстрирующие связывание IgG и Fab с HBsAg. Используемые концентрации HBsAg были такими, как указано в легенде.

На фиг. 5A и 5B показаны (A) данные препаративной SEC, иллюстрирующие выделенный рекомбинантный димер Fab HBC34-v35 (левый пик) и (B) кристаллизацию димера Fab.

На фиг. 6A и 6B показаны (A) данные препаративной SEC выделенного рекомбинантного мономера Fab HBC34-v35 и (B) кристаллизации мономера Fab.

На фиг. 7 представлена (слева) схематическая иллюстрация образования димеров с использованием CDR антител и (справа) моделей лент, демонстрирующих димер Fab HBC34-v35.

Фигура 8 иллюстрирует (справа) взаимодействия VL-VL, участвующие в образовании димеров в HBC34-v35, и (слева) суммирует взаимодействия в L-CDR2.

На Фигуре 9 представлена еще одна иллюстрация взаимодействий Fab-Fab HBC34-v35 в каркасных областях L-CDR2 и легкой цепи.

На фиг. 10 представлены иллюстрации (слева) Fab HBC34-v35 в виде димера и (справа) конформации мономера Fab.

На Фиг. 11A-11C показана восстановленная димеризация вариантом Fab, сконструированным из HBC34-v35 (вариант показан на фиг. 11A как "L-CDR2 GL Fab" и также упоминается в настоящем документе как HBC34-v36), в котором три остатка L-CDR2 были обратно мутированы в последовательность зародышевой линии по сравнению с HBC34-v35 Fab. (A) Процент димера в очищенных Fab путем абсолютной эксклюзионной хроматографии (aSEC) на 0 и 5-7 день. (B) Анализ SEC стрессированного

образца L-CDR2 GL Fab через 0 дней. (C) Анализ SEC стрессированного образца L-CDR2 GL Fab через 5 дней.

На фигуре 12 показано связывание HBC34-v35 и HBC34-v36 с HBsAg, определенное с помощью ELISA. Антитела экспрессировали в виде IgG1 с Fc дикого типа (аллотип G1m17, 1).

Фигура 13 иллюстрирует нейтрализацию in vitro инфекции генотипа D HBV HBC34-v35 и HBC34-v36. Антитела экспрессировали в виде IgG1 с Fc дикого типа (аллотип G1m17,1). Нейтрализацию измеряли по проценту клеток-мишеней, экспрессирующих HBsAg (слева) или HBeAg (справа). N равно 1 эксперимент.

На фигурах 14A-14E показано связывание дополнительных антител HBC34-v37-HBC34-v50 (неочищенные супернатанты из клеток CHO) с HBsAg, как определено с помощью ELISA. Очищенный HBC34-v35 был включен в качестве контроля. Антитела экспрессировали в виде IgG1 с Fc дикого типа (аллотип G1m17,1). Рассчитанные значения EC50 показаны в нижней части каждого графика.

Фигура 15 иллюстрирует нейтрализацию генотипа D HBV с помощью HBC34-v35 и некоторых антител по настоящему изобретению с HBeAg в качестве вирусного считывания. Рассчитанные значения EC50 для каждого mAb показаны справа. В качестве контроля использовали HBC34-v35 (очищенный IgG и надосадочную жидкость) и HBC34-v36 (очищенный IgG).

На Фиг. 16A-16D представлены данные эксклюзионной хроматографии (ЭХ), демонстрирующие высокомолекулярные виды (BMB), присутствующие в HBC34-v35 и девяти очищенных вариантах антител по настоящему изобретению в течение 32 дней. HBC34-v35 и варианты антител концентрировали приблизительно до 25 мг/мл и инкубировали при различных температурах. HMWS оценивали с помощью SEC в день -1, день 0, день 5, день 15 и день 32. Образцы на день -1 оценивали перед концентрацией. Композиции антител инкубировали при 4ºC (Фигура 16A), 25ºC (Фигура 16B) или 40ºC (Фигура 16C) в течение эксперимента. Частота HMWS после 32-дневной инкубации при 40ºC обобщена на Фигуре 16D.

На фигурах 17A-17J показано связывание с HBsAg десяти (((A)-(J)) генотипов HBC34-v35, HBC34-v40, HBC34-v44, HBC34-v45 и HBC34-v50, как определено с помощью FACS. Данные представлены как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) относительно концентрации антител (нг/мл). Мок-окрашивание включено в качестве отрицательного контроля.

На фигурах 18A-18K показано связывание с генотипом D HBsAg и десятью мутантами генотипа D HBsAg с помощью HBC34-v35, HBC34-v40, HBC34-v44, HBC34-

v45 и HBC34-v50, как определено с помощью FACS. Данные представлены как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) относительно концентрации антител (нг/мл). Мок-окрашивание включено в качестве отрицательного контроля.

Фигура 19 иллюстрирует титры антител, полученные путем трансфекции для HBC34-v35, HBC34-v40, HBC34-v44, HBC34-v45 и HBC34-v50. Были оценены системы трансфекции объемом 5 мл и 100 мл, при этом система объемом 100 мл тестировалась в двух или трех повторностях. Показаны титры антител из отдельных тестов в масштабе 5 мл и 100 мл, а также средний титр из тестов в масштабе 100 мл (указывается как мг/л).

На фиг. 20 показаны данные SEC, отражающие термостабильность HBC34-v35 ("HBC35" на легенде), HBC34-v40 ("HBC40"), HBC34-v44 ("HBC44"), HBC34-v45 ("HBC45") и HBC34-v50 ("HBC50"). Антитела концентрировали до 25 мг/мл и инкубировали при 40°C в течение четырех дней перед количественным определением HMWS.

На фиг. 21A-21C, 22A-22C и 23A-23C показаны аминокислотные остатки легкой цепи, которые были выбраны для конструирования для уменьшения агрегации, наблюдаемой в HBC34-v35. На фиг. 21A, 22A и 23A показаны остатки CDR2 легкой цепи HBC34-v35, которые были выбраны для конструирования. На фиг. 21B, 22B и 23B показаны каркасные остатки, которые были выбраны для конструирования. На фиг. 21C, 22C И 23C показаны выравнивания последовательностей частичных последовательностей VL вариантов антител.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области иммунотерапии вируса гепатита B (HBV) и вируса гепатита дельта (HDV). Раскрыты связывающие белки, например, антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки, способные связываться с эпитопом, расположенным в области антигенной петли S-домена белка оболочки HBV (HBsAg), способные нейтрализовать инфекцию HBV и, в некоторых вариантах реализации изобретения, инфекцию HDV.

Раскрытые в настоящем документе связывающие белки обладают преимущественными продуктивными свойствами (например, сниженным образованием димеров антител и/или повышенной продукцией в клетке-хозяине), такими как по сравнению с эталонным антителом к HBV, содержащим CDR и, необязательно, VH и VL "HBC34-v35", описанными в публикации PCT № WO 2020/132091). Вкратце, антитело HBC34-v35 обладает благоприятными связующими и нейтрализующими свойствами, но, как описано в настоящем документе, может образовывать димеры антител посредством

взаимодействий между легкими цепями во время получения/очистки антитела. Димеры HBC34-v35 обладают пониженной способностью связываться с HBsAg по сравнению с мономерами антител HBC34-v35. Снижение образования димера может улучшить, например, эффективность продуцирования антитела (или антигенсвязывающего фрагмента) и эффективность дозы антитела (или антигенсвязывающего фрагмента).

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в настоящем документе связывающие белки могут связываться с любым или всеми известными генотипами HBsAg, а также вариантами HBsAg, и могут нейтрализовать инфекцию HBV, а также инфекцию HDV. В некоторых вариантах реализации изобретения описанный в настоящем документе связывающий белок может связываться и/или может нейтрализовать HBV и/или HDV с аналогичной или даже повышенной активностью по сравнению с HBC34-v35.

В настоящем документе также предложены нуклеиновые кислоты, которые кодируют, и клетки-хозяева, которые экспрессируют такие связывающие белки. Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы применения связывающих белков, описанных в настоящем документе, в диагностике, профилактике и лечении заболеваний, а также в способах скрининга.

Например, варианты осуществления антител, антигенсвязывающих фрагментов и слитых белков согласно настоящему описанию могут быть использованы в способах профилактики, лечения или ослабления или диагностики HBV и HDV. В конкретных вариантах осуществления антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки, описанные в настоящем документе, связываются с двумя или более различными генотипами поверхностного антигена вируса гепатита B и с двумя или более различными инфекционными мутантами поверхностного антигена вируса гепатита B. В конкретных вариантах осуществления антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки, описанные в настоящем документе, связываются с поверхностным антигенами всех известных генотипов вируса гепатита B и с поверхностными антигенами всех известными инфекционных мутантов вируса гепатита B.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения хронической инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом, включающему: введение субъекту антитела к HBV или антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с агентом, который снижает антигенную нагрузку HBV. Настоящее изобретение также относится к способу лечения хронической инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом, включающему: введение субъекту антитела к HBV или антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с ингибитором экспрессии гена HBV.

В некоторых способах, композициях для использования или применениях, раскрытых в настоящем документе, агент, снижающий антигенную нагрузку HBV или ингибитор экспрессии гена HBV, представляет собой агент РНКи (например, миРНК, такую как HBV001 или HBV002 или HBV003).

Прежде чем излагать это изобретение более подробно, может быть полезно для его понимания дать определения некоторых терминов, которые будут использоваться в настоящем документе. Дополнительные определения представлены на протяжении всего данного описания изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники.

Во всем описании, если контекст не требует иного, термин "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", используются синонимично с, например, "иметь", "имеет", "включающий", "включает" или тому подобное, и должен пониматься как подразумевающий включение указанного элемента, соотношения, целого числа (включая, где это уместно, его долю; например, одну десятую и одну сотую целого числа), концентрации или этапа, но не исключение любого другого не заявленного элемента, соотношения, целого числа, концентрации или этапа. Любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон отношений или целочисленный диапазон, приведенный в настоящем документе, следует понимать как включающие значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, когда это необходимо, его фракций (таких как одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иное. Кроме того, любой диапазон чисел, указанных в настоящем документе, относящийся к любому физическому признаку, такому как полимерные субъединицы, размер или толщина, следует понимать как включающее любое целое число в пределах указанного диапазона, если не указано иное.

Термин "состоящий по существу из" не эквивалентен термину "содержащий" и относится к указанным материалам или стадиям формулы изобретения или к тому, что не оказывает существенного влияния на основные характеристики заявленного объекта изобретения. 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 амино- или карбоксиконце или между доменами), которые в комбинации вносят вклад не более чем в 20% (например, не более 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%, например, не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%) на активность домена (доменов), области (областей), модуля (модулей) или белка (например, на аффинность связывания с мишенью связывающего белка).

Кроме того, следует понимать, что отдельные соединения или группы соединений, полученные из различных комбинаций структур и заместителей, описанных в настоящей заявке, раскрыты в настоящей заявке в той же степени, как если бы каждое соединение или группа соединений были представлены по отдельности. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных заместителей находится в пределах объема настоящего изобретения.

Термины, относящиеся к единственному числу, и подобные отсылки в контексте описания (в том числе в контексте формулы изобретения) должны толковаться как для единственного, так и для множественного числа, если нет иных обозначений, указанных здесь или явно противоречащих контексту. Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как одну, обе или любую комбинацию этих альтернатив. Приведение диапазонов значений в настоящем описании предназначено для упрощения ссылки по отдельности на каждое отдельное значение внутри диапазона. Если не указано иное, каждое отдельное значение включено в настоящее описание, как если бы оно было представлено отдельно. Никакие формулировки в описании не следует истолковывать как указывающие на какой-либо не заявленный элемент, существенный для практического применения раскрытых в настоящем описании вариантов осуществления.

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

В контексте настоящего документа "около" означает ±20% от указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное. В некоторых вариантах реализации "около" включает ±15%, ±10% или ±5%.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что описанный далее элемент, компонент, событие или обстоятельство может быть/произойти или не быть/не произойти,

и что описание включает случаи, в которых элемент, компонент, событие или обстоятельство имеет место, и случаи, когда их нет.

В контексте настоящего документа "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии модифицируются, например, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, то есть, α-углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует аналогично встречающейся в природе аминокислоте.

В данном контексте термины "пептид", "полипептид" и "белок" и их вариации относятся к молекуле, которая содержит по меньшей мере две аминокислоты, соединенные друг с другом (нормальной или модифицированной) пептидной связью. Соответственно, белок или полипептид содержит полимер из аминокислотных остатков. Например, пептид, полипептид или белок может содержать или состоять из множества аминокислот, выбранных из 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, или аминокислотного аналога или миметика, каждая из которых связана с по меньшей мере одной другой пептидной связью. Пептид, полипептид или белок может содержать или состоять из L-аминокислот и/или D-аминокислот (или их аналогов или миметиков). Термины "пептид", "полипептид", "белок" также включают "пептидомиметики", которые определяются как пептидные аналоги, содержащие непептидные структурные элементы, причем пептиды способны имитировать или антагонизировать биологическое действие(я) природного исходного пептида. В некоторых вариантах реализации пептидомиметик не обладает такими характеристиками, как ферментативно расщепляемые пептидные связи.

Пептид, полипептид или белок может содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, в дополнение к этим аминокислотам, или он может состоять из аминокислот, отличных от 20 аминокислот, определенных

генетическим кодом. В некоторых вариантах осуществления пептид, полипептид или белок в контексте настоящего изобретения может содержать аминокислоты, которые модифицированы природными процессами, такими как процессы посттрансляционного созревания, или химическими процессами (например, синтетическими процессами), которые известны в данной области техники и включают описанные в настоящем документе. Такие модификации могут появляться где угодно в полипептиде; например, в пептидном скелете, в аминокислотной цепи, или на карбокси- или аминоконцах. Пептид или полипептид может быть разветвленным, например, после убиквитинирования, или может быть циклическим, с разветвлением или без него. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также включают модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Например, пептидные, полипептидные или белковые модификации могут включать ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентную фиксацию нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентную фиксацию липида или липидного производного, ковалентную фиксацию фосфатидилинозитола, ковалентную или нековалентную перекрестную сшивку, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, гликозилирование, включая пегилирование, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, сенелоилирование, сульфатирование, добавление аминокислот, такое как аргинилирование или убиквитинирование. Такие модификации были описаны в литературе (см. Proteins 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 protein 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). Соответственно, термины "пептид", "полипептид", "белок" могут включать, например, липопептиды, липопротеины, гликопептиды, гликопротеины и т.п. Также рассматриваются варианты белков, пептидов и полипептидов согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления варианты белков, пептидов и полипептидов содержат 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 аминокислотной последовательности определенной или эталонной аминокислотной последовательности, описанной в настоящем документе.

В данном контексте "(поли)пептид" и "белок" могут быть использованы взаимозаменяемо по отношению к полимеру аминокислотных остатков, такому как множество мономеров аминокислот, 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, а пиримидиновые основания включают урацил, тимин и цитозин. Мономеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают тиофосфат, фосфодитиоат, фосфоселеноат, фосфодиселеноат, фосфоанилотиоат, фосфоанилидат, фосфоамидат или тому подобное.

Молекулы нуклеиновой кислоты включают полирибонуклеиновую кислоту (РНК), полидезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая включает кДНК (комплементарная ДНК), геномную ДНК и синтетическую ДНК, любая из которых может быть одно- или двухцепочечной. В случае одноцепочечной цепи молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой кодирующую цепь или некодирующую (антисмысловую) цепь. Также рассматриваются микроРНК, миРНК (малые интерфериирующие РНК), вирусная геномная РНК и синтетическая РНК. Полинуклеотиды (включая олигонуклеотиды) и их фрагменты могут быть получены, например, полимеразной цепной реакцией (ПЦР) или трансляцией in vitro, или получены любым из лигирования, расщепления, эндонуклеазного действия или экзонуклеазного действия.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, включает все нуклеотидные последовательности, кодирующие одну и ту же аминокислотную последовательность. Некоторые варианты нуклеотидных последовательностей могут также включать интрон (интроны) в тех случаях, когда интрон (интроны) будет удален с помощью ко- или посттранскрипционных механизмов. Различные нуклеотидные последовательности могут кодировать одну и ту же аминокислотную последовательность в результате избыточности или вырожденности генетического кода или путем сплайсинга, или и того и другого.

Также рассматриваются варианты молекул нуклеиновых кислот по данному описанию. Варианты молекул нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичны молекулам нуклеиновой кислоты определенного или эталонного полинуклеотида, как описано в настоящем документе, или варианты, которые гибридизуются с полинуклеотидом в жестких условиях

гибридизации, составляющих 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при около 65-68 °С или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия и 50% формамида при около 42 °С. Варианты молекул нуклеиновых кислот сохраняют способность кодировать слитый белок или их связывающий домен, имеющий функциональность, описанную в настоящем документе, такую как специфическое связывание молекулы-мишени.

Используемый в настоящем документе термин "вариант последовательности" относится к любой последовательности, имеющей одно или более изменений по сравнению с эталонной последовательностью, при этом эталонная последовательность представляет собой любую опубликованную последовательность и/или последовательности, перечисленные в "Таблице последовательностей и SEQ ID номеров" (перечень последовательностей) в настоящем документе. Таким образом, термин "вариант последовательности" включает варианты нуклеотидной последовательности и варианты аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант последовательности является нуклеотидной последовательностью, эталонная последовательность также является нуклеотидной последовательностью, тогда как в некоторых вариантах реализации изобретения в отношении варианта последовательности в контексте аминокислотной последовательности, эталонная последовательность также является аминокислотной последовательностью. "Вариант последовательности", используемый в настоящем документе, может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, 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% идентичным эталонной последовательности.

"Процент идентичности последовательностей" относится к родству между двумя или более последовательностями, определенному путем сравнения последовательностей. Способы определения идентичности последовательностей предназначены для обеспечения наилучшего соответствия между сравниваемыми последовательностями. Например, последовательности могут быть выровнены для целей оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального выравнивания). Кроме того, негомологичные последовательности могут быть проигнорированы для целей сравнения. Процент идентичности последовательности, указанный в настоящем документе, рассчитывают по длине эталонной последовательности, если не указано иное. Способы

определения идентичности и сходства последовательностей можно найти в общедоступных компьютерных программах. Выравнивание последовательностей и расчеты процента идентичности могут быть выполнены с использованием программы BLAST (например, BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN или BLASTX). Математический алгоритм, используемый в программах BLAST, можно найти в Altschul и др., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997. В контексте настоящего документа следует понимать, что для анализа при использовании аналитического программного обеспечения результаты анализа основаны на "установленных по умолчанию значениях" упоминаемой программы. "Установленные по умолчанию значения" означают любой набор значений или показателей, загружаемых исходно с программным обеспечением при первом запуске.

"Вариант последовательности" в контексте последовательности нуклеиновой кислоты (нуклеотида) имеет измененную последовательность, в которой один или более нуклеотидов в эталонной последовательности удалены или замещены, или один или более нуклеотидов вставлены в последовательность эталонной нуклеотидной последовательности. Нуклеотиды упоминаются в настоящем документе стандартным однобуквенным обозначением (A, C, G или T). Из-за вырожденности генетического кода "вариант последовательности" нуклеотидной последовательности может либо привести к изменению соответствующей эталонной аминокислотной последовательности, то есть к "варианту последовательности" аминокислоты, либо нет. В некоторых вариантах реализации изобретения вариант нуклеотидной последовательности не приводит к варианту аминокислотной последовательности (например, молчащей мутации). В некоторых вариантах реализации изобретения рассматривается вариант нуклеотидной последовательности, который приводит к одной или более "не молчащим" мутациям. В некоторых вариантах осуществления вариант нуклеотидной последовательности согласно 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, описанные в настоящем документе, также относятся к кодон-оптимизированным версиям эталонной нуклеотидной или аминокислотной последовательности или нуклеотидной или аминокислотной последовательности дикого типа. В любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, полинуклеотид по настоящему изобретению может быть кодон-оптимизирован для клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид.

Оптимизация кодонов может быть выполнена с использованием известных методов и инструментов, например, с использованием инструмента GenScript® OptimumGeneTM или GeneArt Gene Synthesis Tool (Thermo Fisher Scientific). Кодон-оптимизированные последовательности включают последовательности, которые частично кодон-оптимизированы (то есть, по меньшей мере один кодон оптимизирован для экспрессии в клетке-хозяине), и те, которые полностью кодон-оптимизированы.

"Вариант последовательности" в контексте аминокислотной последовательности имеет измененную последовательность, в которой одна или более аминокислот удалены, замещены или вставлены 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 вариант последовательности, которая имеет не более 10 изменений, т.е. любую комбинацию делеций, вставок или замен, является "по меньшей мере на 90% идентичной" эталонной последовательности.

"Консервативная замена" относится к аминокислотным заменам, которые существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания конкретного белка. Как правило, консервативные замены представляют собой замены, в которых замещенный аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. Консервативные замены включают замену, основанную на 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 консервативные группы замещения по аналогичной функции, химической структуре или составу (например, кислотные, основные, алифатические, ароматические или серосодержащие). Например, алифатическая группа может включать, для целей замены, Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы консервативных замен включают: серосодержащие: Met и цистеин (Cys или C); кислые: Asp, Glu, Asn и Gln; небольшие алифатические, неполярные или слегка полярные

остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; полярные, положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; большие алифатические, неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и большие ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительную информацию можно найти в Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company.

Вставки в аминокислотную последовательность могут включать N- и/или C-концевые гибриды длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают слияние N- или C-конца аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

В целом, изменения в вариантах последовательностей не отменяют или существенно не уменьшают желаемую функциональность соответствующей эталонной последовательности. Например, предпочтительно, чтобы вариантная последовательность по настоящему изобретению существенно не снижала или не аннулировала функциональность последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для связывания с тем же эпитопом, для достаточной нейтрализации инфекции HBV и HDV, и/или не вызывала или не увеличивала образование димера антитела, и/или не продуцировалась при более низком титре в клетке-хозяине по сравнению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, имеющим (или кодируемым) эталонную последовательность.

В данном контексте последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, "полученная" из указанной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, относится к происхождению нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из конкретной последовательности, может иметь аминокислотную последовательность, которая по существу идентична той последовательности или ее части, из которой она получена, при этом "по существу идентичная" включает варианты последовательности, как определено выше. Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из конкретного пептида или белка, может быть получена из соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. В этом контексте "соответствующий" относится к обладанию такой же функциональностью или характеристикой, представляющей интерес. Например, "внеклеточный домен" соответствует другому "внеклеточному домену" (другого белка), или "трансмембранный домен" соответствует другому "трансмембранному домену" (другого белка). Таким

образом, "соответствующие" части пептидов, белков и нуклеиновых кислот легко идентифицируются специалистом в данной области техники. Аналогичным образом, последовательность, "полученная из" другой (например, "исходной") последовательности, может быть идентифицирована специалистом в данной области техники как имеющая свое происхождение в исходной последовательности.

Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентичной исходной нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (из которого она получена). Однако последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, также может иметь одну или более мутаций относительно исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которых она получена), в частности последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть вариантом функциональной последовательности, как описано выше, исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которых она получена). Например, в пептиде/белке один или более аминокислотных остатков могут быть замещены другими аминокислотными остатками, или может происходить вставка или делеция одного или более аминокислотных остатков.

В данном контексте 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 излучением, или мутацию, полученную путем сайт-специфического мутагенеза (молекулярно-биологические методы для внесения специфических и преднамеренных изменений в последовательность нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотную последовательность). Таким образом, термины "мутация" или "мутирование" следует понимать как включающие также физическое создание или индукцию мутации, например, в последовательности нуклеиновой кислоты или в аминокислотной последовательности. Мутация включает замену, делецию и/или вставку одного или более нуклеотидов или аминокислот, а также

инверсию нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Для получения мутации в аминокислотной последовательности в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную аминокислотную последовательность, может быть введена мутация для экспрессии (рекомбинантного) мутированного полипептида. Мутация может быть получена, например, путем изменения (например, путем сайт-направленного мутагенеза) кодона (например, путем чередования одного, двух или трех нуклеотидных оснований в нем) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну аминокислоту, с получением кодона, который кодирует другую аминокислоту, или который кодирует сходную аминокислоту, или путем синтеза варианта последовательности.

"Функциональный вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который структурно схож или по существу структурно схож с исходным или эталонным соединением согласно настоящему изобретению, но незначительно отличается по составу (например, одно основание, атом или функциональная группа отличаются, добавлены или удалены), так что полипептид или кодируемый полипептид способен выполнять по меньшей мере одну функцию исходного полипептида с по меньшей мере 50% эффективностью, предпочтительно по меньшей мере 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100% уровнем активности исходного полипептида. Другими словами, функциональный вариант полипептида или кодируемого полипептида согласно настоящему изобретению имеет "сходное связывание", "сходную аффинность" или "сходную активность", когда функциональный вариант демонстрирует снижение производительности в выбранном анализе не более чем на 50% по сравнению с исходным или эталонным полипептидом, таким как анализ для измерения аффинности связывания (например, окрашивание Biacore® или тетрамером, измеряющее константу ассоциации (Ka) или диссоциации (KD)).

В контексте настоящего документа "функциональная часть" или "функциональный фрагмент" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который содержит только домен, часть или фрагмент исходного или эталонного соединения, и полипептид или кодируемый полипептид сохраняет по меньшей мере 50% активность, связанную с доменом, частью или фрагментом исходного или эталонного соединения, предпочтительно по меньшей мере 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100% уровень активности исходного полипептида, или обеспечивает биологическое преимущество (например, эффекторную функцию). "Функциональная часть" или "функциональный фрагмент" полипептида или кодируемого полипептида согласно настоящему изобретению имеет "аналогичное связывание" или "аналогичную активность", когда функциональная часть или фрагмент демонстрирует снижение

производительности в выбранном анализе не более чем на 50% по сравнению с исходным или эталонным полипептидом (предпочтительно не более чем на 20% или 10%, или не более чем на логарифмическую (log) разницу по сравнению с исходным или эталонным по отношению к аффинности).

Термин "выделенный" означает, что материал извлечен из своего исходного окружения (например, природной среды, если он встречается в естественных условиях). Например, встречающаяся в природе нуклеиновая кислота или полипептид, присутствующие в живом животном, не являются выделенными, но та же нуклеиновая кислота или полипептид, отделенные от материалов, совместно с ними присутствующих в естественной системе, являются выделенными. Такая нуклеиновая кислота может быть частью вектора и/или такая нуклеиновая кислота или полипептид могут быть частью композиции (например, клеточного лизата) и все еще могут быть выделенными в том смысле, что такой вектор или композиция не является частью природной среды для нуклеиновой кислоты или полипептида. "Выделенное" может, в некоторых вариантах осуществления, описывать антитело, антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или композицию, которая находится вне человеческого тела.

Термин "ген" означает сегмент ДНК или РНК, участвующий в получении полипептидной цепи; в некоторых контекстах он включает области, предшествующие и следующие за кодирующей областью (например, 5'-нетранслируемая область (UTR) и 3'-UTR), а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

Термин "вводимый" в контексте вставки молекулы нуклеиновой кислоты в клетку означает "трансфекцию", "трансформацию" или "трансдукцию" и включает ссылку на включение молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где молекула нуклеиновой кислоты может быть включена в геном клетки (например, хромосомы, плазмиды, пластиды или митохондриальной ДНК), преобразована в автономный репликон или временно экспрессирована (например, трансфицированная мРНК).

Термин "рекомбинантный", используемый в настоящем документе (например, рекомбинантное антитело, рекомбинантный белок, рекомбинантная нуклеиновая кислота или тому подобное), относится к любой молекуле (антителу, белку, нуклеиновой кислоте или тому подобному), которая получена, экспрессирована, создана или выделена рекомбинантными средствами и которая не встречается в природе. Термин "рекомбинантный" может быть использован как синоним термина "сконструированный"

или "неприродный" и может относиться к организму, микроорганизму, клетке, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, который включает по меньшей мере одно генетическое изменение или был модифицирован введением экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, причем такие изменения или модификации вводятся посредством генной инженерии (т.е. вмешательства человека). Генетические изменения включают, например, модификации, вводящие экспрессируемые молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие белки, слитые белки или ферменты, или другие добавления, делеции, замены молекул нуклеиновых кислот или другие функциональные нарушения генетического материала клетки. Дополнительные модификации включают, например, некодирующие регуляторные области, в которых модификации изменяют экспрессию полинуклеотида, гена или оперона.

В контексте настоящего документа термин "гетерологичный" или "неэндогенный" или "экзогенный" относится к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которая не является нативной для клетки-хозяина или субъекта, или любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которая является нативной для клетки-хозяина или субъекта, который был изменен. Гетерологичные, неэндогенные или экзогенные включают гены, белки, соединения или молекулы нуклеиновых кислот, которые были мутированы или иным образом изменены таким образом, что структура, активность или и то и другое различаются между нативными и измененными генами, белками, соединениями или молекулами нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные, неэндогенные или экзогенные гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот могут быть неэндогенными для клетки-хозяина или субъекта, но вместо этого нуклеиновые кислоты, кодирующие такие гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот, могут быть добавлены в клетку-хозяина путем конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации или тому подобного, где добавленная молекула нуклеиновой кислоты может интегрироваться в геном клетки-хозяина или может существовать в виде внехромосомного генетического материала (например, в виде плазмиды или другого самовоспроизводящегося вектора). Термин "гомологичный" или "гомолог" относится к гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, обнаруженной в или полученной из клетки-хозяина, вида или штамма. Например, гетерологичный или экзогенный полинуклеотид или ген, кодирующий полипептид, может быть гомологичным нативному полинуклеотиду или гену и кодировать гомологичный полипептид или активность, но 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 одного и того же вида, другого вида или их комбинации.

В контексте настоящего документа термин "эндогенный" или "нативный" относится к полинуклеотиду, гену, белку, соединению, молекуле или активности, которые обычно присутствуют в клетке-хозяине или субъекте.

В контексте настоящего документа "экспрессия" в данном контексте относится к процессу, посредством которого получали полипептид на основе кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Процесс может включать транскрипцию, посттранскрипционный контроль, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционный контроль, посттрансляционную модификацию или любую их комбинацию. Экспрессируемая молекула нуклеиновой кислоты обычно функционально связана с последовательностью контроля экспрессии (например, промотором).

Термин "функционально связанный" относится к ассоциации двух или более молекул нуклеиновой кислоты на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, так что функция одной из них зависит от другой. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он способен регулировать экспрессию указанной кодирующей последовательности (т.е. кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем указанного промотора). "Несвязанный" означает, что ассоциированные генетические элементы не тесно связаны друг с другом, и функция одного не влияет на другого.

Как описано в настоящем документе, более чем одна гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в клетку-хозяина в виде отдельных молекул нуклеиновой кислоты, в виде множества индивидуально контролируемых генов, в виде молекулы полицистронной нуклеиновой кислоты, в виде одной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок (например, тяжелую цепь антитела) или любую их комбинацию. Когда в клетку-хозяина вводят две или более гетерологичные молекулы нуклеиновой кислоты, следует понимать, что две или более гетерологичные молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в виде одной молекулы нуклеиновой кислоты (например, на одном векторе), на отдельных векторах, интегрированных в хромосому-хозяина на одном сайте или нескольких сайтах, или любой их комбинации. Количество упомянутых гетерологичных молекул нуклеиновых кислот или белковых активностей относится к количеству кодирующих молекул нуклеиновых кислот или количеству белковых активностей, а не к количеству отдельных молекул нуклеиновых кислот, введенных в клетку-хозяина.

В данном контексте термины "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство. Таким образом, термины "трансформанты" и "трансформированные клетки" и "клетки-хозяева" включают первичную клетку-субъект и культуры, полученные из нее, независимо от количества переносов. Также следует понимать, что все потомство может не быть точно идентичным по содержанию ДНК из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Указанные термины также включают варианты потомства, которые имеют ту же или по существу ту же функцию, фенотип или биологическую активность, что и наблюдаемые в исходно трансформированной клетке. Там, где предполагаются различные обозначения, это будет ясно из контекста.

Термин "конструкция" относится к любому полинуклеотиду, который содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты (или, если контекст ясно указывает, слитый белок по настоящему изобретению).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть функционально связаны с определенными элементами вектора. Например, полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы, могут быть функционально связаны. Последовательности контроля экспрессии могут включать соответствующие последовательности инициации, терминации, промотора и энхансера транскрипции; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусные последовательности Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, возможно, последовательности, которые повышают секрецию белка. Последовательности контроля экспрессии могут быть функционально связаны, если они смежны с представляющим интерес геном и последовательностями контроля экспрессии, которые действуют в транс или на расстоянии для контроля представляющего интерес гена.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

Раскрытые в настоящем документе варианты реализации изобретения включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые способны связываться с антигенной петлевой областью HBsAg (HBsAg и антигенная петлевая область более подробно описаны здесь) и, необязательно, нейтрализующие инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J, или любой их комбинации; т.е. любой один,

любые два, любые три, любые четыре, любые пять, любые шесть, любые семь, любые восемь, любые девять или все десять из этих генотипов. Как обсуждается далее в настоящем документе, раскрытые в настоящем документе антитела и антигенсвязывающие фрагменты обладают другими преимуществами, включая, например, но не ограничиваясь ими, характеристики, которые способствуют продуцированию в клетке-хозяине, и снижают склонность к образованию нежелательных агрегатов, таких как димеры.

В данном контексте и если контекст явно не указывает на иное, "антитело" относится к интактному антителу, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями (хотя следует понимать, что антитела тяжелой цепи, в которых отсутствуют легкие цепи, все еще в целом охватываются термином "антитело", хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения включают как VH, так и VL, и в некоторых вариантах осуществления как тяжелую цепь, так и легкую цепь), а также любую антигенсвязывающую часть или фрагмент интактного антитела, который обладает или сохраняет способность связываться с молекулой антигена-мишени, распознаваемой интактным антителом, такой как, например, фрагмент scFv, Fab или F(ab')2. Таким образом, термин "антитело" в настоящем документе используется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и их функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагменты, связывающие фрагменты антигена (Fab), фрагменты F(ab')2, фрагменты Fab', фрагменты Fv, рекомбинантные фрагменты IgG (rIgG), фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), и фрагменты однодоменных антител (sd) (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генетически сконструированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептидные антитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгатные антитела, полиспецифические, например, биспецифические антитела, диатела, триатела и тетратела, тандем ди-scFv и тандем три-scFv и другие форматы антител, известные в данной области техники. Если не указано иное, термин "антитело" следует понимать как охватывающий его функциональные фрагменты. Термин "антитело" также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого их класса или подкласса, включая IgG и его подклассы (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgE, IgA и IgD.

В контексте антитела термины "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент" и "фрагмент антитела" используются взаимозаменяемо для обозначения любого фрагмента

антитела согласно настоящему изобретению, который сохраняет антигенсвязывающую активность антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv или scFv.

Известны антитела человека (например, van Dijk, M. A., и van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Антитела человека могут быть получены у трансгенных животных (например, мышей), которые способны при иммунизации продуцировать полный репертуар или селекцию антител человека в отсутствие продукции эндогенного иммуноглобулина. Перенос набора генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека в такие мутантные мыши зародышевой линии приведет к выработке человеческих антител при стимуляции антигеном (см., например, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 3340). Антитела человека также могут быть получены 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). Методы Cole et al. и Boerner et al. также доступны для получения моноклональных антител человека (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 улучшенной иммортализации клеток EBV-B, как описано в Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): эффективный способ получения моноклональных антител человека из В-клеток памяти: сильная нейтрализация коронавируса SARS. Nat Med. 10(8):871-5. Термин "человеческое антитело", используемый в настоящем документе, также включает такие антитела, которые модифицированы, например, в вариабельной области или константной области, для получения свойств в соответствии с антителами и фрагментами антител по настоящему изобретению.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть любого изотипа (например, IgA, IgG, IgM, IgE, IgD; то есть, содержащие тяжелую цепь α, γ, μ или δ). В пределах изотипа IgG, например, антитела могут представлять собой подкласс IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, могут включать легкую цепь κ или λ. Предпочтительно антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать легкую цепь λ. В некоторых вариантах реализации HBsAg-специфические антитела, описанные в настоящем документе, имеют изотип IgG (например, IgG1M, аллотип 17 1) и могут

блокировать высвобождение HBV и HBsAg из инфицированных клеток. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело согласно настоящему описанию может связываться внутриклеточно и, таким образом, блокировать высвобождение вирионов HBV и HBsAg.

Термины "V_L" или "VL" и "V_H" или "VH" относятся к вариабельной области (также называемой вариабельным доменом) легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела, соответственно; обычно эти области непосредственно участвуют в связывании антитела или антигенсвязывающего фрагмента с антигеном. VL (а также CL или легкая цепь) может быть классом каппа (к) (также "VK" в настоящем документе) или классом лямбда (λ). Вариабельные связывающие области включают дискретные подобласти, известные как "определяющие комплементарность области" (CDR) и "каркасные области" (FR). Термины "область, определяющая комплементарность" и "CDR" являются синонимами "гипервариабельной области" или "HVR" и относятся к последовательностям аминокислот в пределах вариабельных областей антитела, которые, как правило, совместно придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания антитела, при этом последовательные CDR (т.е. CDR1 и CDR2, CDR2 и CDR3) отделены друг от друга в первичной аминокислотной последовательности каркасной областью. В каждой вариабельной области имеется три CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3; LCDR1, LCDR2, LCDR3; также называемые CDRH и CDRL, соответственно). В некоторых вариантах осуществления VH антитела содержит четыре FR и три CDR следующим образом: FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4; и VL антитела содержит четыре FR и три CDR следующим образом: FR1-LCDR1-FR2-LCDR2-FR3-LCDR3-FR4. В общем, VH и VL вместе образуют антигенсвязывающий сайт через их соответствующие CDR, хотя следует понимать, что в некоторых случаях сайт связывания может быть образован или может содержать одну, две, три, четыре или пять CDR, которые могут располагаться в VH, в VL или в обоих.

В некоторых вариантах осуществления CDR антител и аминокислотная нумерация вариабельных областей соответствуют системе, разработанной Chemical Computing Group ("CCG"); например, с использованием программного обеспечения Molecular Operating Environment (MOE) (www.chemcomp.com).

В некоторых вариантах реализации изобретения CDR антител и нумерация аминокислот вариабельных областей соответствуют схеме нумерации IMGT (см., например, Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003).

Эквивалентные положения остатков могут быть аннотированы и для различных молекул при сравнении с использованием Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI) программного инструмента (2016, Bioinformatics 15:298-300).

В данном контексте термин "вариант" CDR относится к функциональному варианту (представленному в данном документе) последовательности CDR, содержащей вплоть до 1-3 аминокислотных замен, делеций или их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 41, 40, 42 и 43, аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 49, 44-48 и 50-53 и аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55 или 56,

где, необязательно, VL содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию, относительно SEQ ID NO: 58, и где аминокислотная нумерация мутации (мутаций) по типу замены соответствует SEQ ID NO: 58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит какой-либо дополнительной мутации (мутаций) относительно SEQ ID NO: 58,

и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной областью петли HBsAg и, необязательно, нейтрализовать инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35, и 37, соответственно, а в VL, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 45, и 55, соответственно; (ii) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35, и 37, а в VL, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 46 и 55, соответственно; (iii) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 47 и 55, соответственно; (iv) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, и в VL, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 48 и 55, соответственно; (v) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL – аминокислотные

последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 49 и 55, соответственно; (vi) в VH - аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL – аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 50 и 55, соответственно; (vii) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, и в VL, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 51 и 55, соответственно; (viii) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL – аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 52 и 55, соответственно; или (ix) в VH – аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL – аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 53 и 55, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO: 35 или 36, и аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO: 37; и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность CDRL1, представленную в любом из SEQ ID NO: 40-43, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно любому из SEQ ID NO: 45-53, и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO: 55 или 56, где CDR соответствуют CCG, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализовать инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I, или J, или любой их комбинации.

В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 представляют собой SEQ ID NO: (i) 34, 35, 37, 41, 45 и 55, соответственно; (ii) 34, 35, 37, 41, 46 и 55, соответственно; (iii) 34, 35, 37, 41, 47 и 55, соответственно; (iv) 34, 35, 37, 41, 48 и 55, соответственно; (v) 34, 35, 37, 41, 49 и 55, соответственно; (vi) 34, 35, 37, 41, 50 и 55, соответственно; (vii) 34, 35, 37, 41, 41, 51 и 55, соответственно; (viii) 34, 35, 37, 41, 52 и 55, соответственно; или (ix) 34, 35, 37, 41, 53 и 55, соответственно, где CDR определены в соответствии с CCG.

В таблице 1 представлены аминокислотные последовательности CDR SEQ ID NO некоторых антител, где CDR определены в соответствии с CCG.

Таблица 1. SEQ ID NO аминокислотных последовательностей CDR (нумерация CCG) некоторых антител

Антитело	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
HBC34-v35	34	35	37	41	44	55
HBC34-v36	34	35	37	41	45	55
HBC34-v37	34	35	37	41	46	55
HBC34-v38	34	35	37	41	47	55
HBC34-v39	34	35	37	41	48	55
HBC34-v40	34	35	37	41	49	55
HBC34-v41	34	35	37	41	50	55
HBC34-v42	34	35	37	41	51	55
HBC34-v43	34	35	37	41	52	55
HBC34-v44	34	35	37	41	53	55
HBC34-v45	34	35	37	41	44	55
HBC34-v46	34	35	37	41	44	55
HBC34-v47	34	35	37	41	51	55
HBC34-v48	34	35	37	41	44	55
HBC34-v49	34	35	37	41	51	55
HBC34-v50	34	35	37	41	44	55

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 HBC34-v36, HBC34-v37, HBC34-v38, HBC34-v39, HBC34-v40, HBC34-v41, HBC34-v42, HBC34-v43, HBC34-v44, HBC34-v45, HBC34-v46, HBC34-v47, HBC34-v48, HBC34-v49, или HBC34-v50, где CDR определены согласно CCG, необязательно, где VL дополнительно содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию, относительно SEQ ID NO: 58, и где нумерация аминокислотной мутации (мутаций) по типу замены соответствует SEQ ID NO: 58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит никакой другой мутации(й) относительно SEQ ID NO: 58.

В таблице 2 приведены аминокислотные SEQ ID NO CDR некоторых антител, где CDR определены в соответствии с IMGT (раскрыты короткие и длинные версии CDRH2 и CDRL2).

Таблица 2. Аминокислотные SEQ ID NO CDR (нумерация IMGT) некоторых антител

Антитело	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3

		(короткая, длинная)			(короткая/длинная)	
HBC34-v35	150	151/152	153	154	155/163	173
HBC34-v36	150	151/152	153	154	156/164	173
HBC34-v37	150	151/152	153	154	157/165	173
HBC34-v38	150	151/152	153	154	158/166	173
HBC34-v39	150	151/152	153	154	159/167	173
HBC34-v40	150	151/152	153	154	156/168	173
HBC34-v41	150	151/152	153	154	158/169	173
HBC34-v42	150	151/152	153	154	160/170	173
HBC34-v43	150	151/152	153	154	161/171	173
HBC34-v44	150	151/152	153	154	162/172	173
HBC34-v45	150	151/152	153	154	155/163	173
HBC34-v46	150	151/152	153	154	155/163	173
HBC34-v47	150	151/152	153	154	160/170	173
HBC34-v48	150	151/152	153	154	155/163	173
HBC34-v49	150	151/152	153	154	160/170	173
HBC34-v50	150	151/152	153	154	155/163	173

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 HBC34-v36, HBC34-v37, HBC34-v38, HBC34-v39, HBC34-v40, HBC34-v41, HBC34-v42, HBC34-v43, HBC34-v44, HBC34-v45, HBC34-v46, HBC34-v47, HBC34-v48, HBC34-v49, или HBC34-v50, где CDR определены согласно IMGT, необязательно, где VL дополнительно содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию, относительно SEQ ID NO: 58, и где нумерация аминокислотных мутации(й) по типу замены соответствует SEQ ID NO: 58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит никакой другой мутации(й) относительно SEQ ID NO: 58.

В таблице 3 приведены аминокислотные SEQ ID NO VH и VL определенных антител.

Таблица 3. аминокислотные SEQ ID NO VH и VL некоторых антител

Антитело	VH	VL

HBC34-v35	38	57
HBC34-v36	38	58
HBC34-v37	38	59
HBC34-v38	38	60
HBC34-v39	38	61
HBC34-v40	38	62
HBC34-v41	38	63
HBC34-v42	38	64
HBC34-v43	38	65
HBC34-v44	38	66
HBC34-v45	38	67
HBC34-v46	38	68
HBC34-v47	38	69
HBC34-v48	38	70
HBC34-v49	38	71
HBC34-v50	38	72

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности VH и VL: HBC34-v36, HBC34-v37, HBC34-v38, HBC34-v39, HBC34-v40, HBC34-v41, HBC34-v42, HBC34-v43, HBC34-v44, HBC34-v45, HBC34-v46, HBC34-v47, HBC34-v48, HBC34-v49 или HBC34-v50.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где: (i) VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или любое нецелое значение между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или 39; и/или (ii) VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или любое нецелое значение между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-66, 69, 71 или 72. В конкретных вариантах реализации изобретения VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или любое нецелое значение между ними) идентичных аминокислотным последовательностям, показанным в SEQ ID NO: (i) 38 и 58, соответственно; (ii) 38 и 59, соответственно; (iii) 38 и 60, соответственно; (iv) 38 и 61, соответственно; (v) 38 и 62,

соответственно; (vi) 38 и 63, соответственно; (vii) 38 и 64, соответственно; (viii) 38 и 65, соответственно; (ix) 38 и 66, соответственно; (x) 38 и 71, соответственно; или (xi) 38 и 72, соответственно. В качестве неограничивающего примера, в некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 38, а VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или 39; и/или VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-66, 69, 71 или 72. В конкретных вариантах реализации изобретения VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: (i) 38 и 58, соответственно; (ii) 38 и 59, соответственно; (iii) 38 и 60, соответственно; (iv) 38 и 61, соответственно; (v) 38 и 62, соответственно; (vi) 38 и 63, соответственно; (vii) 38 и 64, соответственно; (viii) 38 и 65, соответственно; (ix) 38 и 66, соответственно; (x) 38 и 71, соответственно; или (xi) 38 и 72, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-72.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38, и VL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 59-72.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, содержащему: вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: (i) 38 и 67, соответственно; или (ii) 38 и 68, соответственно, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной петлевой областью HBsAg и нейтрализующие инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J, или любой их комбинации.

Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH согласно SEQ ID NO: 38 или 39 и вариант VL любой из SEQ ID NO: 57-72, который

содержит любую одну или более из следующих мутаций (в каркасной области 3, как определено согласно нумерации CCG): R60A, R60N, R60K, S64A, I74A. В некоторых дополнительных вариантах реализации вариант VL не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 57-72 (соответственно)).

Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH согласно SEQ ID NO: 38 и вариант VL любой из SEQ ID NO: 57-72, который содержит мутацию по типу замены (такую как, например, консервативная аминокислотная замена или мутация с аминокислотой, кодируемой зародышевой линией) в Q78, D81 или в обоих случаях (нумерация CCG).

Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH согласно SEQ ID NO: 39 и вариант VL любой из SEQ ID NO: 57-72, который содержит мутацию по типу замены (такую как, например, консервативная аминокислотная замена или мутация с аминокислотой, кодируемой зародышевой линией) в Q78, D81 или в обоих случаях (нумерация CCG).

Как обсуждается далее в настоящем документе, описанные здесь антитела и антигенсвязывающие фрагменты имеют сниженную склонность к образованию агрегатов (например, димеров), и/или имеют улучшенную продуктивность (например, более высокий титр) в клетке-хозяине, и/или имеют сходное или по существу идентичное или даже улучшенное: связывание с HBsAg, нейтрализацию HBV, и/или термостабильность по сравнению с эталонным антителом, описанным в настоящем документе.

Следует понимать, что "эталонное" антитело или антигенсвязывающий фрагмент относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые идентичны указанному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, соответственно, за исключением идентифицированных или перечисленных признаков (например, различий в последовательности(ях) каркаса CDR и/или вариабельной области). В некоторых вариантах реализации эталонное антитело содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

В качестве неограничивающего примера, антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению может представлять собой изотип IgG1 и содержать Fc-фрагмент IgG1 дикого типа, а эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями,

представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57, и представляет собой изотип IgG1 и содержит Fc-фрагмент IgG1 дикого типа. Кроме того, следует понимать, что при сравнении описанного в настоящем документе антитела или антигенсвязывающего фрагмента с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом при определенных условиях, условия (например, количество исходного материала, температура, буфер, идентичность линии клеток-хозяев, условия культивирования, продолжительность соответствующего периода времени, кодон-оптимизация кодирующего полинуклеотида или тому подобное), если явно не указано иное, будут идентичны между описанной в настоящем документе молекулой(молекулами) и эталонной молекулой(молекулами), или настолько близки к идентичным, насколько позволяют условия (например, два антитела могут отличаться по своим аминокислотным последовательностям одной или несколькими аминокислотами, но будут во всем остальном идентичны и будут кодироваться сопоставимым полинуклеотидом (например, каждое антитело может быть кодировано соответствующим кодон-оптимизированным полинуклеотидом).

В качестве неограничивающего примера, описанные в настоящем документе антитела и антигенсвязывающие фрагменты продуцируют меньшее количество агрегатов (например, в форме димеров антитело:антитело, димеров антитело:антигенсвязывающий фрагмент или димеров антигенсвязывающий фрагмент:антигенсвязывающий фрагмент) и/или имеют более высокий титр продукции в клетке-хозяине по сравнению с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, соответственно.

В этом контексте димер представляет собой комплекс или агрегат, содержащий две молекулы антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, димер антитело:антитело, димер Fab:Fab или димер антитело:Fab). Как обсуждается далее в настоящем документе, димеризация в этом контексте отличается от обычных ассоциаций между компонентами тяжелой цепи антитела и легкой цепи или между двумя полипептидами тяжелой цепи антитела, которые возникают при образовании интактного тетрамерного антитела, Fv или Fab, и может включать ассоциации между двумя мономерами. Соответственно, следует понимать, что в настоящем контексте "димер" не относится к ассоциации тяжелой цепи антитела с легкой цепью антитела для получения полуантитела, содержащего функциональный Fab, и не включает ассоциацию двух тяжелых цепей антитела (например, шарнир-шарнир и Fc-Fc) или ассоциации VH-VL (например, которые происходят через дисульфидные связи), например, в Fv или в Fab.

В некоторых вариантах осуществления димер образуется путем ассоциации между VL двух отдельных молекул антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Иллюстрация димера, образованного ассоциацией двух VL отдельных молекул антитела, показана на фиг. 7. Такая димеризация может, например, снижать валентность связывания, и/или аффинность связывания, и/или авидность, и/или эффективность нейтрализации одного или обоих антител или антигенсвязывающих фрагментов, содержащихся в них. Как правило, повышенное присутствие таких димеров в композиции, содержащей множество антител или антигенсвязывающих фрагментов, снижает общую связывающую и/или нейтрализующую активность композиции.

Димеры антител или антигенсвязывающих фрагментов могут быть идентифицированы с использованием известных методик, таких как, например, эксклюзионная хроматография. Димер будет иметь молекулярную массу, превышающую молекулярную массу каждой его отдельной (мономерной) субъединицы, и, как правило, будет равен или приближенно равен сумме молекулярных масс каждой его отдельной субъединицы. Например, гомодимер (т.е. содержащий две молекулы антитела, которые идентичны или по существу идентичны по своим аминокислотным последовательностям), как правило, будет иметь молекулярную массу, которая примерно в два раза превышает молекулярную массу каждой его мономерной субъединицы. Например, типичная молекула иммуноглобулина IgG1 человека имеет молекулярную массу около 150 кДа (например, каждая из двух тяжелых цепей весит около 50 кДа и каждая из двух легких цепей весит около 25 кДа), а димер, содержащий две такие молекулы иммуноглобулина, будет иметь молекулярную массу около 300 кДа. Конечно, следует понимать, что одно антитело может иметь немного или несколько отличающуюся молекулярную массу, чем другое антитело той же общей структуры и изотипа, например, вследствие по меньшей мере частичных различий в соответствующих аминокислотных последовательностях.

В качестве другого неограничивающего примера, молекула антитела может иметь молекулярную массу от 140 до 160 кДа, а димер антитела, содержащий две молекулы антитела, может иметь молекулярную массу от 280 до 320 кДа. Димеры могут называться "высокомолекулярными видами" или "HMWS".

Присутствие димеров в композиции или образце, содержащем множество молекул антитела (и/или антигенсвязывающего фрагмента), может быть оценено с использованием, например, абсолютной эксклюзионной хроматографии (aSEC). Количество димера в композиции или образце может быть выражено как процент от общего количества молекул антитела или антигенсвязывающего фрагмента в композиции или образце, которые содержатся в виде димера. В качестве иллюстрации, для

композиции антитела, содержащей 12% димеров, 88% от общего количества молекул антитела в образце присутствуют в виде мономеров.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации изобретения в образце, содержащем множество антител или антигенсвязывающих фрагментов (т.е. множество антител или антигенсвязывающих фрагментов), менее 12%, 11% или менее, 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее или 2% или менее из указанного множества присутствует в виде димера, когда образец инкубировали в течение от около 120 до около 168 часов при около 40ºC, причем, необязательно, присутствие димера определяется абсолютной эксклюзионной хроматографией.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации изобретения инкубация множества раскрытых в настоящем документе антител или антигенсвязывающих фрагментов молекул приводит к уменьшению образования димеров по сравнению с инкубацией множества эталонных антител или антигенсвязывающих фрагментов молекул, при этом эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57, и при этом, необязательно, присутствие димера антитела определяется с помощью абсолютной эксклюзионной хроматографии. Такое эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, Fv, Fab) может образовывать димеры, которые в некоторых вариантах реализации в совокупности содержат более 2%, 3% или более, 4% или более, 5% или более, 6% или более, 7% или более, 8% или более, 9% или более, 10% или более, 11% или более или вплоть до 12% молекул антитела или антигенсвязывающих фрагментов в образце (например, при инкубации в течение от около 120 до около 168 часов при около 40ºC). Другими словами, в некоторых вариантах реализации изобретения вплоть до 12% или более эталонных молекул антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержатся в виде димера, в то время как меньший процент, предпочтительно 2% или менее, описанных в настоящем документе молекул антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержатся в виде димера.

В некоторых вариантах осуществления раскрытое в настоящем документе антитело или антигенсвязывающий фрагмент образует меньшее количество димера и/или образует димеры с пониженной частотой и/или в виде более низкого процента от общего

количества антитела или молекул антигенсвязывающего фрагмента в образце или композиции (например, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии) по сравнению с эталонным антителом: (i) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 4 °C; (ii) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 25 °C; и/или (iii) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 40 °C, причем эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления процентное содержание раскрытого антитела или антигенсвязывающего фрагмента в композиции, содержащегося в виде димера, составляет менее 4/5, менее 3/4, менее 1/2, менее 1/3, менее 1/4, менее 1/5, менее 1/6, менее 1/7, менее 1/8, менее 1/9 или менее 1/10 процентного содержания эталонных молекул антитела в композиции, которые присутствуют в виде димера, соответственно. В качестве неограничивающего примера, после 32-дневной (768-часовой) инкубации при 40 °C 22% или более молекул эталонного антитела в композиции могут содержаться в виде димера, в то время как 17% или менее, 16% или менее, 15% или менее, 14% или менее, 13% или менее, 12% или менее, 11% или менее, 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее, или 2% или менее молекул антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению в композиции содержатся в виде димера, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин (например, клетка CHO, такая как клетка ExpiCHO), трансфицированная полинуклеотидом, кодирующим описанное в настоящем документе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обеспечивает 1,5× или более, 2× или более, 3× или более, или 4× или более количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента, соответственно (например, измеренного в концентрации в мг/мл), чем эталонная клетка-хозяин, трансфицированная полинуклеотидом, кодирующим эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, причем эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 согласно SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления раскрытое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируются в трансфицированных клетках с более высоким титром по сравнению с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые продуцируются в эталонных трансфицированных клетках, где эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления раскрытое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент продуцируются в трансфицированных клетках при титрах по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза или по меньшей мере в 4 раза выше титра, при котором получают эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержат аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с HBsAg (например, подтипа adw) со значением EC50 (нг/мл) 3,5 или менее, около 3,2 или менее, менее 3,0, менее 2,5, менее 2,0, менее 1,5 или менее 1,0. В некоторых вариантах осуществления раскрытое антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с HBsAg (например, подтипа adw) с EC50 (нг/мл) менее 3,5, менее 3,4, менее 3,3, менее 3,2, менее 3,1, менее 3,0, менее 2,9, менее 2,8, менее 2,7, менее 2,6, менее 2,5, менее 2,4, менее 2,3, менее 2,1, менее 2,0, менее 1,9, менее 1,8, менее 1,7, менее 1,6, менее 1,5, менее 1,4, менее 1,3, менее 1,2, менее 1,1 или менее 1,0. В некоторых вариантах осуществления раскрытое антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с HBsAg (например, подтипа adw) с EC50 (нг/мл) от 0,9 до 2,0, или от 0,9 до 1,9, или от 0,9 до 1,8, или от 0,9 до 1,7, или от 0,9 до 1,6, или от 0,9 до 1,5, или от 0,9 до 1,4, или от 0,9 до 1,3, или от 0,9 до 1,2, или от 0,9 до 1,1, или от 0,9 до 1,0, или от 1,0 до 2,0. В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с HBsAg (например, подтипа

adw) со значением EC50 (нг/мл) 2,0 или менее. В некоторых вариантах реализации изобретения EC50 связывания определяют с помощью ELISA (например, прямого антигенсвязывающего анализа ELISA, причем кривые связывания определяют путем подгонки кривых с использованием Graphpad Prism).

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны нейтрализовать вирусную инфекцию гепатита B с EC50 нейтрализации инфекции менее 20 нг/мл, предпочтительно 15 нг/мл или менее, более предпочтительно 10 нг/мл или менее. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны нейтрализовать вирусную инфекцию гепатита B с EC50 нейтрализации инфекции 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 нг/мл. В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны нейтрализовать вирус гепатита B с EC50 нейтрализации инфекции, которая ниже, чем EC50 нейтрализации инфекции (при использовании того же анализа) эталонного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержат аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах реализации изобретения EC50 нейтрализации инфекции определяют после инкубации культивируемых клеток, например, дифференцированных клеток HepaRG, с фиксированным количеством HBV в присутствии или в отсутствие тестируемого антитела. В таком варианте осуществления инкубацию можно проводить, например, в течение 16 часов при 37°C. Инкубацию можно проводить в среде (например, с добавлением 4% ПЭГ 8000). После инкубации клетки можно промыть и дополнительно культивировать. Для измерения инфекционной способности вируса уровни поверхностного антигена гепатита B (HBsAg) и/или антигена e гепатита B (HBeAg), секретируемого в культуральный супернатант, например, с 7 по 11 день после инфицирования, могут быть определены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Уровни HBsAg и/или HBeAg из обработанных клеток можно сравнить с таковыми из необработанных клеток для определения наличия и степени нейтрализации.

"Fv" представляет собой небольшой фрагмент антитела, который содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий сайт. Этот фрагмент обычно состоит из димера одного домена вариабельной области тяжелой и одной легкой цепи в тесной

нековалентной ассоциации. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных к антигену) может обладать способностью распознавать и связывать антиген, хотя обычно с более низкой аффинностью, чем целый сайт связывания.

"Одноцепочечный Fv", также сокращенно "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены антител VH и VL, соединенные в одну полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления полипептид scFv содержит полипептидный линкер, расположенный между доменами VH и VL и связывающий их, что позволяет scFv сохранять или формировать желаемую структуру для связывания антигена. Такой пептидный линкер может быть включен в слитый полипептид с использованием стандартных методик, хорошо известных в данной области техники. Дополнительно или альтернативно Fv может иметь дисульфидную связь, образованную между VH и VL и стабилизирующую их. Обзор scFv см. в Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, содержащий домен VH, домен VL и пептидный линкер, связывающий домен VH с доменом VL. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, связанный с доменом VL пептидным линкером, который может находиться в ориентации VH-линкер-VL или в ориентации VL-линкер-VH. Любой scFv по настоящему изобретению может быть сконструирован таким образом, что C-концевой домен VL связан короткой пептидной последовательностью с N-концом домена VH или наоборот (т.е., (N)VL(C)-линкер-(N)VH(C) или (N)VH(C)-линкер-(N)VL(C). В качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления линкер может быть связан с N-концевой частью или концом домена VH, домена VL или обоими.

Последовательности пептидных линкеров могут быть выбраны, например, на основании: (1) их способности принять гибкую расширенную конформацию; (2) их неспособности или отсутствия способности принять вторичную структуру, которая могла бы взаимодействовать с функциональными эпитопами на первом и втором полипептидах и/или на молекуле-мишени; и/или (3) отсутствия или относительного отсутствия гидрофобных или заряженных остатков, которые могут реагировать с полипептидами и/или целевой молекулой. Другие соображения, касающиеся конструкции линкера (например, длина), могут включать конформацию или диапазон конформаций, в которых VH и VL могут образовывать функциональный антигенсвязывающий сайт. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидные линкерные последовательности содержат,

например, остатки Gly, Asn и Ser. Другие почти нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также могут быть включены в линкерную последовательность. Другие аминокислотные последовательности, которые могут быть использованы в качестве линкера, включая те, которые описаны в Maratea et al., Gene 40:39 46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986); патенте США № № 4935233 и патенте США № 4751180. Другие иллюстративные и неограничивающие примеры линкеров могут включать, например, линкеры, описанные Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066-1070 (1990), и Bird et al., Science 242:423-426 (1988)), и пентамер из четырех остатков глицина, связанных последовательно, при этом С-концевой глицин серии связан с одним серином, если он присутствует в одной итерации или повторяется от 1 до 5 или более раз, или более. Любой подходящий линкер может быть использован, и в целом может составлять около 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 15, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аминокислот в длину или менее чем около 200 аминокислот в длину, и предпочтительно содержать гибкую структуру (может обеспечивать гибкость и пространство для конформационного перемещения между двумя областями, доменами, мотивами, фрагментами или модулями, соединенными линкером) и предпочтительно являются биологически инертным и/или имеет низкий риск иммуногенности у человека.

scFv может быть сконструирован с использованием любой комбинации последовательностей VH и VL или любой комбинации последовательностей CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления линкерные последовательности не требуются; например, когда первый и второй полипептиды имеют несущественные N-концевые аминокислотные области, которые могут быть использованы для разделения функциональных доменов и предотвращения стерического влияния.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область легкой цепи (или ее часть или фрагмент), константную область тяжелой цепи (или ее часть или фрагмент) или и то, и другое. Термин "CL" относится к "константной области легкой цепи иммуноглобулина" или "константной области легкой цепи", т.е. константной области из легкой цепи антитела. Термин "CH" относится к "константной области тяжелой цепи иммуноглобулина" или "константной области тяжелой цепи", которая дополнительно делится в зависимости от изотипа антитела на CH1, CH2 и CH3 (IgA, IgD, IgG) или домены CH1, CH2, CH3 и CH4 (IgE, IgM). Fc-область тяжелой цепи антитела описана далее в настоящем документе. В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов

осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит любую одну или более из CL, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления CL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах реализации CH1-CH2-CH3 содержит аминокислотную последовательность, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73, или ее варианту, который содержит одну или более из следующих аминокислотных замен (нумерация EC): G236A; A330L; I332E; M428L; N434S. Фрагменты Fc описаны в другом месте настоящего документа.

Следует понимать, что, например, продукция в клеточной линии млекопитающих может удалять один или более C-концевых лизинов тяжелой цепи антитела (см., например, Liu et al. mAb 6(5): 1145-1154(2014)). Соответственно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может содержать тяжелую цепь, CH1-CH3, CH3 или полипептид Fc, где C-концевой остаток присутствует или отсутствует; другими словами, они охватывают варианты осуществления, в которых C-концевой остаток тяжелой цепи, CH1-CH3 или группа Fc не является лизином, и варианты осуществления, где лизин представляет собой C-концевой остаток. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество антител и/или антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, где одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов не содержит остаток лизина на C-конце тяжелой цепи, CH1-CH3 или группы Fc, и где одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов содержит остаток лизина на C-конце тяжелой цепи, CH1-CH3 или группы Fc.

"Fab" (антигенсвязывающий фрагмент) представляет собой часть антитела, которая связывается с антигенами и включает вариабельную область и CH1 тяжелой цепи, связанной с легкой цепью посредством межцепочечной дисульфидной связи. Каждый фрагмент Fab является одновалентным по отношению к связыванию антигена, то есть он имеет один антигенсвязывающий сайт. Обработка пепсином антитела дает один большой фрагмент F(ab')2, который примерно соответствует двум дисульфид-связанным Fab-фрагментам, обладающим двухвалентной антигенсвязывающей активностью и все еще способным к перекрестному связыванию антигена. Как Fab, так и F(ab’)2 являются примерами "антигенсвязывающих фрагментов". Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab наличием дополнительных нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH1, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH

в настоящем документе обозначает Fab', в котором остаток (остатки) цистеина константных доменов несут свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')2 антитела первоначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, имеющих между собой шарнирные цистеины. Известны также другие химические сочетания фрагментов антител. Fab-фрагменты могут быть соединены, например, с помощью пептидного линкера, с образованием одноцепочечного Fab, также называемого в настоящем документе "scFab". В этих вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь, которая присутствует в нативном Fab, может отсутствовать, и линкер полностью или частично служит для связывания или соединения фрагментов Fab в одной полипептидной цепи. Fab-фрагмент, полученный из тяжелой цепи (например, содержащий, состоящий из или состоящий по существу из VH + CH1 или "Fd") и Fab-фрагмент, полученный из легкой цепи (например, содержащий, состоящий из или состоящий по существу из VL + CL), могут быть связаны в любом расположении с образованием scFab. Например, scFab может быть расположен в направлении от N-конца к C-концу в соответствии с (Fab-фрагмент тяжелой цепи – линкер – Fab-фрагмент легкой цепи) или (Fab-фрагмент легкой цепи – линкер – Fab-фрагмент тяжелой цепи). Пептидные линкеры и примерные линкерные последовательности для применения в scFab более подробно обсуждаются в настоящем документе.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит человеческое антитело, моноклональное антитело, очищенное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab’, F(ab’)2, Fv или scFv.

Фрагменты антител, описанных в настоящем документе, 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 или легкой цепей. Настоящее изобретение охватывает одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), полученные из тяжелых и легких цепей антитела, как описано в настоящем документе, включая, например, scFv, содержащий CDR (и, необязательно, вариабельные области) из антитела согласно настоящему описанию, мономеры и димеры тяжелой или легкой цепи (т.е. димер VH-VL, димер HC-LC, димер HC-HC), однодоменные антитела на основе тяжелой цепи, однодоменные антитела на основе легкой цепи, а также одноцепочечные антитела, в которых вариабельные домены или области тяжелой и легкой цепи соединены пептидным линкером.

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

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут, в вариантах реализации изобретения, быть мультиспецифическими (например, биспецифическими, триспецифическими, тетраспецифическими или тому подобными) и могут быть представлены в любом мультиспецифическом формате, как описано в настоящем документе. В некоторых 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 в Brinkmann и Kontermann, mAb 9(2): 182-212 (2017), биспецифические форматы и способы их получения включены в настоящий документ посредством ссылки и включают, например, биспецифический Т-клеточный активатор (BiTE), DART (переориентирование с двойной аффинностью), сборки "выступ-во-впадину" (KIH), сборки scFv-CH3-KIH, KIH антител с общей легкой цепью, TandAbs (тандемные диатела), тройные тела, мини-тела TriBi, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab') 2-scFv2, четырехвалентные HCabs, интратела, CrossMabs, Fabs двойного действия (DAFs) (два в одном или четыре в одном), DutaMabs, DT-IgG, пары зарядов (Charge Pairs), Fab-arm Exchange (обмен плечами Fab), SEEDbodies, Triomabs, LUZ-Y сборки, Fcabs, κλ-тела, ортотела Fabs, DVD-IgGs, 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, and DVI-IgG (четыре в одном). Биспецифическое или мультиспецифическое антитело может содержать HBV- и/или HDV-специфический связывающий домен согласно настоящему изобретению в комбинации с другим HBV- и/или HDV-специфическим связывающим доменом согласно настоящему изобретению или в комбинации с другим связывающим доменом, который специфически связывается с HBV и/или HDV (например, в том же или другом эпитопе), или с связывающим доменом, который специфически связывается с другим антигеном.

Фрагменты антител согласно настоящему изобретению могут придавать моновалентные или поливалентные взаимодействия и содержаться в различных структурах, как описано выше. Например, молекулы scFv могут быть синтезированы для создания трехвалентного "тритела" или четырехвалентного "тетратела". Молекулы scFv могут включать домен Fc-области, что приводит к образованию двухвалентных миниантител. Кроме того, последовательности согласно настоящему изобретению могут

представлять собой компонент полиспецифических молекул, в которых последовательности согласно настоящему изобретению нацелены на эпитопы согласно настоящему изобретению, а другие области молекулы связываются с другими мишенями. Типовые молекулы включают, но не ограничиваются ими, биспецифический Fab2, триспецифический Fab3, биспецифический scFv и диатела (Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 9: 1126-1136).

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, такие как описанные в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь ими, scFv, могут, в некоторых вариантах реализации изобретения, содержаться в гибридном белке, который способен специфически связываться с антигеном, описанным в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин "слитый белок" относится к белку, который в одной цепи имеет по меньшей мере два различных домена или мотива, причем домены или мотивы не встречаются естественным образом вместе или в данном расположении в белке. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок, может быть сконструирован с использованием ПЦР, рекомбинантно сконструирован или тому подобное, или такие слитые белки могут быть синтезированы.

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

В некоторых вариантах реализации слитый белок, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержит молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), которая может быть экспрессирована на клеточной поверхности клетки-хозяина,

такой как Т-клетка, NK-клетка или NK-T-клетка, для применения в клеточной иммунотерапии. Молекулы CAR и принципы проектирования описаны, например: Sadelain et al., Cancer Discov., 3(4):388 (2013); Harris and Kranz, Trends Pharmacol. Sci., 37(3):220 (2016); Stone et al., Cancer Immunol. Immunother., 63(11):1163 (2014); Xu et al., 2018 Oncotarget 9:13991; Androulla et al., 2018 Curr. Pharm. Biotechnol. Том 19 (апрель 2018 г.); Wu et al., 2016 Expert Opin. Biol. Ther. 16:1469; и Ren et al., 2017 Protein Cell 8:634, где молекулы CAR, конструкции CAR и принципы проектирования CAR полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

В настоящем описании антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки по отдельности или вместе (например, в любой комбинации) могут называться "связывающими белками".

Связывающие белки согласно настоящему изобретению могут быть предложены в очищенной форме. Например, антитело может присутствовать в композиции, которая по существу не содержит других полипептидов, например, где менее 90% (по массе), обычно менее 60% и более обычно менее 50% композиции состоит из других полипептидов.

Связывающие белки согласно настоящему изобретению могут быть иммуногенными у человека и/или у нечеловеческих (или гетерологичных) хозяев; например, у мышей. Например, антитело может иметь идиотоп, который является иммуногенным у нечеловеческих хозяев, но не у человека-хозяина. Антитела согласно настоящему изобретению для применения у человека включают антитела, которые обычно не выделяют из хозяев, таких как мыши, козы, кролики, крысы, не являющиеся приматами млекопитающие или тому подобное, и в некоторых случаях не получают путем гуманизации или от ксено-мышей. Также в настоящем документе рассматриваются варианты форм описанных антител, которые сконструированы таким образом, чтобы уменьшить известную или потенциальную иммуногенность и/или другие потенциальные обязательства, или придать желаемую структуру и/или функциональность антителу у животного, не являющегося человеком, такого как мышь (например, "муринизированное" антитело, в котором один или более аминокислотных остатков, последовательностей или мотивов человека заменены остатком, последовательностью или мотивом, который снижает или отменяет иммуногенность или другую ответственность, или имеет желаемую структуру и/или функцию, у мыши; например, для модельных исследований с использованием мыши).

В данном контексте "нейтрализующее антитело" (или антигенсвязывающий фрагмент, или слитый белок) представляет собой антитело, которое может нейтрализовать, т.е. предотвращать, ингибировать, уменьшать, угнетать или

препятствовать способности патогена инициировать и/или поддерживать инфекцию в организме-хозяине (например, организме-хозяине или клетке-хозяине). Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Эти антитела могут быть использованы по отдельности или в комбинации (например, два или более из описанных в настоящем документе антител в комбинации или антитело по настоящему изобретению в комбинации с другим агентом, который может быть или не быть антителом, включая антитело, способное нейтрализовать инфекцию HBV B и/или HBV D) в качестве профилактических или терапевтических агентов при соответствующем составе, в сочетании с активной вакцинацией, в качестве диагностического инструмента или в качестве инструмента продукции, как описано в настоящем документе. Соответственно, описанные в настоящем документе антитела или антигенсвязывающие фрагменты способны нейтрализовать инфекцию, вызванную HBV, HDV или обоими.

В данном контексте "специфически связывается" или "специфично для" относится к ассоциации или объединению связывающего белка (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) или связывающего домена с молекулой-мишенью с аффинностью или Ka (т.е. равновесной константой ассоциации конкретного связывающего взаимодействия с единицами 1/M), равной или превышающей 10^5 M^{-1} (что равно отношению скорости [K_{on}] к скорости выключения [Koff] для этой реакции ассоциации), при этом существенно не связываясь или не объединяясь с любыми другими молекулами или компонентами в образце. Связывающие белки или связывающие домены могут быть классифицированы как "высокоаффинные" связывающие белки или связывающие домены или как "низкоаффинные" связывающие белки или связывающие домены. "Высокоаффинные" связывающие белки или связывающие домены относятся к тем связывающим белкам или связывающим доменам, которые имеют Ka 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 тем связывающим белкам или связывающим доменам, которые имеют Ka 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 (Kd) конкретного связывающего взаимодействия в единицах M (например, от 10^{-5} M до 10^{-13} M). Термины "связывание" и "специфическое связывание" и аналогичные ссылки не охватывают неспецифическое прилипание.

Связывание связывающего белка можно определить или оценить с помощью соответствующего анализа, такого как, например, способы поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например, система Biacore™; анализы кинетического исключения, такие как KinExA®; и интерферометрия BioLayer (например, с использованием платформы ForteBio® Octet); изотермическая титровальная калориметрия (ITC) или тому подобное, антигенсвязывающий ELISA (например, прямой или косвенный) с визуализацией, например, с помощью оптической плотности при 450 нм или с помощью проточной цитометрии или тому подобного.

В некоторых вариантах реализации связывающие белки согласно настоящему изобретению могут связываться с антигенной петлевой областью HBsAg. Оболочка вируса гепатита B обычно содержит три "белка оболочки HBV" (также известный как "HBsAg", "поверхностный антиген гепатита B"): белок S (для "малого", также называемый S-HBsAg), белок M (для "среднего", также называемый M-HBsAg) и белок L (для "большого", также называемый L-HBsAg). S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg имеют один и тот же C-конец (также называемый "S-доменом", 226 аминокислот), который соответствует S-белку (S-HBsAg) и который имеет решающее значение для сборки вируса и инфекционной способности. S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), собираются и секретируются в виде частиц посредством аппарата Гольджи. S-домен содержит четыре прогнозируемых трансмембранных (TM) домена, в результате чего как N-конец, так и C-конец S-домена экспонированы в просвет. Оба трансмембранных домена TM1 и TM2 считаются необходимыми для интеграции котрансляционного белка в мембрану ER, а трансмембранные домены TM3 и TM4 расположены в C-концевой трети S-домена. "Антигенная петлевая область" HBsAg расположена между прогнозируемыми трансмембранными доменами TM3 и TM4 S-домена HBsAg, при этом антигенная петлевая область содержит аминокислоты 101-172 S-домена, который содержит в общей сложности 226 аминокислот (Salisse J. and Sureau C., 2009, Journal of Virology 83: 9321-9328). Детерминанта инфекционности находится в антигенной петлевой области белков оболочки HBV. В частности, остатки между 119 и 125 HBsAg содержат мотив CXXC, который считается важным для инфекционности HBV и HDV (Jaoude GA, Sureau C, Journal of Virology, 2005;79:10460–6).

Когда положения в аминокислотной последовательности S-домена HbsAg упоминаются в настоящем документе, такие положения сделаны со ссылкой на аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 (показана ниже), или на ее природные или искусственные варианты последовательности.

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSP TSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTG PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVP FVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI

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

Например, выражение "аминокислоты 101-172 домена S" относится к аминокислотным остаткам из положений 101-172 полипептида согласно SEQ ID NO: 3. Однако специалисту в данной области техники понятно, что мутации или вариации (включая, но не ограничиваясь этим, замену, делецию и/или вставку, например, HBsAg другого генотипа или другого мутанта HBsAg, как описано в настоящем документе) могут встречаться естественным образом в аминокислотной последовательности S-домена HBsAg или могут быть введены искусственно в аминокислотную последовательность S-домена HBsAg без влияния на его биологические свойства. Следовательно, как используется в настоящем документе, 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 фрагменты последовательности S-домена HBsAg описаны в настоящем документе (например, аминокислоты 101-172 или аминокислоты 120-130 S-домена HBsAg), они включают не только соответствующие фрагменты последовательности SEQ ID NO: 3, но и соответствующие фрагменты последовательности его природных или искусственных мутантов. Например, фраза "аминокислотные остатки из положений 101-172 S-домена HBsAg" охватывает аминокислотные остатки из положений 101-172 SEQ ID NO: 3 и соответствующие фрагменты его мутантов (природных или искусственных мутантов). В данном контексте фразы "соответствующие фрагменты последовательностей" и "соответствующие фрагменты" относятся к фрагментам, которые расположены в равных положениях последовательностей, когда последовательности подвергаются оптимизированному выравниванию, а именно, последовательности выравниваются для получения наивысшего процента идентичности.

M-белок (M-HBsAg) соответствует S-белку, расширенному N-концевым доменом из 55 аминокислот, называемым "pre-S2". L-белок (L-HBsAg) соответствует M-белку, расширенному N-концевым доменом из 108 аминокислот, называемым "pre-S1" (генотип D). Домены pre-S1 и pre-S2 L-белка могут присутствовать либо на внутренней поверхности вирусных частиц (на цитоплазматической стороне ER (эндоплазматического ретикулума)) и, как полагают, играют решающую роль в сборке вируса, либо на внешней стороне (на внутренней стороне ER), доступной для взаимодействия с клетками-

мишенями и важной для вирусной инфекционности. Кроме того, поверхностные белки HBV (HBsAgs) не только включены в оболочки вириона, но также могут спонтанно зарождаться из мембран промежуточного компартмента ER-Гольджи с образованием пустых "субвирусных частиц" (SVP), которые высвобождаются из клетки путем секреции.

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок связывается с антигенной петлевой областью HBsAg и способен связываться со всеми S-HBsAg, M-HBsAg и L-HBsAg.

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок нейтрализует инфекцию вируса гепатита B и вируса гепатита дельта. В некоторых вариантах реализации связывающий белок снижает инфекционность вируса гепатита B и вируса гепатита дельта.

Для изучения и количественного определения инфекционности вируса (или "нейтрализации") в лаборатории можно использовать стандартные "анализы нейтрализации". Для анализа нейтрализации вирусы животных обычно размножаются в клетках и/или клеточных линиях. Можно использовать анализ нейтрализации, в котором культивированные клетки инкубируют с фиксированным количеством HBV или HDV в присутствии (или в отсутствие) тестируемого антитела (или антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка). В таком анализе можно использовать уровни поверхностного антигена гепатита B (HBsAg) или антигена e гепатита B (HBeAg), секретируемого в супернатант клеточной культуры, и/или можно оценить окрашивание HBcAg для обеспечения считывания. Например, для HDV можно оценить иммунофлуоресцентное окрашивание дельта-антигена.

В конкретном варианте осуществления анализа нейтрализации HBV культивируемые клетки, например клетки HepaRG, такие как дифференцированные клетки HepaRG, инкубируют с фиксированным количеством HBV в присутствии или в отсутствие тестируемого антитела. В таком варианте осуществления инкубацию можно проводить, например, в течение 16 часов при 37°C. Инкубацию можно проводить в среде (например, с добавлением 4% ПЭГ 8000). После инкубации клетки можно промыть и дополнительно культивировать. Для измерения инфекционной способности вируса уровни поверхностного антигена гепатита B (HBsAg) и/или антигена e гепатита B (HBeAg), секретируемого в культуральный супернатант, например, с 7 по 11 день после инфицирования, могут быть определены с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Кроме того, окрашивание HBcAg можно оценить в иммунофлуоресцентном анализе. В варианте реализации анализа нейтрализации HDV может быть использован по существу тот же анализ, что и для HBV, с тем отличием, что сыворотки от носителей HDV

могут быть использованы в качестве посевного материала для HDV-инфекции на дифференцированных клетках HepaRg (вместо HBV). Для детектирования в качестве показаний можно использовать иммунофлуоресцентное окрашивание дельта-антигена.

Варианты реализации связывающих белков согласно настоящему изобретению обладают высокой нейтрализующей активностью. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация антитела, как описано в настоящем документе, необходимая для 50% нейтрализации вируса гепатита B (HBV) и вируса гепатита дельта (HDV), составляет, например, около 10 мкг/мл или менее. В других вариантах реализации изобретения концентрация связывающего белка, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет около 5 мкг/мл. В других вариантах реализации изобретения концентрация связывающего белка, как описано в настоящем документе, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет около 1 мкг/мл. В других вариантах реализации изобретения концентрация связывающего белка, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет около 750 нг/мл. В дополнительных вариантах реализации изобретения концентрация связывающего белка, как описано в настоящем документе, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, составляет 500 нг/мл или менее. В таких вариантах осуществления концентрация связывающего белка, как описано в настоящем документе, необходимая для 50% нейтрализации HBV и HDV, может быть выбрана из 450 нг/мл или менее, 400 нг/мл или менее, 350 нг/мл или менее, 300 нг/мл или менее, 250 нг/мл или менее, 200 нг/мл или менее, 175 нг/мл или менее, 150 нг/мл или менее, 125 нг/мл или менее, 100 нг/мл или менее, 90 нг/мл или менее, 80 нг/мл или менее, 70 нг/мл или менее, 60 нг/мл или менее, 50 нг/мл или менее, или менее 20 нг/мл, предпочтительно 15 нг/мл или менее, более предпочтительно 10 нг/мл или менее, например 7 нг/мл или менее.

Связывающие белки согласно настоящему изобретению, которые могут нейтрализовать как HBV, так и HDV, пригодны для профилактики и лечения гепатита B и гепатита D. Инфекция HDV обычно происходит одновременно с или после инфицирования HBV (например, инокуляция HDV в отсутствие HBV не вызывает гепатит D, поскольку HDV требует поддержки HBV для собственной репликации), а гепатит D обычно наблюдается у хронических носителей HBV.

Варианты реализации описанных связывающих белков способствуют клиренсу HBsAg и HBV. В конкретных вариантах реализации связывающие белки способствуют клиренсу как HBV, так и субвирусных частиц вируса гепатита B (SVP). Клиренс HBsAg или субвирусных частиц можно оценить путем измерения уровня HBsAg, например, в образце крови, например, у пациента с гепатитом B. Аналогичным образом, клиренс HBV

может быть оценен путем измерения уровня HBV, например, в образце крови, например, у пациента с гепатитом B.

В сыворотке пациентов, инфицированных HBV, помимо инфекционных частиц (HBV), обычно имеется избыток (обычно в 1000-100000 раз) пустых субвирусных частиц (SVP), состоящих исключительно из белков оболочки HBV (HBsAg) в виде относительно небольших сфер и нитей различной длины. Было показано, что субвирусные частицы сильно усиливают внутриклеточную вирусную репликацию и экспрессию генов HBV (Bruns M. et al. 1998 J Virol 72(2): 1462–1468). Это также актуально в контексте инфекционности сывороток, содержащих HBV, поскольку инфекционность зависит не только от количества вирусов, но и от количества SVP (Bruns M. et al. 1998 J Virol 72(2): 1462–1468). Кроме того, избыток субвирусных частиц может служить приманкой, поглощая нейтрализующие антитела и, следовательно, задерживая клиренс инфекции. Достижение отсутствия поверхностного антигена гепатита B (HBsAg) считается в некоторых случаях идеальной конечной точкой лечения и ближайшим исходом для лечения хронического гепатита B (CHB).

Варианты реализации связывающих белков согласно настоящему изобретению могут способствовать клиренсу HbsAg. В некоторых вариантах реализации связывающие белки могут способствовать клиренсу субвирусных частиц вируса гепатита B. В некоторых вариантах реализации изобретения связывающие белки могут быть использованы для лечения хронического гепатита B.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению способен связывать HBsAg генотипа, выбранного из генотипов A, B, C, D, E, F, G, H, I и J HBsAg, или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления связывающие белки по настоящему изобретению способны связываться с любыми 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 генотипами HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J. Примеры различных генотипов HBsAg включают следующее: номер GenBank J02203 (HBV-D, ayw3); номер GenBank FJ899792.1 (HBV-D, adw2); номер GenBank AM282986 (HBV-A); номер GenBank D23678 (HBV-B1, Япония); номер GenBank AB117758 (HBV-C1 Камбоджа); номер GenBank AB205192 (HBV-E, Гана); номер GenBank X69798 (HBV-F4, Бразилия); номер GenBank AF160501 (HBV-G USA); номер GenBank AY090454 (HBV-H Никарагуа); номер GenBank AF241409 (HBV-I, Вьетнам); и номер GenBank AB486012 (HBV-J Борнео). Типовые аминокислотные последовательности антигенной петлевой области S-домена HBsAg различных генотипов описаны в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 5-15).

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

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок согласно настоящему изобретению способен связываться с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 мутантами HBsAg, имеющими мутации в антигенной петлевой области, причем такой мутант(ы) выбран(ы) из одного или более 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 являются встречающимися в природе мутантами на основе S-домена HBsAg генотипа D, номер Genbank FJ899792 (SEQ ID NO: 4). Мутированные аминокислотные остатки в каждом из мутантов, указанных в настоящем документе, указаны в названии мутанта.

SEQ ID NO: 4

MENVTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQS PTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDY<u>QGMLPVCPLIPGSSTTGT GPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW</u>LSLLVP FVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCLWVYI

(антигенная петлевая область, т.е. аминокислоты 101-172 подчеркнуты).

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

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок, описанный в настоящем документе, способен связываться с одним или более, а в некоторых случаях с по меньшей мере 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 реализации изобретения связывающий белок способен связываться с по меньшей мере 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 реализации изобретения связывающий белок способен связываться 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 некоторых вариантах реализации связывающий белок (например, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) способен снижать сывороточную концентрацию ДНК HBV у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В некоторых вариантах реализации связывающий белок способен снижать сывороточную концентрацию HBsAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В некоторых вариантах реализации связывающий белок способен снижать сывороточную концентрацию HBeAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В некоторых вариантах реализации связывающий белок способен снижать сывороточную концентрацию HBcrAg у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV. В некоторых вариантах реализации связывающий белок способен снижать концентрацию ДНК HBV, HBsAg, HBeAg и/или HBcrAg в сыворотке у млекопитающего в течение примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней после однократного введения связывающего белка.

Термин "эпитоп" или "антигенный эпитоп" включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или детерминанту белка, которая распознается и специфически связывается родственной связывающей молекулой, такой как иммуноглобулин, или другой связывающей молекулой, доменом или белком. Эпитопные детерминанты обычно содержат химически активные поверхностные группы молекул, такие как боковые цепи аминокислот или сахаров, и обычно обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими характеристиками заряда.

В некоторых вариантах реализации связывающий белок способен связываться с эпитопом, содержащим по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере

три или по меньшей мере четыре аминокислоты антигенной петлевой области HbsAg. В некоторых вариантах реализации связывающий белок способен связывать по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из аминокислот 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. В некоторых вариантах реализации связывающий белок способен связывать по меньшей мере три аминокислоты, выбранные из аминокислот 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. В некоторых вариантах реализации связывающий белок способен связывать по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из аминокислот 115-133 S-домена HbsAg, аминокислот 120-133 S-домена HbsAg или аминокислот 120-130 S-домена HbsAg. В данном контексте 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, при этом S-HBsAg обычно соответствует S-домену HBsAg.

Термин "образованный", как используется в настоящем документе в контексте эпитопа, означает, что эпитоп, с которым связывается связывающий белок, может быть линейным (непрерывным) или конформационным (прерывистым). Линейный или непрерывный эпитоп представляет собой эпитоп, который распознается антителом в соответствии с его линейной последовательностью аминокислот или первичной структурой. Конформационный эпитоп может быть распознан в соответствии с трехмерной формой и структурой белка. Соответственно, если эпитоп представляет собой линейный эпитоп и содержит более одной аминокислоты, расположенной в положениях, выбранных из аминокислотных положений 115-133 или из аминокислотных положений 120-133 S-домена HBsAg, аминокислоты, содержащиеся в эпитопе, могут быть расположены в смежных положениях первичной структуры (например, являются последовательными аминокислотами в аминокислотной последовательности). В случае конформационного эпитопа (3D-структура) аминокислотная последовательность обычно образует 3D-структуру в виде эпитопа, и, таким образом, аминокислоты, образующие эпитоп, могут быть или не быть расположены в смежных положениях первичной структуры (т.е. могут быть или не быть последовательными аминокислотами в аминокислотной последовательности).

В некоторых вариантах реализации изобретения эпитоп, с которым связывающий белок связывается с конформационным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере две аминокислоты антигенной петлевой области HBsAg, причем по меньшей мере две

аминокислоты выбраны из аминокислот 120-133 или из аминокислот 120-130 S-домена HbsAg, и при этом по меньшей мере две аминокислоты не расположены в смежных положениях (первичной структуры). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере три аминокислоты антигенной петлевой области HBsAg, причем по меньшей мере три аминокислоты выбраны из аминокислот 120-133 или из аминокислот 120-130 S-домена HbsAg, и при этом по меньшей мере две из трех аминокислот не расположены в смежных положениях (первичной структуры). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере четыре аминокислоты антигенной петлевой области HBsAg, причем по меньшей мере четыре аминокислоты выбраны из аминокислот 120-133 или из аминокислот 120-130 S-домена HbsAg, и при этом по меньшей мере две из четырех аминокислот не расположены в смежных положениях (первичной структуры).

Аминокислоты, с которыми связывается описанное в настоящем документе антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок (т.е. аминокислоты, образующие эпитоп), которые не расположены в смежных положениях первичной структуры, в некоторых случаях отделены друг от друга одной или более аминокислотами, с которыми антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок не связываются. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять аминокислот могут быть расположены между двумя аминокислотами, не расположенных в смежных положениях, содержащихся в эпитопе.

В некоторых вариантах реализации связывающий белок связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере аминокислоты P120, C121, R122 и C124 S-домена HBsAg. В других вариантах реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 115:

PCRXC,

где X представляет собой любую аминокислоту или не представляет собой аминокислоту; 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 реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 107:

TGPCRTC,

или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 107.

В других вариантах реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 112:

STTSTGPCRTC,

или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 112.

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

GNCTCIP (SEQ ID NO: 108).

В других вариантах реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 107 и аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 108.

В других вариантах реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 112 и/или аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 114.

Как описано выше, эпитоп, с которым связывается связывающий белок согласно настоящему изобретению, может быть линейным (непрерывным) или конформационным (прерывистым). В некоторых вариантах реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с конформационным эпитопом, и в некоторых таких вариантах реализации конформационный эпитоп присутствует только в невосстанавливающих условиях.

В некоторых вариантах реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с линейным эпитопом. В некоторых таких вариантах реализации линейный эпитоп присутствует как в невосстанавливающих условиях, так и в восстанавливающих условиях.

В конкретных вариантах реализации связывающий белок согласно 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_6A X_7G,

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

В конкретных вариантах реализации изобретения X_1 SEQ ID NO: 1 X_1 представляет собой малую аминокислоту. "Малая" аминокислота, как используется в настоящем документе, относится к любой аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, цистеина, глицина, пролина, серина, треонина и валина. В некоторых таких вариантах реализации изобретения X_1 представляет собой пролин, серин или треонин.

В некоторых вариантах реализации изобретения X_2 SEQ ID NO: 1 X_2 представляет собой малую аминокислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения X_2 может быть выбран из цистеина или треонина.

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

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

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

В некоторых вариантах реализации изобретения X_6 с SEQ ID NO: 1 X_6 представляет собой малую аминокислоту и/или гидрофобную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения X_6 выбран из треонина, пролина или лейцина.

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

В некоторых вариантах реализации 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_6A X_7G,

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).

Относительно эпитопов, образованных аминокислотными последовательностями согласно SEQ ID NO: 1 или 2, следует отметить, что термин "образованный" в данном контексте не подразумевает, что описанный связывающий белок обязательно связывается со всеми без исключения аминокислотами SEQ ID NO: 1 или 2. В частности, связывающий белок может связываться только с некоторыми аминокислотами SEQ ID NO: 1 или 2, в результате чего другие аминокислотные остатки могут действовать как "спейсеры".

В конкретных вариантах реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с эпитопом в антигенной петле HBsAg, образованным одной или более, двумя или более, тремя или более или четырьмя или более аминокислотами аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 5-33, показанных ниже в Таблице 4.

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с антигенной петлевой областью HBsAg, имеющей аминокислотную последовательность согласно любой одной или более из SEQ ID NO: 5-33, показанных ниже в Таблице 4, или с ее вариантом последовательности. В некоторых вариантах реализации связывающий белок 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 4.

Таблица 4: Аминокислотные последовательности антигенной петлевой области 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, используемых в настоящем документе.

Название	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
J02203 (D, ayw3)	5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPS CCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
FJ899792 (D, adw2)	6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGT SMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFL WEWASARFSW
AM282986 (A)	7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSW
D23678 (B1)	8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSC CCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSW
AB117758 (C1)	9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFSW
AB205192 (E)	10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMFPSC CCSKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
X69798 (F4)	11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPS CCCSKPSDGNCTCIPIPSSWALGKYLWEWASARFSW
AF160501 (G)	12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSW
AY090454 (H)	13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPS CCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKYLWEWASARFSW
AF241409 (I)	14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASARFSW

Название	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
AB486012 (J)	15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCTITAQGTSMFPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKFLWEWASVRFSW
HBsAg Y100C/P120T	16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPS CCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P120T	17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P120T/S143L	18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPLDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg C121S	19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg R122D	20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg R122I	21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg T123N	22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMYPS CCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg Q129H	23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg Q129L	24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133H	25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSHYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133L	26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSLYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133T	27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSTYPSC CCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg K141E	28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTEPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P142S	29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKSSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg S143K	30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPKDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW

Название	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
HBsAg D144A	31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSAGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg G145R	32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDRNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg N146A	33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGACTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW

Fc-фрагмент

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) согласно настоящему изобретению содержит Fc-фрагмент (также называемый полипептидом Fc). В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент может быть человеческого происхождения, например, из IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4 человека, или из другого класса или изотипа Ig. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать Fc-фрагмент, полученный из IgG1 человека. В конкретных вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент содержит или получен из (например, содержит одну или более мутаций относительно) аллотипа IgG1m17, 1 (IgHG1*01).

В данном контексте термин "Fc-фрагмент" относится к последовательности, содержащей, состоящей из, состоящей по существу из или полученной из части тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирной области непосредственно перед сайтом расщепления папаином (например, остаток 216 путем нумерации EC в нативном IgG, принимая, что первый остаток константной области тяжелой цепи равен 114) и заканчивающейся на C-конце тяжелой цепи иммуноглобулина. Соответственно, Fc-фрагмент может представлять собой полный Fc-фрагмент или его часть (например, домен). В некоторых вариантах реализации изобретения полный Fc-фрагмент содержит шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 (например, положения 216-446 аминокислот EU). Как отмечено в настоящем документе, дополнительный остаток лизина (K) иногда присутствует на крайнем C-конце Fc-фрагмента, но часто отщепляется от зрелого антитела. Положения аминокислот в Fc-фрагменте были пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU 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-фрагмента также могут быть пронумерованы в

соответствии с системой нумерации IMGT (включая уникальную нумерацию для нумерации С-домена и экзонов) и системой нумерации Kabat.

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент содержит по меньшей мере одно из: шарнирного (например, верхнего, среднего и/или нижнего шарнирного участка) домена, домена CH2, домена CH3 или его варианта, части или фрагмента. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент содержит по меньшей мере шарнирный домен, домен CH2 или домен CH3. В дополнительных вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент представляет собой полный Fc-фрагмент. Аминокислотная последовательность типового Fc-фрагмента изотипа IgG1 человека представлена в SEQ ID NO: 73. Fc-фрагмент также может содержать одну или более аминокислотных вставок, делеций или замен относительно встречающегося в природе Fc-фрагмента. Например, по меньшей мере один из шарнирного домена, домена CH2 или домена CH3 или его части может быть удален. Например, Fc-фрагмент может содержать или состоять из: (i) шарнирного домена (или его части), слитого с доменом CH2 (или его частью), (ii) шарнирного домена (или его части), слитого с доменом CH3 (или его частью), (iii) домена CH2 (или его части), слитого с доменом CH3 (или его частью), (iv) шарнирного домена (или его части), (v) домена CH2 (или его части) или (vi) домена CH3 или его части.

Fc-фрагмент согласно настоящему изобретению может быть модифицирован таким образом, что он изменяется по аминокислотной последовательности от полного Fc-фрагмента встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина, сохраняя или усиливая по меньшей мере одну желательную функцию, предоставляемую встречающейся в природе Fc-фрагментом, и/или уменьшая нежелательную функцию встречающейся в природе Fc-фрагмента. Такие функции включают, например, связывание с Fc-рецептором (FcR), модуляцию периода полужизни антитела (например, путем связывания с FcRn), функцию ADCC, связывание с белком A, связывание с белком G и связывание с комплементом. Части встречающихся в природе фрагментов Fc, которые участвуют в таких функциях, были описаны в данной области техники.

Например, для активации каскада комплемента белковый комплекс C1q может связываться по меньшей мере с двумя молекулами IgG1 или одной молекулой IgM, когда молекула(ы) иммуноглобулина присоединена(ы) к антигенной мишени (Ward, E. S., and Ghetie, V., Ther. Immunol. 2 (1995) 77-94). Burton, D. R., раскрыл (Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206), при этом область тяжелой цепи, содержащая аминокислотные остатки в положении 318-337, участвует в фиксации комплемента. Duncan, A. R., и Winter, G. (Nature 332 (1988) 738-740), используя сайт-специфический мутагенез, сообщили, что

Glu318, Lys320 и Lys322 образуют сайт связывания с C1q. Роль остатков Glu318, Lys320 и Lys 322 в связывании C1q была подтверждена способностью короткого синтетического пептида, содержащего эти остатки, ингибировать опосредованный комплементом лизис.

Например, связывание FcR может быть опосредовано взаимодействием Fc-фрагмента (антитела) с Fc-рецепторами (FcR), которые представляют собой специализированные рецепторы клеточной поверхности на клетках, включая гемопоэтические клетки. Fc-рецепторы принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов и, как показано, опосредуют как удаление патогенов, покрытых антителами, путем фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC; Van de Winkel, J. G., and Anderson, C. L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524). FcR определяются по их специфичности в отношении классов иммуноглобулинов; Fc-рецепторы для антител IgG называются FcγR, для IgE - FcεR, для IgA - FcαR и так далее, а неонатальные Fc-рецепторы называются FcRn. Связывание с Fc-рецептором 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.

Перекрестное сшивание рецепторов Fc-доменом нативных антител IgG (FcγR) запускает широкий спектр эффекторных функций, включая фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность и высвобождение воспалительных медиаторов, а также клиренс иммунного комплекса и регуляцию продукции антител. В настоящем документе рассматриваются Fc-фрагменты, обеспечивающие перекрестное сшивание рецепторов (например, FcγR). У человека к настоящему времени были охарактеризованы 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 комплексный IgG со средним или низким сродством, широко экспрессируется, в частности, на лейкоцитах, который, как полагают, является центральным игроком в опосредованном антителом иммунитете, и который может быть разделен на FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIC, которые выполняют различные функции в иммунной системе, но связываются с подобной низкой аффиностью с IgG-Fc, и эктодомены этих рецепторов являются высоко гомологичными; и (iii) FcγRIII (CD16), который связывает IgG со средним или низким сродством и был обнаружен в двух формах: FcγRIIIA, который был обнаружен на NK-клетках, макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и Т-клетках,

и, как полагают, опосредует ADCC и FcγRIIIB, который высоко экспрессируется на нейтрофилах.

FcγRIIA обнаружен во многих клетках, участвующих в уничтожении (например, макрофагах, моноцитах, нейтрофилах), и, по-видимому, способен активировать процесс уничтожения. FcγRIIB, по-видимому, играет роль в ингибирующих процессах и обнаруживается на B-клетках, макрофагах и на тучных клетках и эозинофилах. Важно отметить, что 75 % всех FcγRIIB обнаружено в печени (Ganesan, L. P. et al., 2012: "FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes," Journal of Immunology 189: 4981–4988). FcγRIIB обильно экспрессируется на синусоидальном эндотелии печени, называемом LSEC, и в клетках Купфера в печени, и LSEC являются основным местом клиренса малых 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 данном документе, и их антигенсвязывающие фрагменты содержат Fc-фрагмент для связывания с FcγRIIb, в частности, область Fc, такую как, например, антитела IgG-типа. Кроме того, можно сконструировать Fc-фрагмент для усиления связывания FcγRIIB путем введения мутаций S267E и L328F, как описано Chu, S.Y. и др., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcgammaRIIb with Fc-engineered antibodies. Molecular Immunology 45, 3926–3933. Таким образом, клиренс иммунных комплексов может быть увеличен (Chu, S., и др., 2014: Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xmab7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor FcγRIIb. Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts). В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты содержат сконструированный Fc-фрагмент с мутациями S267E и L328F, в частности, как описано в Chu, S.Y. и др., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcgammaRIIb with Fc-edineered antibodies. Molecular Immunology 45, 3926–3933.

На B-клетках FcγRIIB по-видимому может функционировать для подавления дальнейшей продукции иммуноглобулина и переключения изотипа на, например, класс IgE. Считается, что на макрофагах FcγRIIB ингибирует фагоцитоз, опосредованный через FcγRIIA. На эозинофилах и тучных клетках B-форма может способствовать подавлению активации этих клеток посредством связывания IgE с отдельным рецептором.

Что касается связывания FcγRI, модификация в нативном IgG по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329 может снижать связывание с FcγRI. Остатки IgG2 в положениях 233-236, замещенные в соответствующие положения IgG1 и IgG4, снижают связывание IgG1 и IgG4 с FcγRI в 10^3 раза и устраняют моноцитарный ответ человека на сенсибилизированные антителами эритроциты (Armour, K. L., et al. Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624).

Что касается связывания FcγRII, то обнаружено снижение связывания с FcγRIIA, например, при мутации IgG по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 и K414.

Двумя аллельными формами FcγRIIA человека являются вариант "H131", который связывается с Fc IgG1 с высокой аффинностью, и вариант "R131", который связывается с Fc IgG1 с низкой аффинностью. См., например, Bruhns и др., Blood 113:3716-3725 (2009).

Что касается связывания FcγRIII, то обнаружено снижение связывания с FcγRIIIA, например, при мутации по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 и D376. Картирование сайтов связывания на IgG1 человека для Fc-рецепторов, вышеупомянутые сайты мутации и способы измерения связывания с FcγRI и FcγRIIA описаны в Shields, R. L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604.

Двумя аллельными формами FcγRIIIA человека являются вариант "F158", который связывается с Fc IgG1 с низкой аффинностью, и вариант "V158", который связывается с Fc IgG1 с высокой аффинностью. См., например, Bruhns и др., Blood 113:3716-3725 (2009).

Что касается связывания с FcγRII, то две области нативного Fc IgG, по-видимому, участвуют во взаимодействии между FcγRII и IgG, а именно (i) нижний шарнирный сайт Fc IgG, в частности, аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, нумерация EU), и (ii) смежная область домена CH2 Fc IgG, в частности, петля и цепи в верхнем домене CH2, прилегающие к нижней шарнирной области, например, в области P331 (Wines, B.D., и др., J. Immunol. 2000; 164: 5313-5318). Кроме того, FcγRI, по-видимому, связывается с одним и тем же сайтом на Fc IgG, тогда как FcRn и белок A связываются с другим сайтом на Fc IgG, который, по-видимому, находится на границе раздела CH2-CH3 (Wines, B.D., и др., J. Immunol. 2000; 164: 5313-5318).

Также рассматриваются мутации, которые увеличивают аффинность связывания Fc-фрагмента согласно настоящему изобретению с (т.е. одним или более) рецептором Fcγ (например, по сравнению с эталонным Fc-фрагментом или антителом, содержащим то же самое, которые не содержат мутацию (мутации)). См., например, Delillo and Ravetch, Cell

161(5):1035-1045 (2015) и Ahmed et al., J. Struc. Biol. 194(1):78 (2016), мутации Fc и методики их получения включены в настоящий документ посредством ссылки.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации связывающий белок может содержать (например, IgG1 или полученный из IgG1) Fc-фрагмент, содержащий мутацию, выбранную из (нумерация EU) G236A; S239D; A330L; и I332E; или комбинацию, содержащую любые два или более из того же; например, S239D/I332E; S239D/A330L/I332E; G236A/S239D/I332E; G236A/A330L/I332E (также упоминается в настоящем документе как "GAALIE"); или G236A/S239D/A330L/I332E. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент не содержит S239D. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент содержит нативный серин в положении 239.

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент может содержать или состоять из по меньшей мере части Fc-фрагмента, который участвует в связывании с FcRn-связыванием. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент содержит одну или более аминокислотных модификаций, которые улучшают аффинность связывания (например, усиливают связывание) с FcRn (например, при pH около 6,0) и, таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения продлевают период полувыведения in vivo молекулы, содержащей Fc-фрагмент (например, по сравнению с эталонным Fc-фрагментом или антителом, которое является таким же, но не содержит модификацию(модификации)). В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент содержит или получен от Fc IgG, и мутация, продлевающая период полувыведения, содержит любую одну или более из: M428L; N434S; N434H; N434A; N434S; M252Y; S254T; T256E; T250Q; P257I, Q311I; D376V; T307A; E380A (нумерация EU). В некоторых вариантах осуществления мутация, продлевающая период полувыведения, включает M428L/N434S (также называемая в данном документе "MLNS"). В некоторых вариантах осуществления мутация, продлевающая период полувыведения, включает M252Y/S254T/T256E. В некоторых вариантах осуществления мутация, продлевающая период полувыведения, содержит T250Q/M428L. В некоторых вариантах осуществления мутация, продлевающая период полувыведения, содержит P257I/Q311I. В некоторых вариантах осуществления мутация, продлевающая период полувыведения, содержит P257I/N434H. В некоторых вариантах осуществления мутация, продлевающая период полувыведения, содержит D376V/N434H. В некоторых вариантах осуществления мутация, продлевающая период полувыведения, включает T307A/E380A/N434A.

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок включает Fc-фрагмент, который содержит мутации по типу замены M428L/N434S. В некоторых

вариантах реализации изобретения связывающий белок включает Fc-фрагмент, который содержит мутации замены G236A/A330L/I332E. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит (например, IgG) Fc-фрагмент, который содержит мутацию G236A, мутацию A330L и мутацию I332E (GAALIE) и не содержит мутацию S239D (например, содержит нативный S в положении 239). В конкретных вариантах реализации связывающий белок содержит Fc-фрагмент, который содержит мутации по типу замены: M428L/N434S и G236A/A330L/I332E, и необязательно не содержит S239D (например, может содержать нативный S в положении 329). В некоторых вариантах реализации связывающий белок включает Fc-фрагмент, который содержит мутации по типу замены: M428L/N434S и G236A/S239D/A330L/I332E. В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения связывающий белок содержит мутации по типу замены в Fc-фрагменте, где мутации по типу замены состоят или состоят по существу из: M428L/N434S, G236A/S239D/A330L/I332E, или G236A/S239D/A330L/I332E/M428L/N434S.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации связывающий белок согласно настоящему изобретению включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE и обладающий усиленным связыванием с FcγRIIa человека и/или FcγRIIIa человека по сравнению с эталонным полипептидом (т.е. полипептидом, который может представлять собой связывающий белок, который включает Fc-фрагмент, который не содержит мутацию GAALIE).

В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид включает Fc-фрагмент, который представляет собой Fc-фрагмент дикого типа (например, того же изотипа) или представляет собой Fc-фрагмент, который содержит одну или более мутаций по типу замены (или вставки или делеции), при условии, что мутация по типу замены не является или не содержит GAALIE. В некоторых вариантах реализации эталонный полипептид не содержит мутации по типу замены, которая, как известно или как предполагается, влияет на связывание с FcγRIIa человека и/или с FcγRIIIa человека.

Связывание между полипептидами, такое как связывание между Fc-фрагментом (или связывающим белком, содержащим его) и рецептором Fcγ человека, таким как FcγRIIA человека, FcγRIIIA человека или Fc FcγRIIB человека, или белком комплемента, таким как C1q, может быть определено или обнаружено с использованием способов, известных в данной области техники. Например, анализ биослойной интерферометрии (BLI) может быть выполнен с использованием прибора Octet® RED96 (ForteBio, Фримонт, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя для определения связи и диссоциации в реальном времени между первым представляющим интерес

полипептидом (например, Fc-фрагментом, содержащим мутацию GAALIE) и вторым представляющим интерес полипептидом (например, FcγRIIA (H131), FcγRIIA (R131), FcγRIIIA (F158), FcγRIIIA (V158) или FcγRIIb), который захвачен на сенсорной подложке.

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок содержит Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и имеет усиленное связывание с FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (R131), FcγRIIIA человека (F158), FcγRIIIA человека (V158) или любой их комбинацией по сравнению с референсным полипептидом, который содержит Fc-фрагмент, который не содержит мутацию GAALIE. В некоторых вариантах реализации изобретения усиленное связывание определяется увеличением (например, одного или более из: более высокого пикового сигнала; большей скорости ассоциации; более медленной скорости диссоциации; большей площади под кривой) сдвига сигнала по сравнению с эталонным связывающим белком в анализе BLI. В некоторых вариантах реализации изобретения анализ BLI включает использование прибора Octet (R) RED96 (ForteBio, Fremont, California USA). В дополнительных вариантах реализации изобретения анализ BLI содержит меченый FcγR человека, захваченный на датчике анти-пента-меток и подвергающийся воздействию связывающего белка. В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок содержит Fab IgG, и анализ BLI дополнительно включает воздействие на захваченный FcγR человека связывающим белком в присутствии связывающего фрагмента к Fab IgG для перекрестного связывания связывающих белков через фрагмент Fab.

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок содержит Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и имеет усиленное связывание с FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (R131), FcγRIIIA человека (F158) и/или FcγRIIIA человека (V158) по сравнению с эталонным полипептидом, причем усиленное связывание может включать сдвиг сигнала (нанометры) в анализе BLI в 1,5, 2, 2,5, 3 или более раз, чем сдвиг сигнала, наблюдаемый с использованием эталонного связывающего белка.

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE и обладающий усиленным связыванием с FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (R131), FcγRIIIA человека (F158) и FcγRIIIA человека (V158) по сравнению с эталонным полипептидом.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE и обладающий сниженным связыванием с FcγRIIB человека по сравнению с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах реализации связывающий белок содержит Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и не связывается с FcγRIIB человека, как

определено, например, что определяется отсутствием статистически значимого сдвига сигнала по сравнению с исходным уровнем в анализе BLI.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE и имеющий сниженное связывание с C1q человека (белок комплемента) по сравнению с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок содержит Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и не связывается с C1q человека, что определяется отсутствием статистически значимого сдвига сигнала по сравнению с исходным уровнем в анализе BLI.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и активирует FcγRIIA человека, FcγRIIIA человека или и то, и другое в большей степени, чем эталонный полипептид (т.е. полипептид, который может представлять собой HBsAg-специфический связывающий белок, который включает Fc-фрагмент, который не содержит мутацию GAALIE). В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид включает Fc-фрагмент, который представляет собой Fc-фрагмент дикого типа или который содержит одну или более мутаций по типу замены, при условии, что мутация по типу замены не является GAALIE.

Активация FcγR человека может быть определена или обнаружена с использованием способов, известных в данной области техники. Например, хорошо валидированный коммерчески доступный анализ биорепортера включает инкубацию HBsAg-специфического связывающего белка с рекомбинантным HBsAg (Engerix B, GlaxoSmithKline) в присутствии эффекторных клеток Jurkat (Promega; кат. №: G9798), стабильно экспрессирующих (i) представляющий интерес FcγR и (ii) репортер люциферазы светлячков под контролем элемента ответа NFAT. Связывание Fc с экспрессируемым на поверхности клетки FcγR стимулирует NFAT-опосредованную экспрессию репортерного гена люциферазы. Затем измеряют люминесценцию с помощью люминометра (например, Bio-Tek) с использованием реагента для анализа люциферазы Bio-Glo-™ (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Активацию выражают как среднее значение относительных единиц люминесценции (RLU) на фоне путем применения следующей формулы: (RLU при концентрации [x] связывающего белка (например, mAbs) – RLU фона).

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, активирующую FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (R131), FcγRIIIA человека (F158) и/или FcγRIIIA человека (V158) в

большей степени, чем эталонный полипептид. В некоторых вариантах реализации изобретения большая степень активации относится к более высокой пиковой люминесценции и/или большей площади люминесценции под кривой, как определено с использованием анализа люминесцентного биорепортера, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок содержит Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и активирует FcγRIIA человека (H131), FcγRIIA человека (R131) и FcγRIIIA человека (F158) в большей степени, чем эталонный полипептид, при этом большая степень активации включает пик RLU, который в 1,5, 2, 2,5, 3 или более раз превышает пик RLU, наблюдаемый с использованием эталонного связывающего белка.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации связывающий белок включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, которая не активирует FcγRIIB человека, как определено отсутствием статистически значимого и/или измеряемого RLU в анализе люминесцентного биопортера, как описано выше.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации связывающий белок содержит Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и активирует естественную киллерную (NK) клетку человека в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный полипептид. В некоторых вариантах реализации изобретения активацию NK-клетки определяют с помощью экспрессии CD107a (например, с помощью проточной цитометрии). В некоторых вариантах осуществления NK-клетка содержит клетку, которая содержит гомозиготу V158/V158, гомозиготу F158/F158 или гетерозиготный генотип FcγRIIIa V158/F158.

Следует понимать, что любой связывающий белок, содержащий Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE согласно настоящему изобретению, может выполнять или обладать любым одним или более признаками, описанными в настоящем документе; например, усиленное связывание с человеческим FcγRIIA и/или человеческим FcγRIIIA по сравнению с эталонным полипептидом; сниженное связывание с человеческим FcγRIIB по сравнению с эталонным полипептидом (и/или отсутствие связывания с человеческим FcγRIIB); сниженное связывание с человеческим C1q по сравнению с эталонным полипептидом (и/или отсутствие связывания с человеческим C1q); активация FcγRIIA, человеческого FcγRIIIA или обоих в большей степени, чем эталонный полипептид; отсутствие активации человеческого FcγRIIB; и/или активация человеческой естественной киллерной (NK) клетки в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный полипептид (например, антитело, специфичное в отношении HBsAg и включающее Fc-фрагмент, который не содержит мутацию GAALIE).

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок по настоящему изобретению включает Fc-фрагмент, содержащий мутацию GAALIE, и: (i) обладает повышенным связыванием с человеческим FcγRIIA, человеческим FcγRIIIA или обоими по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, который не содержит G236A/A330L/I332E, где человеческий FcγRIIA необязательно представляет собой H131 или R131, и/или человеческий FcγRIIIA необязательно представляет собой F158 или V158; (ii) имеет пониженное связывание с человеческим FcγRIIB по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E; (iii) не связывается с человеческим FcγRIIB; (iv) имеет пониженное связывание с человеческим C1q по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E; (v) не связывается с человеческим C1q; (vi) активирует FcγRIIA, человеческий FcγRIIIA или оба в большей степени, чем эталонный полипептид, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E, где человеческий FcγRIIA необязательно представляет собой H131 или R131, и/или FcγRIIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158; (vii) не активирует человеческий FcγRIIB; (viii) активирует естественные клетки-киллеры (NK) человека в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный полипептид, который включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E, где эталонный полипептид необязательно представляет собой антитело, которое связывается с HBsAg, необязательно HBsAg (ix) способен связываться с вариантом HBsAg, содержащим HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A, или любую комбинацию из них; (x) имеет улучшенное связывание с вариантом HBsAg, содержащим HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A или любую их комбинацию по сравнению с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с HBsAg и включает Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E.

Альтернативно или дополнительно, Fc-фрагмент связывающего белка согласно настоящему изобретению может содержать по меньшей мере часть, известную в данной области техники, которая требуется для связывания белка A; и/или Fc-фрагмент антитела согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере часть молекулы Fc, известную в данной области техники, которая требуется для связывания белка G. В

некоторых вариантах реализации изобретения сохраненная функция включает клиренс HBsAg и HBVg. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент содержит по меньшей мере часть, известную в данной области техники, которая требуется для связывания FcγR. Как описано выше, Fc-фрагмент может, таким образом, по меньшей мере содержать (i) нижний шарнирный сайт нативного Fc IgG, в частности аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, нумерация EU), и (ii) смежную область CH2-домена нативного Fc IgG, в частности петлю и цепи в верхнем CH2-домене, прилегающие к нижней шарнирной области, например, в области P331, например, области по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот в верхнем CH2-домене нативного Fc IgG вокруг P331, например, между аминокислотами 320 и 340 (нумерация EU) нативного Fc IgG.

В некоторых вариантах реализации изобретения связывающий белок согласно настоящему изобретению содержит Fc-область. В данном контексте термин "Fc-область" относится к части иммуноглобулина, образованной двумя или более Fc-фрагментами тяжелых цепей антитела. Например, Fc-область может быть мономерной или "одноцепочечной" Fc-областью (т.е. scFc-областью). Одноцепочечные Fc-области состоят из Fc-фрагментов, связанных внутри одной полипептидной цепи (например, кодируемых одной смежной последовательностью нуклеиновой кислоты). Иллюстративные scFc-области описаны в WO 2008/143954 A2 и включены в настоящий документ посредством ссылки. Fc-область может представлять собой или содержать димерную Fc-область; следует понимать, что димерная Fc-область не является такой же, как нежелательный димер (например, антитело:антитело, антитело:антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий фрагмент:антигенсвязывающий фрагмент), такой как описан выше и проиллюстрирован, в одном варианте реализации изобретения, на Фигуре 7. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит димерную Fc-область, при этом продуцируется мало димеров, содержащих антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

"Димерная Fc-область" или "dcFc" относится к димеру, образованному Fc-фрагментами двух отдельных тяжелых цепей иммуноглобулина. Димерная Fc-область может представлять собой гомодимер двух идентичных Fc-фрагментов (например, Fc-области природного иммуноглобулина) или гетеродимер двух неидентичных Fc-фрагментов (например, один Fc-мономер димерной Fc-области содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию (например, замену, делецию, вставку или химическую модификацию), которая отсутствует в другом Fc-мономере, или один Fc-мономер может быть усечен по сравнению с другим).

Раскрытые в настоящем документе фрагменты Fc могут содержать последовательности или области Fc того же или другого класса и/или подкласса. Например, фрагменты Fc могут быть получены из иммуноглобулина (например, иммуноглобулина человека) подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или из любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагменты Fc-области относятся к одному и тому же классу и подклассу. Однако Fc-область (или один или более Fc-фрагментов Fc-области) также может быть химерной, при этом химерная Fc-область может содержать Fc-фрагменты, полученные из различных классов и/или подклассов иммуноглобулинов. Например, по меньшей мере два из фрагментов Fc димерной или одноцепочечной Fc-области могут быть из разных классов и/или подклассов иммуноглобулинов. В некоторых вариантах реализации изобретения димерная Fc-область может содержать последовательности из двух или более различных изотипов или подклассов; например, SEED-тело ("домен, сконструированный путём обмена между цепями"), см. Davis et al., Protein Eng. Des. Sel. 23(4):195 (2010).

Дополнительно или альтернативно, химерные Fc-области могут содержать один или более химерных Fc-фрагментов. Например, химерная Fc-область или фрагмент может содержать одну или более частей, полученных из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3), в то время как остальная часть Fc-области или фрагмента относится к другому подклассу. Например, Fc-область или фрагмент полипептида Fc может содержать домен CH2 и/или CH3, полученный из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG4), и шарнирную область из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG3). Например, Fc-область или фрагмент может содержать шарнирный и/или CH2-домен, полученный из иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG4) и CH3-домена из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Например, химерная область Fc может содержать Fc-фрагмент (например, полный Fc-фрагмент) из иммуноглобулина для первого подкласса (например, подкласса IgG4) и Fc-фрагмент из иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Например, Fc-область или фрагмент может содержать домен CH2 из иммуноглобулина IgG4 и домен CH3 из иммуноглобулина IgG1. Например, Fc-область или фрагмент может содержать домен CH1 и домен CH2 из молекулы IgG4 и домен CH3 из молекулы IgG1. Например, Fc-область или фрагмент может содержать часть домена CH2 из конкретного подкласса антитела, например, положения 292-340 EU домена CH2. Например, Fc-область или фрагмент может содержать аминокислоты в положениях 292-340 CH2, полученного из фрагмента IgG4, и остаток CH2, полученного из фрагмента IgG1

(альтернативно, 292-340 CH2 могут быть получены из фрагмента IgG1, а остаток CH2 получен из фрагмента IgG4).

Также следует понимать, что любое антитело, антигенсвязывающий фрагмент или Fc-область или фрагмент согласно настоящему изобретению могут иметь любой аллотип и/или гаплотип. Например, аллотипы иммуноглобулина G человека включают аллотипы, описанные в Jefferis and LeFranc, mAb 1(4):1-7 (2009), которые включают аллотипы (в том числе 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 получаемые аминокислотные последовательности и их комбинации, включенные в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации антитело, антигенсвязывающий фрагмент или Fc-область или фрагмент согласно настоящему изобретению содержат аллотип IgG1 g1m17, k1.

Кроме того, Fc-область или фрагмент могут (дополнительно или альтернативно), например, содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может быть получен, например, частично из молекулы IgG1, IgG2 или IgG4 (например, из последовательности верхнего и нижнего среднего шарнира) и, частично, из молекулы IgG3 (например, из последовательности среднего шарнира). В другом примере Fc-область или фрагмент могут содержать химерный шарнир, полученный, частично, из молекулы IgG1 и, частично, из молекулы IgG4. В другом примере химерный шарнир может содержать верхний и нижний шарнирные домены из молекулы IgG4 и средний шарнирный домен из молекулы IgG1. Такой химерный шарнир может быть изготовлен, например, путем введения замены пролина (Ser228Pro) в положении EU 228 в среднем шарнирном домене шарнирной области IgG4. В другом варианте реализации изобретения химерный шарнир может содержать аминокислоты в положениях EU 233-236, происходящие из антитела IgG2 и/или мутации Ser228Pro, где остальные аминокислоты шарнира происходят из антитела IgG4 (например, химерный шарнир последовательности ESKYGPPCPPCPAPPVAGP (SEQ ID NO: 74)). Дополнительные химерные шарниры, которые могут быть использованы в Fc-фрагменте антитела согласно настоящему изобретению, описаны в US 2005/0163783 A1.

В некоторых вариантах реализации связывающих белков, описанных в настоящем документе, Fc-фрагмент или Fc-область содержит или состоит из аминокислотной последовательности, полученной из последовательности иммуноглобулина человека (например, из Fc-области или Fc-фрагмента из молекулы IgG человека). Однако полипептиды могут содержать одну или более аминокислот из других видов млекопитающих. Например, Fc-фрагмент примата или сайт связывания примата могут

быть включены в рассматриваемые полипептиды. Альтернативно, одна или более аминокислот мыши могут присутствовать в Fc-фрагменте или в Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложено антитело, которое содержит: тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 75, необязательно с удаленным C-концевым лизином; и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложено антитело, которое содержит тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, необязательно с удаленным C-концевым лизином, и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложено антитело, которое содержит: тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 77, необязательно с удаленным C-концевым лизином; и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложено антитело, которое содержит тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 78, необязательно с удаленным C-концевым лизином, и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO: 79.

Молекулы нуклеиновых кислот/полинуклеотиды

В другом аспекте настоящего изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, кодирующий антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению. Следует понимать, что, например, первая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать тяжелую цепь антитела, а вторая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать легкую цепь антитела; эти первая и вторая молекулы нуклеиновой кислоты все еще могут упоминаться как "полинуклеотид" или "молекула нуклеиновой кислоты", которая кодирует антитело.

Другими словами, молекула полинуклеотида или нуклеиновой кислоты включает варианты осуществления, где части (например, цепи) антитела или антигенсвязывающего фрагмента кодируются отдельными молекулами нуклеиновой кислоты и/или отдельными частями молекул нуклеиновой кислоты. Типичные полинуклеотидные последовательности представлены в SEQ ID NO: 80-99. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 81, а полинуклеотид, кодирующий VL или LC антитела, содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 85-99. В других вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 83, а полинуклеотид, кодирующий VL или LC антитела, содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 85-99. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 84, а полинуклеотид, кодирующий VL или LC антитела, содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 85-99.

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

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула полинуклеотида или нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% (т.е. 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную нуклеотидной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 80-99, где нуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии клеткой-хозяином.

В конкретных вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты согласно любой из SEQ ID NO: 80-99.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит V_H-кодирующую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 81, и V_L-кодирующую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 85-97.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления полинуклеотид может содержать кодирующую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3 нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид содержит кодирующую CL нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 98 или 99.

Векторы

В объем настоящего изобретения дополнительно включены векторы, например, векторы экспрессии, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

Термин "вектор" относится к конструкции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты. Вектор в контексте настоящего изобретения подходит для включения или удержания желаемой последовательности нуклеиновой кислоты. Такие векторы могут представлять собой векторы хранения, векторы экспрессии, векторы клонирования, векторы переноса и т.д. Вектор 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.

В контексте настоящего документа "вектор экспрессии" относится к конструкции ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая функционально связана с подходящей контрольной последовательностью, способной эффективно осуществлять экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие контрольные последовательности включают промотор (например, гетерологичный промотор) для осуществления транскрипции, необязательную операторную последовательность для контроля такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Любой из элементов вектора экспрессии, который способствует транскрипции молекулы нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, может быть гетерологичным вектору. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто потенциальную геномную вставку. После трансформации в подходящего хозяина вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина или может, в некоторых случаях, интегрироваться в сам геном. В настоящем описании термины "плазмида", "экспрессионная плазмида", "вирус" и "вектор" часто используются взаимозаменяемо.

Вектор клонирования, как правило, представляет собой вектор, который содержит сайт клонирования, который может быть использован для включения последовательностей нуклеиновых кислот в вектор. Вектор клонирования может представлять собой, например, плазмидный вектор или вектор бактериофага.

Вектор переноса может представлять собой вектор, который подходит для переноса молекул нуклеиновой кислоты в клетки или организмы, 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 по смыслу настоящей заявки содержит сайт клонирования, селективный маркер, такой как фактор устойчивости к антибиотикам, и последовательность, подходящую для размножения вектора, такую как точку начала репликации.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит плазмидный вектор или вирусный вектор (например, лентивирусный вектор или γ-ретровирусный вектор). Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирус, вирусы РНК с отрицательной цепью, такие как орто-миксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, корь и сендай), вирусы РНК с положительной цепью, такие как пикорнавирус и альфавирус, и двухцепочечные ДНК-вирусы, включая аденовирус, герпесвирус (например, вирусы Herpes Simplex типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (например, вакцину, коровью оспу и канарипокс). Другие вирусы включают, например, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают лейкоз-саркому птиц, вирусы С-типа млекопитающих, вирусы В-типа, вирусы D-типа, группу HTLV-BLV, лентивирус, спумавирус (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

"Ретровирусы" представляют собой вирусы, имеющие геном РНК, который обратно транскрибируется в ДНК с использованием фермента обратной транскриптазы, затем обратно транскрибируемая ДНК включается в геном клетки-хозяина. "Гаммаретровирусы" относится к роду ретровирусов (Retroviridae). Примеры гаммаретровирусов включают вирус стволовых клеток мыши, вирус лейкоза мыши, вирус лейкоза кошек, вирус саркомы кошек и вирусы ретикулоэндотелиоза птиц.

"Лентивирусные векторы" включают в себя основанные на ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) лентивирусные векторы для доставки генов, которые могут

быть интегрирующими или неинтегрирующими, обладают относительно большой упаковочной емкостью и могут трансдуцировать ряд различных типов клеток. Лентивирусные векторы обычно генерируют после временной трансфекции трех (упаковки, оболочки и переноса) или более плазмид в клетки-продуценты. Как и ВИЧ, лентивирусные векторы проникают в клетку-мишень через взаимодействие гликопротеинов вирусной поверхности с рецепторами на поверхности клетки. При вводе вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, которая опосредуется комплексом вирусной обратной транскриптазы. Продуктом обратной транскрипции является двухцепочечная линейная вирусная ДНК, которая является субстратом для вирусной интеграции в ДНК инфицированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой гаммаретровирус, например, векторы, полученные из вируса лейкоза мышей Молони (MLV). В других вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой более сложный вектор, полученный из ретровируса, например, вектор, полученный из лентивируса. К этой категории относятся векторы, происходящие из ВИЧ-1. Другие примеры включают лентивирусные векторы, полученные из ВИЧ-2, FIV (вирус иммунодефицита кошки), вируса инфекционной анемии лошадей, SIV и вируса Маеди-Висна (лентивирус овец). Способы применения ретровирусных и лентивирусных вирусных векторов и упаковки клеток для трансдукции клеток-хозяев млекопитающих с вирусными частицами, содержащими трансгены, известны в данной области техники и были описаны ранее, например, в: патенте США 8119772; Walchli и др., PLoS One 6:327930, 2011; Zhao и др., J. Immunol. 174:4415, 2005; Engels et al., Hum. Gene Ther. 14:1155, 2003; Frecha et al., Mol. Ther. 18:1748, 2010; and Verhoeyen et al., Methods Mol. Biol. 506:97, 2009. Ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции и системы экспрессии также коммерчески доступны. Другие вирусные векторы также могут быть использованы для доставки полинуклеотидов, включая ДНК-вирусные векторы, включая, например, векторы на основе аденовируса и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV); векторы, полученные из вирусов простого герпеса (HSV), включая векторы ампликона, репликационно дефектный HSV и аттенуированный HSV (Krisky и др., Gene Ther. 5:1517, 1998).

Другие векторы, которые могут быть использованы с композициями и способами согласно настоящему изобретению, включают векторы, полученные из бакуловирусов и α-вирусов. (Jolly, D J. 1999. Emerging Viral Vectors. pp. 209-40 in Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab), или плазмидные векторы (такие как "спящая красавица" или другие транспозонные векторы).

Когда геном вирусного вектора содержит множество полинуклеотидов, подлежащих экспрессии в клетке-хозяине в виде отдельных транскриптов, вирусный вектор может также содержать дополнительные последовательности между двумя (или более) транскриптами, обеспечивающие бицистронную или мультицистронную экспрессию. Примеры таких последовательностей, используемых в вирусных векторах, включают внутренние сайты входа рибосом (IRES), сайты расщепления фурином, вирусный пептид 2A или любую их комбинацию.

Плазмидные векторы, включая плазмидные векторы, кодирующие антитело на основе ДНК или антигенсвязывающий фрагмент, для прямого введения субъекту, описаны далее в настоящем документе.

Клетки

В дополнительном аспекте настоящее изобретение также относится к клетке (также называемой "клеткой-хозяином"), 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, дрожжевые клетки, клетки животных, клетки насекомых, клетки растений; и прокариотические клетки, включая E. coli. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки представляют собой клетки млекопитающих. В некоторых таких вариантах осуществления клетки представляют собой клеточную линию млекопитающих, такую как клетки CHO (например, клетки DHFR- CHO (Urlaub и др., PNAS 77:4216 (1980), CHO-KSV, ExpiCHO), эмбриональные клетки почек человека (например, клетки HEK293T), клетки PER.C6, клетки Y0, клетки Sp2/0. Клетки NS0, клетки печени человека, например, клетки Hepa RG, клетки миеломы или клетки гибридомы. Другие примеры линий клеток-хозяев млекопитающих включают клетки сертоли мыши (например, клетки TM4); линию CV1 почки обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76); клетки почки обезьяны (CV1); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы линии буффало (BRL 3A); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI ; клетки MRC-5 и клетки FS4. Линии клеток-хозяев млекопитающих, подходящие для продуцирования антител, также включают те, которые описаны, 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 некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, такую как E. coli. Экспрессия пептидов в прокариотических клетках, таких как E. coli, хорошо известна (см., например, Pluckthun, A. Bio/Technology 9:545-551 (1991). Например, антитела можно продуцировать в бактериях, в частности, если гликозилирование и Fc-эффекторные функции не нужны. Экспрессию фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, в патенте США № 5,648,237; 5,789,199; и 5,840,523.

Клетки насекомых, пригодные для экспрессии связывающего белка по настоящему изобретению, известны в данной области техники и включают, например, клетки Spodoptera frugipera Sf9, клетки Trichoplusia ni BTI-TN5B1-4 и клетки Spodoptera frugipera SfSWT01 “MimicTM”. См, например, Palmberger et al., J. Biotechnol. 153(3-4):160-166 (2011). Выявлены многочисленные штаммы бакуловирусов, которые можно использовать в комбинации с клетками насекомых, особенно для трансфекции клеток Spodoptera frugiperda.

Эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, также являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих белок, и включают грибки и штаммы дрожжей с "гуманизированными" путями гликозилирования, что приводит к получению антитела с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, Nat. Biotech.22:1409-1414 (2004); Li et al., Nat. Biotech.24:210-215 (2006).

Растительные клетки также могут быть использованы в качестве хозяев для экспрессии связывающего белка согласно настоящему изобретению. Например, технология PLANTIBODIES™ (описана, например, в патенте США № 5,959,177; 6,040,498; 6,420,548; 7,125,978; и 6,417,429) используют трансгенные растения для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок экспрессируется на поверхности клетки иммунной клеткой, например, Т-клеткой, NK-клеткой или NK-Т-клеткой, или любым их подтипом.

Любая система экспрессии белка, совместимая с описанием, может быть использована для получения описанных связывающих белков. Подходящие системы экспрессии включают трансгенных животных, описанных в Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999.

В частных вариантах осуществления клетка может быть трансфицирована вектором в соответствии с настоящим описанием с вектором экспрессии. Термин "трансфекция" относится к введению молекул нуклеиновых кислот, таких как молекулы

ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, такие как эукариотические клетки. В контексте настоящего описания термин "трансфекция" охватывает любой известный специалисту способ введения молекул нуклеиновых кислот в клетки, например, в эукариотические клетки, в том числе в клетки млекопитающих. Такие способы включают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основе катионных липидов и/или липосом, осаждение 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 некоторых вариантах осуществления введение является невирусным.

Кроме того, клетки согласно настоящему изобретению могут быть стабильно или временно трансфицированы вектором согласно настоящему изобретению, например, для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению. В таких вариантах осуществления клетки стабильно трансфицируют вектором, как описано в настоящем документе, кодирующим связывающий белок. Альтернативно, клетки могут быть временно трансфицированы вектором согласно настоящему изобретению, кодирующим связывающий белок согласно настоящему описанию. В любом из раскрытых в данном документе вариантов осуществления полинуклеотид может быть гетерологичным клетке-хозяину.

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

Соответственно, настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам-хозяевам, которые гетерологично экспрессируют антитело, антигенсвязывающий фрагмент, или слитый белок по настоящему изобретению. Например, клетка может быть разновидностью, которая отличается от разновидности, из которой было полностью или частично получено антитело (например, клетки CHO, экспрессирующие человеческое антитело или сконструированное человеческое антитело). В некоторых вариантах осуществления тип клетки клетки-хозяина в природе не экспрессирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Кроме того, клетка-хозяин может вносить посттрансляционную модификацию (PTM; например, глизоцилирование или фукозилирование) в связывающий белок, которая не присутствует в нативном состоянии связывающего белка (или в нативном состоянии родительского связывающего белка, из которого был сконструирован или получен связывающий белок). Такая PTM может

привести к функциональному изменению (например, пониженной иммуногенности). Соответственно, связывающий белок согласно настоящему изобретению, продуцируемый клеткой-хозяином, как описано в настоящем документе, может содержать одну или более посттрансляционных модификаций, которые отличаются от связывающего белка в его нативном состоянии (например, антитело человека, продуцируемое клеткой CHO, может содержать посттрансляционную модификацию, которая отличается от антитела при выделении из человека и/или продуцируемого нативной B-клеткой человека или плазматической клеткой).

Необязательные дополнительные признаки антител, антигенсвязывающих фрагментов и слитых белков

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки согласно настоящему изобретению могут быть соединены, например, с лекарственным средством для доставки в место обработки или соединены с обнаруживаемой меткой для облегчения визуализации места, содержащего клетки, представляющие интерес. Способы связывания антител с лекарственными средствами и обнаруживаемыми метками хорошо известны в данной области техники, как и способы визуализации с использованием обнаруживаемых меток. Меченые антитела могут быть использованы в широком спектре анализов, используя широкий спектр меток. Обнаружение образования комплекса антитело-антиген между антителом (или антигенсвязывающим фрагментом или слитым белком) согласно настоящему изобретению и представляющим интерес эпитопом на HBsAg, в частности, на антигенной петлевой области HBsAg, может быть облегчено путем присоединения обнаруживаемого вещества к антителу. Подходящие средства обнаружения включают применение меток, таких как радионуклиды, ферменты, коферменты, флуоресцентные вещества, хемилюминесцентные вещества, хромогены, субстраты или кофакторы ферментов, ингибиторы ферментов, комплексы протезных групп, свободные радикалы, частицы, красители и тому подобное. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетической группы включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного вещества представляет собой люминол; примеры биолюминесцентных веществ включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящего радиоактивного вещества включают 125I, 131I, 35S или 3H. Такие меченые реагенты

могут быть использованы в различных хорошо известных анализах, таких как радиоиммуноанализы, иммуноферментные анализы, например, ELISA, флуоресцентные иммуноанализы и тому подобное. Таким образом, меченые антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки согласно настоящему изобретению могут быть использованы в таких анализах, например, как описано в US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837; и US 4,233,402.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин, терапевтический агент или радиоактивный ион 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 тому подобное. Такие конъюгаты могут быть использованы для модификации данного биологического ответа; фрагмент лекарственного средства не следует рассматривать как ограниченный классическими химическими терапевтическими агентами. Например, лекарственный фрагмент может представлять собой белок или полипептид, обладающий желательной биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин псевдомонад или дифтерийный токсин.

Способы конъюгирования такого терапевтического фрагмента с антителами хорошо известны. См., например, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in 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, " in 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," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; и Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-158.

Альтернативно, антитело, фрагмент антитела или слитый белок могут быть конъюгированы со вторым антителом или его фрагментом антитела (или вторым слитым белком) с образованием гетероконъюгата, например, как описано в US 4,676,980. Кроме того, линкеры могут быть использованы между метками и антителами согласно описанию, например, как описано в US 4831175. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки могут быть непосредственно мечены радиоактивным иодом, индием, иттрием или другими радиоактивными частицами, известными в данной области

техники, например, как описано в US 5,595,721. Лечение может состоять из комбинации лечения конъюгированными и неконъюгированными антителами, антигенсвязывающими фрагментами и/или слитыми белками, вводимыми одновременно или впоследствии, например, как описано в WO00/52031; WO00/52473.

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки, как описано в настоящем документе, также могут быть присоединены к твердой подложке. Кроме того, антитела по настоящему изобретению, их функциональные фрагменты антител или слитые белки могут быть химически модифицированы путем ковалентной конъюгации с полимером, чтобы, например, увеличить их циркулирующий период полувыведения. Примеры полимеров и способов их присоединения к пептидам приведены в US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 и US 4,609,546. В некоторых вариантах реализации изобретения полимеры могут быть выбраны из полиоксиэтилированных полиолов и полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ растворим в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу: $R(O\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_nO\text{-}R$, где R может представлять собой водород или защитную группу, такую как алкильная или алканольная группа. В некоторых вариантах реализации изобретения защитная группа может содержать от 1 до 8 атомов углерода. Например, защитная группа может представлять собой метил. Символ n является положительным целым числом. В одном варианте реализации n равно от 1 до 1000. В другом варианте реализации n равно от 2 до 500. В некоторых вариантах реализации изобретения ПЭГ имеет среднюю молекулярную массу, выбранную из от 1000 до 40000, от 2000 до 20000 и от 3000 до 12000. Кроме того, ПЭГ может иметь по меньшей мере одну гидроксильную группу, например, ПЭГ может иметь концевую гидроксильную группу. Например, это концевая гидроксильная группа, которая активируется для взаимодействия со свободной аминогруппой на ингибиторе. Однако следует понимать, что тип и количество реакционноспособных групп могут быть изменены для достижения ковалентно конъюгированного ПЭГ/антитела по настоящему описанию.

Водорастворимые полиоксиэтилированные полиолы также могут быть использованы в контексте антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Они включают полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу, полиоксиэтилированный глицерин (POG) и тому подобное. В одном варианте реализации изобретения используют POG. Не ограничиваясь какой-либо теорией, поскольку глицериновый каркас полиоксиэтилированного глицерина является тем же самым каркасом, встречающимся естественным образом, например, у животных и людей в моно-, ди-, триглицеридах, это ветвление не обязательно будет рассматриваться как чужеродный агент в организме. POG может иметь молекулярную

массу в том же диапазоне, что и ПЭГ. Другой системой доставки лекарств, которая может быть использована для увеличения периода полураспада в кровообращении, является липосома. Способы получения систем доставки липосом известны специалистам в данной области техники. Другие системы доставки лекарственных средств известны в данной области техники и описаны, например, в работах Poznansky et al. (1980) и Poznansky (1984).

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки согласно настоящему изобретению могут быть предложены в очищенной форме. Как правило, антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок будут присутствовать в композиции, которая по существу не содержит других полипептидов, например, где менее 90% (по массе), обычно менее 60% и более обычно менее 50% композиции состоит из других полипептидов.

Антитела, слитые белки или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть иммуногенными у нечеловеческих (или гетерологичных) хозяев, например, у мышей. В частности, антитела, антигенсвязывающие фрагменты или слитые белки могут иметь идиотоп, который является иммуногенным у нечеловеческих хозяев, но не у человеческого хозяина. В частности, такие молекулы согласно настоящему изобретению для применения у человека включают молекулы, которые не могут быть легко выделены из хозяев, таких как мыши, козы, кролики, крысы, млекопитающие, не являющиеся приматами, и т.д., и, как правило, не могут быть получены путем гуманизации или от ксено-мышей.

Получение антител, антигенсвязывающих фрагментов и слитых белков

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

В одном варианте реализации изобретения антитела получают с использованием способа, описанного в WO 2004/076677. В таких способах В-клетки, продуцирующие антитело, трансформируют EBV и поликлональным активатором В-клеток. Дополнительные стимуляторы клеточного роста и дифференцировки могут быть необязательно добавлены во время стадии трансформации для дальнейшего повышения эффективности. Эти стимуляторы могут представлять собой цитокины, такие как IL-2 и

IL-15. В одном аспекте IL-2 добавляют во время стадии иммортализации для дальнейшего повышения эффективности иммортализации, но его применение не является существенным. Иммортализованные В-клетки, полученные с использованием этих способов, затем можно культивировать с использованием способов, известных в данной области техники, и антител, выделенных из них.

Другой способ получения антител описан в WO 2010/046775. В таком способе плазматические клетки культивируют в ограниченном количестве или в виде одиночных плазматических клеток в планшетах для культивирования в микроячейках. Антитела могут быть выделены из культур плазматических клеток. Кроме того, из культур плазматических клеток может быть выделена РНК, и ПЦР может быть выполнена с использованием способов, известных в данной области техники. Области VH и VL антител могут быть амплифицированы с помощью ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскриптазой), секвенированы и клонированы в вектор экспрессии, который затем трансфицируют в клетки HEK293T или другие клетки-хозяева. Клонирование нуклеиновой кислоты в экспрессирующих векторах, трансфекцию клеток-хозяев, культивирование трансфицированных клеток-хозяев и выделение продуцируемого антитела можно осуществлять с использованием любых способов, известных специалисту в данной области техники.

Антитела могут быть дополнительно очищены, при необходимости, с использованием фильтрации, центрифугирования и различных хроматографических методов, таких как ВЭЖХ или аффинная хроматография. Способы очистки антител, например, моноклональных антител, включая способы получения антител фармацевтического класса, хорошо известны в данной области техники.

Стандартные методы молекулярной биологии могут быть использованы для получения последовательностей ДНК, кодирующих антитела, антигенсвязывающие фрагменты или слитые белки по настоящему описанию. Желаемые последовательности ДНК могут быть полностью или частично синтезированы с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости могут быть использованы методики сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Любая подходящая система клетка-хозяин/вектор может быть использована для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих антитело или молекулы слитого белка по настоящему изобретению, или их фрагментов. Бактериальные, например, E. coli, и другие микробные системы могут быть использованы, в частности, для экспрессии фрагментов антител, таких как фрагменты Fab и F(ab')2, и особенно фрагментов Fv и одноцепочечных фрагментов антител, например, одноцепочечных Fv. Эукариотические,

например, млекопитающие, системы экспрессии клеток-хозяев могут быть использованы для получения более крупных молекул антител, включая полные молекулы антител. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, типичные клетки-хозяева и клеточные линии, описанные в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, антигенсвязывающего фрагмента или молекулы слитого белка в соответствии с настоящим изобретением, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, в условиях, подходящих для экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему описанию, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела или фрагмент антитела могут содержать только полипептид тяжелой или легкой цепи, и в этом случае для трансфекции клеток-хозяев необходимо использовать только кодирующую полипептид последовательность тяжелой цепи или легкой цепи. Для получения продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, клеточная линия может быть трансфицирована двумя векторами, первый вектор, кодирующий полипептид легкой цепи, и второй вектор, кодирующий полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, может быть использован один вектор, включающий последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Альтернативно, антитела, антигенсвязывающие фрагменты и слитые белки согласно настоящему изобретению могут быть получены путем (i) экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в клетке-хозяине, например, с использованием вектора согласно настоящему описанию, и (ii) выделения экспрессированного целевого продукта. Кроме того, способ может включать (iii) очистку выделенного антитела, антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка. Трансформированные В-клетки и культивируемые плазматические клетки могут быть подвергнуты скринингу на предмет продуцирования антител, антигенсвязывающих фрагментов или слитых белков желаемой специфичности или функции.

Скрининг можно проводить с помощью любого иммуноанализа, например, ELISA, путем окрашивания тканей или клеток (включая трансфицированные клетки), с помощью анализа нейтрализации или с помощью одного из ряда других способов, известных в данной области техники, для идентификации желаемой специфичности или функции. Анализ может быть выбран на основе простого распознавания одного или более антигенов или может быть выбран на дополнительной основе желаемой функции, например, для выбора нейтрализующих антител, а не только антигенсвязывающих антител, для выбора антител, которые могут изменять характеристики клеток-мишеней, такие как их

сигнальные каскады, их форма, их скорость роста, их способность влиять на другие клетки, их реакцию на влияние других клеток или других реагентов или путем изменения условий, их статуса дифференцировки или тому подобное.

Затем отдельные клоны трансформированных В-клеток могут быть получены из положительно трансформированной культуры В-клеток. Этап клонирования для отделения отдельных клонов от смеси положительных клеток может быть осуществлен с использованием ограниченного разведения, микроманипуляции, осаждения отдельных клеток путем сортировки клеток или другим способом, известным в данной области техники.

Нуклеиновая кислота из культивируемых плазматических клеток может быть выделена, клонирована и экспрессирована в клетках HEK293T или других известных клетках-хозяевах с использованием способов, известных в данной области техники.

Иммортализованные клоны В-клеток или трансфицированные—клетки-хозяева, описанные в настоящем документе, могут быть использованы различными способами, например, в качестве источника моноклональных антител, в качестве источника нуклеиновой кислоты (ДНК или мРНК), кодирующей представляющее интерес моноклональное антитело, для исследований и т.д.

Ингибиторы систем экспрессии и доставки белка HBV

В настоящем изобретении также предложены ингибиторы экспрессии белка HBV для применения в способах комбинированной терапии и композициях для лечения HBV, причем комбинированная терапия содержит связывающий белок, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации ингибитор экспрессии гена HBV представляет собой агент РНКи. В данном контексте термин "агент РНК интерференции" или "агент РНКи" относится к агенту, который содержит РНК, как этот термин определен в данном документе, и который опосредует направленное расщепление РНК-транскрипта посредством РНК-индуцированного сайленсинг-комплекса (RISC). В некоторых вариантах реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, влияет на ингибирование экспрессии гена HBV.

В одном аспекте агент РНК интерференции включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени для направления расщепления РНК-мишени. Не желая связываться с конкретной теорией, длинная двухцепочечная РНК (дцРНК), введенная в растения и клетки беспозвоночных, расщепляется на миРНК эндонуклеазой типа III, известной как Dicer (Sharp, et al., Genes Dev. 15:485 (2001)). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе-III, перерабатывает дцРНК в короткие интерферирующие РНК (миРНК) длиной 19-23 пары оснований с характерными

двухосновными 3' липкими концами (Bernstein, et al., Nature 409:363 (2001)). Затем миРНК включают в РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс (RISC), где одна или более геликаз раскручивают дуплекс миРНК, что позволяет комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишеней (Nykanen, et al., Cell 107:309 (2001)). При связывании с соответствующей мРНК-мишенью одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляет мишень для индуцирования сайленсинга (Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188 (2001)). Таким образом, в одном аспекте технология, описанная в настоящем документе, относится к одноцепочечной РНК, которая способствует образованию комплекса RISC для осуществления сайленсинга гена-мишени.

Термины "молчание", "ингибируют экспрессию", "подавляют экспрессию", "подавляют экспрессию" и тому подобное, поскольку они относятся к гену HBV, в настоящем документе относятся к по меньшей мере частичному снижению экспрессии гена HBV, что проявляется снижением количества мРНК HBV, которая может быть выделена или обнаружена в первой клетке или группе клеток, в которых ген HBV транскрибируется, и которая была или была обработана ингибитором экспрессии гена HBV, таким образом, что экспрессия гена HBV ингибируется, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но которая была или не была обработана таким образом (контрольные клетки). Степень ингибирования может быть измерена, например, как разница между степенью экспрессии мРНК в контрольной клетке за вычетом степени экспрессии мРНК в обработанной клетке. Альтернативно, степень ингибирования может быть задана с точки зрения снижения параметра, который функционально связан с экспрессией гена HBV, например, количества белка, кодируемого геном HBV, или количества клеток, демонстрирующих определенный фенотип, например, фенотип инфекции HBV, такой как инфекция HBV, экспрессия белка HBV (например, поверхностный антиген гепатита B, HBsAg) или изменения экспрессии клеточного гена, отражающие экспрессию гена HBV (например, экспрессию и локализацию Smc5/6). Степень ингибирования также может быть измерена с использованием клетки, сконструированной для экспрессии репортерного гена, отражающего экспрессию РНК HBV. В принципе, сайленсинг гена HBV может быть определен в любой клетке, экспрессирующей ген HBV, например, клетке, инфицированной HBV, или клетке, сконструированной для экспрессии гена HBV, и с помощью любого подходящего анализа.

Уровень РНК HBV, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей РНК HBV, может быть определен с использованием любого способа, известного в данной области техники, для оценки экспрессии мРНК, такого как

способ ОТ-ПЦР, представленный в Примере 2 публикации международной заявки № WO 2016/077321A1 и патентной заявке США № US2017/0349900A1, где указанные способы включены в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии гена HBV (например, общей РНК HBV, транскрипта HBV, например, транскрипта HBV 3,5 кб) в образце определяют путем обнаружения транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, РНК гена HBV. РНК можно экстрагировать из клеток с использованием методов экстракции РНК, включая, например, экстракцию фенолом кислоты/изотиоцианатом гуанидина (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen®) или PAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализа, использующие гибридизацию рибонуклеиновой кислоты, включают анализы ядерных циклов, ОТ-ПЦР, анализы защиты от РНКаз. (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию in situ и микроматричный анализ. Циркулирующая мРНК HBV может быть обнаружена с использованием способов, описанных в публикации международной заявки № WO 2012/177906A1 и патентной заявке США № US2014/0275211A1, где указанные способы включены в настоящий документ посредством ссылки.

В данном контексте "целевая последовательность" относится к смежной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена HBV, включая мРНК, которая является продуктом процессинга РНК продукта первичной транскрипции. Целевая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для РНКи-направленного расщепления в этой части или рядом с ней. Например, целевая последовательность обычно составляет от 9 до 36 нуклеотидов в длину, например, 15-30 нуклеотидов в длину, включая все поддиапазоны между ними. В качестве неограничивающих примеров последовательность-мишень может представлять собой 15-30 нуклеотидов, 15-26 нуклеотидов, 15-23 нуклеотидов, 15-22 нуклеотидов, 15-21 нуклеотидов, 15-20 нуклеотидов, 15-19 нуклеотидов, 15-18 нуклеотидов, 15-17 нуклеотидов, 18-30 нуклеотидов, 18-26 нуклеотидов, 18-23 нуклеотидов, 18-22 нуклеотидов, 18-21 нуклеотидов, 18-20 нуклеотидов, 19-30 нуклеотидов, 19-26 нуклеотидов, 19-23 нуклеотидов, 19-22 нуклеотидов, 19-21 нуклеотидов, 19-20 нуклеотидов, 20-30 нуклеотидов, 20-26 нуклеотидов, 20-25 нуклеотидов, 20-24 нуклеотидов, 20-23 нуклеотидов, 20-22 нуклеотидов, 20-21 нуклеотидов, 21-30 нуклеотидов, 21-26 нуклеотидов, 21-25 нуклеотидов, 21-24 нуклеотидов, 21-23 нуклеотидов, или 21-22 нуклеотида.

В данном контексте термин "цепь, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описана последовательностью, упомянутой с использованием стандартной нуклеотидной номенклатуры.

В данном контексте и если не указано иное, термин "комплементарный", при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области техники. Такие условия могут быть, например, жесткими, где жесткие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES pH 6,4, 1 мМ ЭДТА, 50 °C или 70 °C в течение 12-16 часов с последующей промывкой. Могут применяться другие условия, такие как физиологически значимые условия, которые могут встречаться внутри организма. Специалист в данной области техники сможет определить набор условий, наиболее подходящих для испытания комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в агенте РНКи, например, в миРНК, как описано в настоящем документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут упоминаться как "полностью комплементарные" по отношению друг к другу в настоящем документе. Однако, если первая последовательность упоминается как "по существу комплементарная" по отношению ко второй последовательности в настоящем документе, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или более, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований при гибридизации для дуплекса вплоть до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее подходящих для их конечного применения, например, ингибирование экспрессии генов посредством пути RISC. Однако, если два олигонуклеотида предназначены для образования при гибридизации одного или более одноцепочечных липких концов, такие липкие концы не должны рассматриваться как несоответствия в отношении определения комплементарности. Например, миРНК, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида,

причем более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все же может упоминаться как "полностью комплементарная" для целей, описанных в настоящем документе.

"Комплементарные" последовательности, используемые в настоящем документе, также могут включать или могут быть образованы полностью из пар оснований, отличных от оснований Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в той мере, в какой выполняются вышеуказанные требования в отношении их способности к гибридизации. Такие пары оснований не-Уотсона-Крика включают, но не ограничиваются ими, пары оснований G:U Wobble или Hoogstein.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный" в настоящем документе может быть использован в отношении соответствия оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью миРНК или между антисмысловой цепью агента РНКи и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их применения.

В данном контексте полинуклеотид, который является "по существу комплементарным" по меньшей мере части информационной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен смежной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей белок HBV). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК HBV, если последовательность по существу комплементарна непрерывной части мРНК HBV.

а. миРНК

В некоторых вариантах реализации агент РНКи содержит миРНК. Термин "миРНК", как используется в настоящем документе, относится к РНКи, которая включает молекулу РНК или комплекс молекул, имеющих гибридизованную дуплексную область, которая содержит две антипараллельные и по существу комплементарные нити нуклеиновой кислоты, которые будут упоминаться как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК. Дуплексная область может быть любой длины, которая позволяет специфически деградировать желаемую целевую РНК через RISC-путь, но обычно будет варьироваться от 9 до 36 пар оснований в длину, например, 15-30 пар оснований в длину. Рассматривая дуплекс от 9 до 36 пар оснований, дуплекс может быть любой длины в этом диапазоне, например, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 и любом

поддиапазоне между ними, включая, но не ограничиваясь этим, 15-30 пар оснований, 15-26 пар оснований, 15-23 пары оснований, 15-22 пары оснований, 15-21 пары оснований, 15-20 пар оснований, 15-19 пар оснований, 15-18 пар оснований, 15-17 пар оснований, 18-30 пар оснований, 18-26 пар оснований, 18-23 пары оснований, 18-22 пары оснований, 18-21 пары оснований, 18-20 пар оснований, 19-30 пар оснований, 19-26 пар оснований, 19-23 пары оснований, 19-22 пары оснований, 19-21 пары оснований, 19-20 пар оснований, 20-30 пар оснований, 20-26 пар оснований, 20-25 пар оснований, 20-24 пары оснований, 20-23 пары оснований, 20-22 пары оснований, 20-22 пары оснований, 20-22 пары оснований, 20-21 пара оснований, 21-30 пар оснований, 21-26 пар оснований, 21-25 пар оснований, 21-24 пар оснований, 21-23 пары оснований и 21-22 пары оснований. миРНК генерируются в клетке путем обработки Dicer и аналогичные ферменты обычно находятся в диапазоне 19-22 пары оснований в длину. Термин "двухцепочечная РНК" или "дцРНК" также используется в настоящем документе синонимично для обозначения миРНК, как описано выше.

Одна цепь дуплексной области миРНК включает последовательность, которая по существу комплементарна области целевой РНК. Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут быть из одной молекулы РНК, имеющей по меньшей мере одну самодополняемую область, или могут быть образованы из двух или более отдельных молекул РНК. Если дуплексная область образована из двух цепей одной молекулы, молекула может иметь дуплексную область, разделенную одноцепочечной цепью нуклеотидов (в настоящем документе называемой "петлей шпильки") между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру. Шпилька может содержать по меньшей мере один непарный нуклеотид; в некоторых вариантах реализации изобретения шпилька может содержать по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более непарных нуклеотидов. Если две по существу комплементарные цепи миРНК состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы могут быть ковалентно соединены, но не обязательно. В тех случаях, когда две нити соединены ковалентно с помощью средств, отличных от петли шпильки, соединительная структура называется "линкером".

Термин "антисмысловая цепь" или "направляющая цепь" относится к цепи агента РНКи, например, миРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна последовательности-мишени. В данном контексте термин "область комплементарности" относится к области на антисмысловой цепи, которая по существу

комплементарна последовательности, например, последовательности-мишени, как определено в данном документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна целевой последовательности, несоответствия могут быть во внутренней или концевой областях молекулы.

Как правило, наиболее допустимые несоответствия находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца.

Термин "смысловая цепь" или "сопровождающая цепь", используемый в настоящем документе, относится к цепи РНКи, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, как этот термин определен в настоящем документе.

В другом аспекте указанный агент представляет собой одноцепочечную антисмысловую молекулу РНК. Антисмысловая молекула РНК может иметь 15-30 нуклеотидов, комплементарных мишени. Например, антисмысловая молекула РНК может иметь последовательность по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более смежных нуклеотидов из одной из антисмысловых последовательностей, раскрытых в настоящем документе.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что термин "молекула РНК" или "молекула рибонуклеиновой кислоты" охватывает не только молекулы РНК, экспрессируемые или встречающиеся в природе, но также аналоги и производные РНК, содержащие один или более аналогов или производных рибонуклеотида/рибонуклеозида, как описано в настоящем документе или как известно в данной области техники. Строго говоря, "рибонуклеозид" включает нуклеозидное основание и рибозный сахар, а "рибонуклеотид" представляет собой рибонуклеозид с одним, двумя или тремя фосфатными фрагментами. Однако термины "рибонуклеозид" и "рибонуклеотид" можно считать эквивалентными, при использовании в настоящем документе. РНК может быть модифицирована в структуре нуклеиновых оснований или в структуре рибозофосфатного каркаса, например, как более подробно описано ниже. Однако молекулы миРНК, содержащие аналоги или производные рибонуклеозидов, сохраняют способность образовывать дуплекс. В качестве неограничивающих примеров молекула РНК может также включать по меньшей мере один модифицированный рибонуклеозид, включая, но не ограничиваясь ими, 2'-О-метил-модифицированный нуклеозид, нуклеозид, содержащий 5'-тиофосфатную группу, концевой нуклеозид, связанный с холестерильным производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты, заблокированный нуклеозид, безазоистый нуклеозид, 2'-дезокси-2'-фтор-модифицированный нуклеозид, 2'-амино-модифицированный нуклеозид, 2'-алкил-модифицированный нуклеозид,

морфолинонуклеозид, фосфорамидат или неприродное основание, содержащее нуклеозид, или любую их комбинацию. Альтернативно, молекула РНК может содержать по меньшей мере два модифицированных рибонуклеозида, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или более, вплоть до всей длины молекулы миРНК. Модификации не обязательно должны быть одинаковыми для каждого из такого множества модифицированных рибонуклеозидов в молекуле РНК. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированные РНК, рассматриваемые для применения в способах и композициях, описанных в настоящем документе, представляют собой пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК), которые обладают способностью образовывать необходимую дуплексную структуру и которые позволяют или опосредуют специфическую деградацию целевой РНК посредством пути RISC.

В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированный рибонуклеозид включает дезоксирибонуклеозид. Например, агент РНКи может содержать один или более дезоксинуклеозидов, включая, например, дезоксинуклеозидный(-ые) липкий конец (конца) или один или более дезоксинуклеозидов в двухцепочечной части миРНК. Однако термин "агент РНКи", используемый в настоящем документе, не включает полную молекулу ДНК.

В данном контексте термин "нуклеотидный липкий конец" относится по меньшей мере к одному непарному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры агента РНКи, например, миРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи миРНК простирается за пределы 5'-конец другой цепи, или наоборот, существует нуклеотидный липкий конец. миРНК может содержать липкий конец по меньшей мере одного нуклеотида; в альтернативном варианте липкий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный липкий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Липкий конец(концы) может (могут) находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) липкого конца может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи миРНК.

В некоторых вариантах реализации антисмысловая цепь миРНК имеет липкий конец из 1-10 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых вариантах реализации изобретения смысловая цепь миРНК имеет липкий конец из 1-10 нуклеотидов на 3'-конце

и/или 5'-конце. В некоторых других вариантах реализации изобретения один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидным тиофосфатом.

В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один конец миРНК имеет одноцепочечный нуклеотидный липкий конец из от 1 до 4, как правило, из 1 или 2 нуклеотидов. миРНК, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец, могут неожиданно обладать превосходными ингибирующими свойствами по сравнению с их тупоконечными аналогами.

Термин "тупой конец", используемый в настоящем документе в отношении миРНК, означает, что на данном конце миРНК нет непарных нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, то есть нет нуклеотидного липкого конца. Один или оба конца миРНК могут быть тупыми. Когда оба конца миРНК являются тупыми, говорят, что миРНК "с тупыми концами". миРНК "с тупыми концами" представляет собой миРНК, которая является тупой на обоих концах, то есть не имеет нуклеотидного выступа (липкого конца) на обоих концах молекулы. Чаще всего такая молекула будет двухцепочечной по всей своей длине.

В некоторых вариантах реализации изобретения комбинированная терапия, описанная в настоящем документе, включает один или более агентов РНКи, которые ингибируют экспрессию гена HBV. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи включает молекулы малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты (миРНК) для ингибирования экспрессии гена HBV у млекопитающего, например, у инфицированного HBV человека, где миРНК включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии гена HBV, и где область комплементарности составляет 30 нуклеотидов или менее в длину, как правило, 19-24 нуклеотида в длину, и где миРНК при контакте с клеткой, экспрессирующей ген HBV, ингибирует экспрессию гена HBV по меньшей мере на 10%, как это оценивается, например, методом, основанным на ПЦР или разветвленной ДНК (рДНК), или методом на основе белка, таким как вестерн-блот. Экспрессию гена HBV в клеточной культуре или экспрессию клеточного гена в качестве суррогата экспрессии гена HBV (например, Smc5/6), например, в клетках COS, клетках HeLa, первичных гепатоцитах, клетках HepG2, первичных культивируемых клетках или в биологическом образце от субъекта, можно анализировать путем измерения уровней мРНК HBV, например, с помощью анализа рДНК или TaqMan, или путем измерения уровней белка, например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа, используя, например, методы вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

миРНК включает две цепи РНК, которые являются комплементарными и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет использоваться миРНК. Одна цепь миРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна и, как правило, полностью комплементарна последовательности-мишени. Целевая последовательность может быть получена из последовательности мРНК, образованной во время экспрессии гена HBV. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, которая комплементарна антисмысловой цепи, так что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как правило, дуплексная структура составляет от 15 до 30 включительно, в более общем плане от 18 до 25 включительно, но в более общем плане от 19 до 24 включительно и в большинстве случаев от 19 до 21 пары оснований в длину включительно. Аналогичным образом, область комплементарности к целевой последовательности составляет от 15 до 30 включительно, в более общем плане от 18 до 25 включительно, в более общем плане от 19 до 24 включительно и в наиболее общем плане от 19 до 21 нуклеотида в длину включительно. В некоторых вариантах реализации изобретения длина миРНК составляет от 15 до 20 нуклеотидов включительно, а в других вариантах реализации изобретения длина миРНК составляет от 25 до 30 нуклеотидов включительно. Как будет понятно обычному специалисту в данной области техники, целевая область РНК, нацеленная на расщепление, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях "часть" мишени мРНК представляет собой смежную последовательность мишени мРНК достаточной длины, чтобы быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т.е. расщепления через RISC-путь). миРНК, имеющие дуплексы длиной всего 9 пар оснований, могут при некоторых обстоятельствах опосредовать РНКи-направленное расщепление РНК. Чаще всего мишень имеет длину не менее 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения длина мишени составляет 15-30 нуклеотидов.

Специалисту в данной области техники также будет понятно, что дуплексная область представляет собой первичную функциональную часть миРНК, например, дуплексную область от 9 до 36, например, 15-30 пар оснований. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения, в той степени, в которой он превращается в функциональный дуплекс, состоящий, например, из 15-30 пар оснований, который нацелен на желаемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексную область более 30 пар оснований, представляет собой миРНК. Таким образом, специалисту в данной области техники будет понятно, что в некоторых

вариантах реализации изобретения микроРНК представляет собой миРНК. В некоторых других вариантах реализации изобретения миРНК не является природной микроРНК. В некоторых вариантах реализации агент РНКи, пригодный для нацеливания на экспрессию гена HBV, не генерируется в клетке-мишени путем расщепления более крупной двухцепочечной РНК.

миРНК, описанная в настоящем документе, может быть синтезирована стандартными способами, известными в данной области техники, например, с использованием автоматизированного синтезатора ДНК, такого как коммерчески доступные от, например, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

В некоторых вариантах реализации изобретения агент РНКи содержит миРНК, которая нацеливается и ингибирует экспрессию мРНК HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения агент РНКи содержит миРНК, которая нацеливается и ингибирует экспрессию мРНК, кодируемой геномом HBV в соответствии с эталонной последовательностью NCBI NC_003977.2 (номер GenBank GI:21326584) (SEQ ID NO: 116). Транскрипция генома HBV приводит к полицистронным, перекрывающимся РНК, и, следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения миРНК комбинированной терапии, нацеленной на один ген HBV, может приводить к значительному ингибированию экспрессии большинства или всех транскриптов HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения целевая мРНК для миРНК может представлять собой мРНК, кодируемую: геном P, нуклеотидами 2309-3182 и 1-1625 NC_003977.1; геном S (кодирующим белки L, M и S), нуклеотидами 2850-3182 и 1-837 NC_003977; белком X, нуклеотидами 1376-1840 NC_003977; и/или геном C, нуклеотидами 1816-2454 NC_003977.

В некоторых вариантах реализации изобретения миРНК нацеливается и ингибирует экспрессию мРНК, кодируемой геном X HBV. В некоторых вариантах реализации агент РНКи или миРНК нацеливается на мРНК, кодируемую частью генома HBV, содержащей последовательность GTGTGCACTTCGCTTCAC (SEQ ID NO: 117), которая соответствует нуклеотидам 1579-1597 NC_003977.2 (номер GenBank GI:21326584) (SEQ ID NO: 116).

В дополнительных вариантах реализации изобретения миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 118), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 119).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии гена HBV содержит миРНК, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем смысловая цепь содержит SEQ ID NO: 118, или последовательность, которая отличается не более чем на 4,

не более чем на 3, не более чем на 2 или не более чем на 1 нуклеотид от SEQ ID NO: 118; и при этом антисмысловая цепь содержит SEQ ID NO: 119, или последовательность, которая отличается не более чем на 4, не более чем на 3, не более чем на 2 или не более чем на 1 нуклеотид от SEQ ID NO: 119.

В одном аспекте миРНК будет содержать по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую и антисмысловую последовательность, в результате чего смысловая последовательность содержит SEQ ID NO: 118, а соответствующая антисмысловая последовательность содержит SEQ ID NO: 119. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, генерируемой при экспрессии гена HBV. Таким образом, в этом аспекте миРНК будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь смысловой цепи. Как описано в другом месте настоящего документа и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности миРНК также могут содержаться в виде самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, в отличие от отдельных олигонуклеотидов.

В дополнительных вариантах реализации изобретения миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3' (SEQ ID NO: 120), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO: 121).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии гена HBV содержит миРНК, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем смысловая цепь содержит SEQ ID NO: 120, или последовательность, которая отличается не более чем на 4, не более чем на 3, не более чем на 2 или не более чем на 1 нуклеотид от SEQ ID NO: 120; и при этом антисмысловая цепь содержит SEQ ID NO: 121, или последовательность, которая отличается не более чем на 4, не более чем на 3, не более чем на 2 или не более чем на 1 нуклеотид от SEQ ID NO: 121.

В одном аспекте миРНК будет содержать по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую и антисмысловую последовательность, в результате чего: смысловая последовательность содержит SEQ ID NO: 120, а соответствующая антисмысловая последовательность содержит SEQ ID NO: 121. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, генерируемой при экспрессии гена HBV. Таким образом, в этом аспекте миРНК будет

включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь, а второй олигонуклеотид описан как антисмысловая цепь, соответствующая смысловой цепи. Как описано в другом месте настоящего документа и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности миРНК также могут содержаться в виде самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, в отличие от отдельных олигонуклеотидов.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, что миРНК, имеющие дуплексную структуру от 20 до 23, но конкретно 21 пару оснований, были признаны особенно эффективными в индуцировании интерференции РНК (Elbashir, et al., EMBO 20:6877-88 (2001)). Однако также обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК тоже могут быть эффективными. В вариантах реализации, описанных выше, миРНК, описанные в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере одну цепь длиной не менее 21 нуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 или SEQ ID NO: 121 за вычетом лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, являются одинаково эффективными по сравнению с миРНК, описанными выше. Следовательно, миРНК, имеющие частичную последовательность по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из одной или обеих из SEQ ID NO: 118 и SEQ ID NO: 119 и отличающиеся своей способностью ингибировать экспрессию гена HBV не более чем на 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования миРНК, содержащей полную последовательность, рассматриваются в соответствии с технологией, описанной в настоящем документе. Также в настоящем изобретении раскрыты миРНК, имеющие частичную последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из одной или обеих из SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 121 и отличающиеся своей способностью ингибировать экспрессию гена HBV не более чем на 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования миРНК, содержащей полную последовательность, в соответствии с технологией, описанной в настоящем документе.

Кроме того, миРНК, представленные в настоящем документе, идентифицируют сайт в транскрипте гена HBV, который восприимчив к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, технология, описанная в настоящем документе, дополнительно включает агенты РНКи, которые нацелены на одну из таких последовательностей. Как используется в настоящем документе, агент РНКи нацелен на конкретный сайт транскрипта РНК, если РНКи способствует расщеплению транскрипта где-либо в пределах этого конкретного сайта. В некоторых вариантах реализации агент

РНКи содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из одной или обеих последовательностей SEQ ID NO: 118 и SEQ ID NO: 119, связанных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, смежной с выбранной последовательностью в гене HBV. В некоторых вариантах реализации агент РНКи содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из одной или обеих последовательностей SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 121, связанных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, смежной с выбранной последовательностью в гене HBV.

Хотя длина последовательности-мишени обычно составляет 15-30 нуклеотидов, существуют значительные различия в пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для направления расщепления любой данной РНК-мишени. Различные пакеты программного обеспечения и рекомендации, представленные в настоящем документе, обеспечивают руководство для идентификации оптимальных целевых последовательностей для любой данной генной мишени, но также может быть использован эмпирический подход, в котором "окно" или "маска" заданного размера (в качестве неограничивающего примера, 21 нуклеотид) буквально или условно (включая, например, in silico) помещается на целевую последовательность РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить целевыми последовательностями. Путем постепенного перемещения "окна" последовательности на один нуклеотид выше или ниже от исходного местоположения последовательности-мишени можно идентифицировать следующую потенциальную последовательность-мишень до тех пор, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для любого выбранного заданного размера мишени. Этот процесс в сочетании с систематическим синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с использованием анализов, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники) для идентификации тех последовательностей, которые работают оптимально, может идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании на агент РНКи опосредуют лучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Предполагается, что дальнейшая оптимизация эффективности ингибирования может быть достигнута путем постепенного "прохождения окна" на один нуклеотид выше или ниже от заданных последовательностей для идентификации последовательностей с одинаковыми или лучшими характеристиками ингибирования.

Кроме того, предполагается, что для любой идентифицированной последовательности, например, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 или SEQ ID NO: 121, дальнейшая оптимизация может быть достигнута путем

систематического добавления или удаления нуклеотидов для генерирования более длинных или более коротких последовательностей и тестирования тех и других последовательностей, генерируемых при ходьбе по окну более длинного или более короткого размера вверх или вниз по целевой РНК от этой точки. Опять же, сочетание этого подхода к получению новых кандидатов мишеней с тестированием эффективности агентов РНКи на основе этих последовательностей-мишеней в анализе ингибирования, как известно в данной области техники или как описано в настоящем документе, может привести к дальнейшему повышению эффективности ингибирования. Кроме того, такие оптимизированные последовательности могут быть скорректированы, например, путем введения модифицированных нуклеотидов, как описано в настоящем документе или как известно в данной области техники, добавления или изменения липкого конца или других модификаций, как известно в данной области техники и/или обсуждается в настоящем документе, для дальнейшей оптимизации молекулы (например, увеличения стабильности в сыворотке или периода полураспада в кровотоке, повышения термической стабильности, усиления трансмембранной доставки, нацеливания на конкретное местоположение или тип клеток, увеличения взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, увеличения высвобождения из эндосом и т. д.) в качестве ингибитора экспрессии.

Агент РНКи, как описано в настоящем документе, может содержать одно или более несоответствий целевой последовательности. В некоторых вариантах реализации агент РНКи, как описано в настоящем документе, содержит не более 3 несоответствий. В некоторых вариантах реализации изобретения, если антисмысловая цепь агента РНКи содержит несоответствия целевой последовательности, область несоответствия не расположена в центре области комплементарности. В конкретных вариантах реализации изобретения, если антисмысловая цепь агента РНКи содержит несоответствия с последовательностью-мишенью, несоответствие ограничивается в пределах последних 5 нуклеотидов с 5'- или 3'-конца области комплементарности. Например, для цепи РНК агента РНКи из 23 нуклеотидов, которая комплементарна области гена HBV, цепь РНК может не содержать какого-либо несоответствия в центральных 13 нуклеотидах. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области техники, могут быть использованы для определения того, является ли агент РНКи, содержащий несоответствие целевой последовательности, эффективным в ингибировании экспрессии гена HBV. Рассмотрение эффективности агентов РНКи с несоответствиями в ингибировании экспрессии гена HBV имеет важное значение, особенно если известно, что

конкретная область комплементарности в гене HBV имеет полиморфную вариацию последовательности.

b. Химически модифицированные агенты РНКи

В некоторых вариантах осуществления РНК агента РНКи, например, миРНК, химически модифицирована для повышения стабильности или других полезных характеристик. Нуклеиновые кислоты, представленные в технологии, описанной в настоящем документе, могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными в данной области техники, такими как те, которые описаны в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L., et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, способы которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Модификации включают, например, (a) концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгация, инвертированные связи и т.д.), 3'-концевые модификации (конъюгация, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.д.), (b) модификации оснований, например, замена стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пару с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (безазотистых нуклеотидов) или сопряженных оснований, (c) модификации сахара (например, в положении 2' или 4') или замена сахара, а также (d) модификации остова, включая модификацию или замену сложных фосфодиэфиррных связей. Конкретные примеры соединений РНК, пригодных в вариантах реализации, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природных межнуклеозидных связей. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают, среди прочего, те, которые не имеют атома фосфора в остове. Для целей настоящего описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, которые не имеют атома фосфора в их межнуклеозидной цепи, также могут считаться олигонуклеозидами. В конкретных вариантах реализации изобретения модифицированная РНК будет иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Необязательно, чтобы все позиции в данном соединении были равномерно модифицированы, и фактически более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в агенте РНКи. Технология, описанная в настоящем документе, также включает соединения агента РНКи, которые являются химерными соединениями. "Химерные" соединения агента РНКи или "химеры"

в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения агента РНКи, такие как миРНК, которые содержат две или более химически отличные области, каждая из которых состоит по меньшей мере из одной мономерной единицы, то есть нуклеотида в случае соединения миРНК. Эти агенты РНКи обычно содержат по меньшей мере одну область, в которой РНК модифицирована таким образом, чтобы придавать агенту РНКи повышенную устойчивость к деградации нуклеазы, повышенное клеточное поглощение и/или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительная область агента РНКи может служить субстратом для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКаза Н представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Таким образом, активация РНКазы Н приводит к расщеплению РНК-мишени, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования экспрессии гена агентом РНКи. Следовательно, сопоставимые результаты часто могут быть получены с более короткими агентами РНКи, когда используются химерные миРНК, по сравнению с тиофосфатными дезоксимиРНК, гибридизующимися с той же целевой областью. Расщепление РНК-мишени может быть обычно обнаружено с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, связанных с ним методов гибридизации нуклеиновых кислот, известных в данной области техники.

Модифицированные РНК-основы включают, например, тиофосфаты, хиральные тиофосфаты, фосфодитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминоалкилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфоамидаты, включая 3'-аминофосфоамидат и аминоалкилфосфоамидаты, тионофосфоамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и борофосфосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, 2'-5' связанные аналоги одних и других), имеющие инверсную полярность, при этом соседние пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот.

Иллюстративные патенты США, в которых описано получение вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают, но не ограничиваются ими, патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6 239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590;

6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029; и патент США RE39464; каждый из которых включен сюда в качестве ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора, имеют остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. К ним относятся те, которые имеют морфолиновые связи (образованные частично из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленгидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, имеющие смешанные компоненты N, O, S и CH2.

Иллюстративные патенты США, в которых описано получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают, но не ограничиваются ими, патенты США № № 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; и 5677439; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки для информации, относящейся к таким способам получения.

В других вариантах реализации изобретения подходящие РНК-миметики, подходящие для применения в агентах РНКи, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, то есть остов, нуклеотидных единиц заменены новыми группами. Основания сохраняют для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными гибридизационными свойствами, называется пептидной нуклеиновой кислотой (ПНК). В соединениях ПНК сахарный остов РНК заменяется амидсодержащим остовом, в частности аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания сохраняются и прямо или опосредованно связаны с атомами азота аза амидной части остова. Иллюстративные патенты США, в которых описано получение соединений ПНК, включают, но не ограничиваются ими, патенты США № № 5539082; 5714331; и 5719262; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в отношении учений, относящихся к таким способам получения. Дальнейшее руководство по соединениям ПНК можно найти, например, в Nielsen, et al. (Science, 254:1497-1500 (1991)).

Некоторые варианты реализации изобретения, представленные в технологии, описанной в настоящем документе, включают РНК с тиофосфатными остовами и олигонуклеозидами с гетероатомными остовами, и в частности $-CH_2-NH-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [известные как метиленовый (метилимино) или MMI остов], $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$, и $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ [где нативный сложный фосфодиэфирный остов представлен как $-O-P-O-CH_2-$] из патента США № 5489677, и амидные остовы патента США № 5602240. В некоторых вариантах реализации изобретения РНК, представленные в настоящем документе, имеют морфолиновые остовные структуры согласно патенту США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или более замещенных сахарных фрагментов. Агенты РНКи, например, миРНК, представленные в настоящем документе, могут включать одно из следующего в положении 2': OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил; где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C_1-C_{10} алкилом или C_2 - C_{10} алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$, где n и m представляют собой от 1 до около 10. В других вариантах реализации изобретения миРНК включают одно из следующего в положении 2': C_1-C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH_3, OCN, CI, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силил, группу расщепления РНК, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств агента РНКи или группу для улучшения фармакодинамических свойств агента РНКи и другие заместители, имеющие сходные свойства. В некоторых вариантах реализации изобретения модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-$O-CH_2CH_2OCH_3$, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-MOE) (Martin, et al., Helv. Chim. Acta 78:486-504 (1995)), то есть алкокси-алкоксигруппа. Другая иллюстративная модификация представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, то есть группу $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, также известную как 2'-DMAOE, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известную в данной области техники как 2^*-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2^*-DMAEOE), то есть $2^*-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2)_2$.

Другие типовые модификации включают 2'-метокси (2'-OCH_3), 2'-аминопропокси (2-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$), и 2'-фтор (2'-F). Аналогичные модификации также могут быть сделаны в других положениях РНК агента РНКи, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных миРНК и 5'-положении 5'-концевого

нуклеотида. Агенты РНКи также могут иметь сахаро-миметики, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара.

Иллюстративные патенты США, в которых описано получение таких модифицированных сахарных структур, включают, но не ограничиваются ими, патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; и 5700920; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки для информации, относящейся к таким способам получения.

Агент РНКи также может включать модификации или замены нуклеиновых оснований (часто упоминаемые в данной области техники просто как "основания"). В данном контексте "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-ме-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают нуклеиновые основания, описанные в патенте США № 3687808, описанные в публикации Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine (Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, (2008)); те, которые раскрыты в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering (страницы 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons (1990)), раскрытые Englisch et al. (Angewandte Chemie, International Edition, 30, 613 (1991)), и те, которые раскрыты Sanghvi, Y S. (Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press (1993)). Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно полезны для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в технологии, описанной в настоящем документе. К ним относятся 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замены 5-метилцитозина повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC

Press, Boca Raton, pp. 276-278 (1993)) и являются типовыми заменами оснований, особенно в сочетании с модификациями сахара 2'-О-метоксиэтил.

Иллюстративные патенты США, в которых описано получение некоторых из указанных выше модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, но не ограничиваются ими, патент США № 3687808; патенты США № 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки на соответствующие способы получения.

РНК агента РНКи также может быть модифицирована для включения одной или более блокированных нуклеиновых кислот (LNA). Замкнутая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный рибозный фрагмент, в котором рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-углероды. Эта структура эффективно "блокирует" рибозу в 3'-концевой структурной конформации. Было показано, что добавление блокированных нуклеиновых кислот к миРНК повышает стабильность миРНК в сыворотке и снижает побочные эффекты (Elmen, J., et al., Nucleic Acids Research 33(l):439-47 (2005); Mook, O.R., et al., Mol Cane Ther 6(3):833-43 (2007); Grunweller, A., et al., Nucleic Acids Research 31(12):3185-93 (2003)).

Иллюстративные патенты США, в которых описано получение блокированных нуклеотидов нуклеиновых кислот, включают, но не ограничиваются ими, следующие: патенты США №№ 6268490; 6670461; 6794499; 6998484; 7053207; 7084125; и 7399845; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки для рекомендаций, относящихся к таким способам получения.

В некоторых вариантах реализации изобретения комбинированная терапия включает миРНК, которая модифицирована для включения одной или более аденозин-гликолевых нуклеиновых кислот ("ГНК"). Описание аденозин-ГНК можно найти, например, в Zhang, et al. (JACS 127(12):4174–75 (2005)).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы и родственные композиции, где РНКи представляет собой миРНК, содержащую олигонуклеотидную последовательность, имеющую один или более модифицированных нуклеотидов. Сокращения для нуклеотидных мономеров в модифицированных последовательностях нуклеиновых кислот, используемых в настоящем документе, приведены в таблице 5.

Таблица 5. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемых в представлении модифицированных последовательностей нуклеиновых кислот. Следует понимать, что, если не указано иное, эти мономеры, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3 '-фосфотиоат
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат

Сокращение	Нуклеотид(ы)
u	2'-O-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-O-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол (также называемый "Гип-(GalNAc-алкил)3")
(Agn)	аденозингликолевая нуклеиновая кислота (ГНК)
dA	2 '-дезоксиаденозин-3'-фосфат
dAs	2 '-дезоксиаденозин-3'-фосфотиоат
dC	2 '-дезоксицитидин-3'-фосфат
dCs	2 '-дезоксицитидин-3'-фосфотиоат
dG	2 '-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2 '-дезоксигуанозин-3'-фосфотиоат
dT	2 '-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2 '-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2 '-дезоксиуридин
dUs	2 '-дезоксиуридин-3'-фосфотиоат

В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии гена HBV содержит миРНК, причем миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 122), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 123).

В дополнительных вариантах реализации изобретения миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 124), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 125).

В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор экспрессии гена HBV содержит миРНК, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем смысловая цепь содержит SEQ ID NO: 122 или SEQ ID NO: 124, или последовательность, которая отличается не более чем на 4, не более чем на 3, не более чем на 2 или не более чем на 1 нуклеотид из SEQ ID NO: 122 или SEQ ID NO: 124, соответственно.

В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор экспрессии гена HBV содержит миРНК, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь содержит SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 125, или последовательность, которая отличается не более чем на 4, не более чем на 3, не более чем

на 2 или не более чем на 1 нуклеотид из SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 125, соответственно.

В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор экспрессии гена HBV содержит миРНК, причем миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuaL96-3' (SEQ ID NO: 126), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID NO: 127).

В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор экспрессии гена HBV содержит миРНК, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем смысловая цепь содержит SEQ ID NO: 126, или последовательность, которая отличается не более чем на 4, не более чем на 3, не более чем на 2 или не более чем на 1 нуклеотид из SEQ ID NO: 126.

с. Лиганд-конъюгированные РНКи агенты

В некоторых вариантах реализации агент РНКи включает модификации, включающие химическое связывание с РНК одного или более лигандов, фрагментов или конъюгатов, которые усиливают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение агента РНКи. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, липидные фрагменты, такие как холестериновый фрагмент (Letsinger, et al., Proc. Natl. Acid. Sci. USA 86:6553-56 (1989)), холевую кислоту (Manoharan, et al., Biorg. Med. Chem. Let. 4:1053-60 (1994)), тиоэфир, например, берил-S-тритилтиол (Manoharan, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:306-9 (1992); Manoharan, et al., Biorg. Med. Chem. Let. 3:2765-70 (1993)), тиохолестерин (Oberhauser, et al., Nucl. Acids Res. 20:533-38 (1992)), алифатическую цепи, например, додекандиол или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras, et al., EMBO J 10:1111-18 (1991); Kabanov, et al., FEBS Lett. 259:327-30 (1990); Svinarchuk, et al., Biochimie 75:49-54 (1993)), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рак-глицерин или триэтил-аммоний 1,2-ди-О-гексадецил-рак-глицеро-3-фосфонат (Manoharan, et al., Tetrahedron Lett. 36:3651-54 (1995); Shea, et al., Nucl. Acids Res. 18:3777-83 (1990)), полиамин или цепь полиэтиленгликоля (Manoharan, et al., Nucleosides & Nucleotides 14: 969-73 (1995)) или адамантановую уксусную кислоту (Manoharan, et al., Tetrahedron Lett. 36:3651-54 (1995)), пальмитиловый фрагмент (Mishra, et al., Biochim. Biophys. Acta 1264:229-37 (1995)), или октадециламиновый или гексиламино-карбонилоксихолестериновый фрагмент (Crooke, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:923-37 (1996)).

В некоторых вариантах реализации изобретения лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни агента РНКи, в который он включен. В некоторых

вариантах реализации изобретения лиганд обеспечивает повышенную аффинность к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клеточному или органному компартменту, ткани, органу или области тела, как, например, по сравнению с видом, отсутствующим в таком лиганде. В таких вариантах реализации изобретения лиганды не будут принимать участие в дуплексном спаривании в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать природное вещество, такое как белок (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли(L-лактид-согликолид), сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил)метакриламидный сополимер (HMPA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВС), полиуретан, поли(2-этилакриловая кислота), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендример-полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичная соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать группы нацеливания, например, клеточный или тканевой агент нацеливания, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с указанным типом клеток, таким как клетка печени. Целевая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок A, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-глюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, витамин A, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD. Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), сшивающие агенты (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные

эндонуклеазы (например, ЭДТА), липофильные молекулы (например, холестерин, холевая кислота, адамантануксусная кислота, 1-пиренмасляная кислота, дигидротестостерон, 1,3-бис-0(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильная группа, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильная группа, пальмитиновая кислота, миристиновая кислота, О-3-(олеоил)литохолевая кислота, О-3-(олеоил)холановая кислота, диметокситритил или феноксазин), пептидные конъюгаты (например, пептид антеннопедии, пептид Tat), алкилирующие агенты, фосфат, амино, меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), МПЭГ, [МПЭГ]2, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), облегчающие транспорт/абсорбцию (например, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, биимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, акридин-имидазольные конъюгаты, Eu3+-комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP и AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфической аффинностью к колиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка печени. Лиганды могут также включать гормоны и гормональные рецепторы. Они также могут включать непептидные виды, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, мультивалентную лактозу, мультивалентную галактозу, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-глюкозамин, мультивалентную маннозу и мультивалентную фукозу. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор p38 MAP киназы или активатор NF-KB.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение агента РНКи в клетку, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается клеткой-мишенью, например, клеткой печени. Типичные витамины включают витамины А, Е и К. Другие типичные витамины включают витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые клетками-мишенями, такими как клетки печени. Также включены HSA и липопротеины низкой плотности (LDL).

В некоторых вариантах реализации изобретения лиганд, присоединенный к агенту РНКи, как описано в настоящем документе, действует как фармакокинетический (ФК) модулятор. В данном контексте "ФК модулятор" относится к фармакокинетическому модулятору. ФК модуляторы включают липофили, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белковые связывающие агенты, ПЭГ, витамины и т.д. Типовые ФК модуляторы включают, но не ограничиваются ими, холестерин, жирные кислоты, холиевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Известно также, что олигонуклеотиды, которые содержат ряд тиофосфатных связей, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из около 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько тиофосфатных связей в каркасе, также поддаются технологии, описанной в настоящем документе, как лиганды (например, как модулирующие ФК лиганды). Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, белки сыворотки), также подходят для применения в качестве модулирующих ФК лигандов в вариантах реализации, описанных в настоящем документе.

(i) Липидные конъюгаты. В некоторых вариантах реализации изобретения лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Липидный или липидный лиганд может (a) повышать устойчивость к деградации конъюгата, (b) увеличивать нацеливание или перенос в клетку-мишень или клеточную мембрану и/или (c) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA. Такой липид или липидная молекула может связывать сывороточный белок, например, человеческий сывороточный альбумин (HSA). HSA-связывающий лиганд обеспечивает распределение конъюгата в ткани-мишени, например, в ткани-мишени тела, не являющейся почкой. Например, целевая ткань может представлять собой печень, включая паренхиматозные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связывать HSA, также могут быть использованы в качестве лигандов. Например, можно использовать непроксин или аспирин.

Лиганд на основе липидов может быть использован для ингибирования, например, контроля связывания конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или липидный лиганд, который сильнее связывается с HSA, с меньшей вероятностью будет нацелен на почку и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выведен из организма. Липид или липидный лиганд, который слабее связывается с HSA, может быть использован для нацеливания конъюгата на почку.

В некоторых вариантах реализации лиганд на основе липида связывает HSA. Лиганд на основе липида может связываться с HSA с достаточной аффинностью, так что конъюгат будет распределен в ткани, отличной от почек. В некоторых конкретных вариантах реализации связывание HSA-лиганда является обратимым.

В некоторых других вариантах реализации лиганд на основе липида связывает HSA слабо или не связывает вообще, так что конъюгат будет распределен в почке. Другие фрагменты, которые нацелены на клетки почек, также могут быть использованы вместо или в дополнение к лиганду на основе липида.

(ii) Пептид и агенты для проникновения в клетки. В другом аспекте лиганд представляет собой агент клеточной проницаемости, такой как спиральный агент клеточной проницаемости. В некоторых вариантах реализации агент является амфипатическим. Типичный агент представляет собой пептид, такой как тат или антеннопедия. Если агент представляет собой пептид, он может быть модифицирован, включая пептидилмиметик, инверторы, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. В некоторых вариантах реализации спиральный агент представляет собой альфа-спиральный агент. В некоторых конкретных вариантах реализации спиральный агент имеет липофильную и липофобную фазы.

"Пептид для проникновения в клетку" способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептид, проникающий в клетку микроба, может представлять собой, например, альфа-спиральный линейный пептид (например, LL-37 или церопин PI), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, а-дефензин, β-дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две доминирующие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин).

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также упоминаемый в настоящем документе как олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную складываться в определенную трехмерную структуру, подобную природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к агентам РНКи может влиять на фармакокинетическое распределение РНКи, например, путем усиления клеточного распознавания и абсорбции. Пептид или пептидомиметический фрагмент может иметь длину около 5-50 аминокислот, например, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид для проникновения в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий в основном из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент

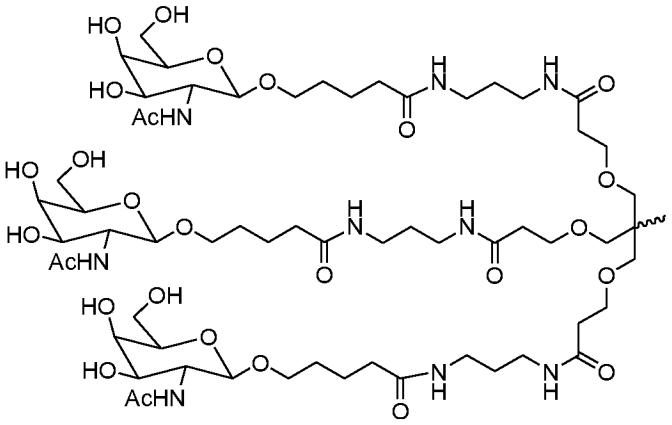
может представлять собой дендримерный пептид, ограниченный пептид или сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать последовательность транслокации гидрофобной мембраны (MTS). Типовой гидрофобный MTC-содержащий пептид представляет собой RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 128). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 129), содержащая гидрофобный MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой пептид "доставки", который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белки через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 130) и белка Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWK (SEQ ID NO: 131)) способны функционировать в качестве пептидов доставки. Пептид или пептидомиметик может быть кодирован случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея, или комбинаторной библиотеки с одним шариком и одним соединением (OBOC) (Lam, et al., Nature 354:82-84 (1991)).

Пептид клеточной проницаемости также может включать в себя сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид для проникновения в клетку может представлять собой двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из слитого пептидного домена ВИЧ-1 gp41 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni, et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-24 (2003)).

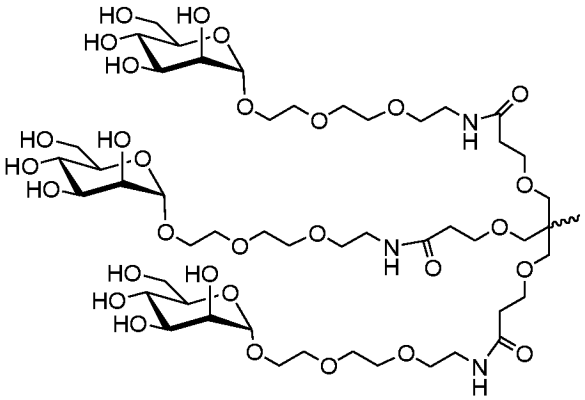
iii) Углеводные конъюгаты. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды агента РНКи, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат углеводные конъюгаты. Углеводные конъюгаты могут быть полезными для доставки нуклеиновых кислот in vivo, а также композиций, подходящих для терапевтического применения in vivo. Используемый в настоящем документе термин "углевод" относится к соединению, которое представляет собой либо углевод per se, состоящий из одной или более моносахаридных единиц, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; либо соединение, содержащее в качестве его части углеводный фрагмент, состоящий из одной или более моносахаридных единиц, каждая из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Репрезентативные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие около 4-9 моносахаридных звеньев) и

полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают C5 и выше (в некоторых вариантах реализации, C5-C8) сахара; и ди- и трисахариды включают сахара, имеющие две или три моносахаридные единицы (в некоторых вариантах реализации, C5-C8).

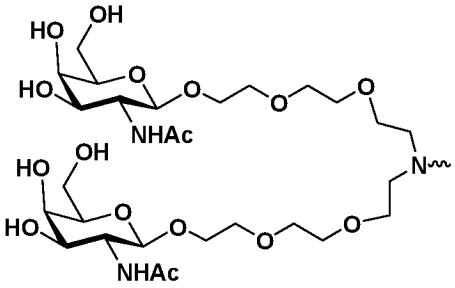
В некоторых вариантах реализации изобретения углеводный конъюгат выбран из группы, состоящей из:



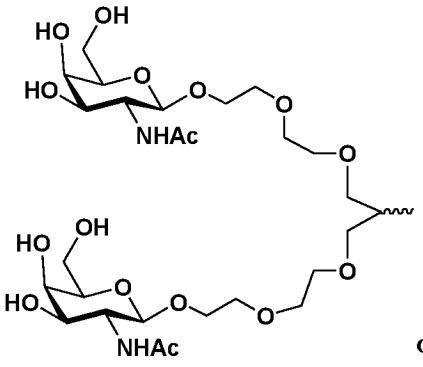
Формула I,



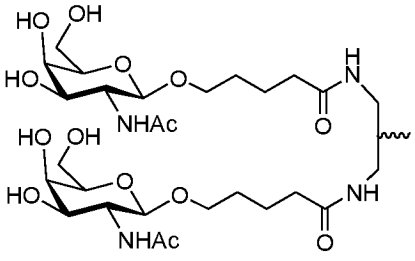
Формула II,



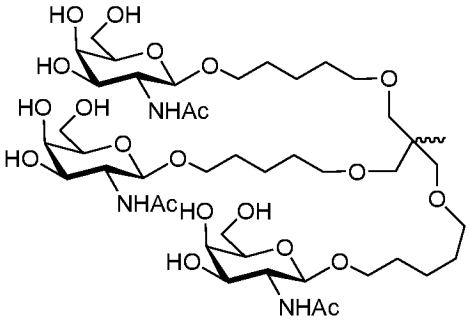
Формула III;



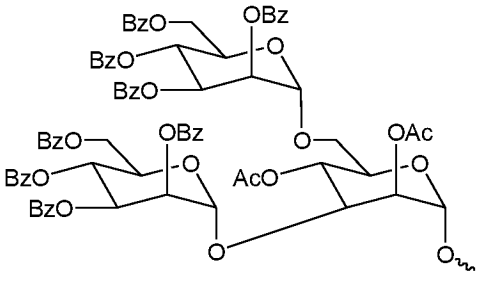
Формула IV,



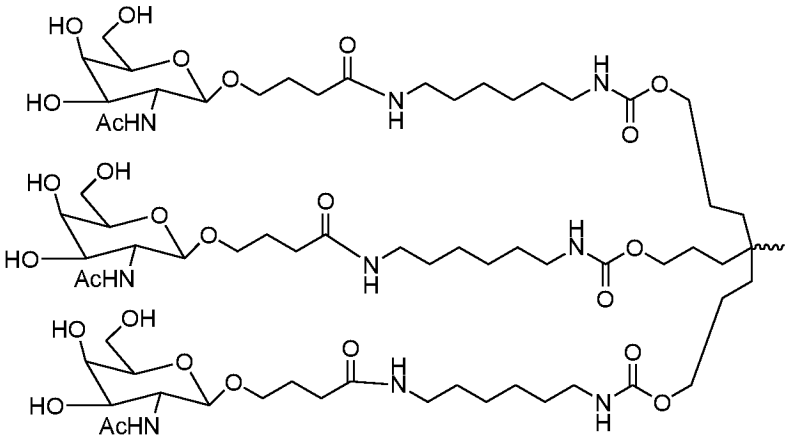
Формула V,



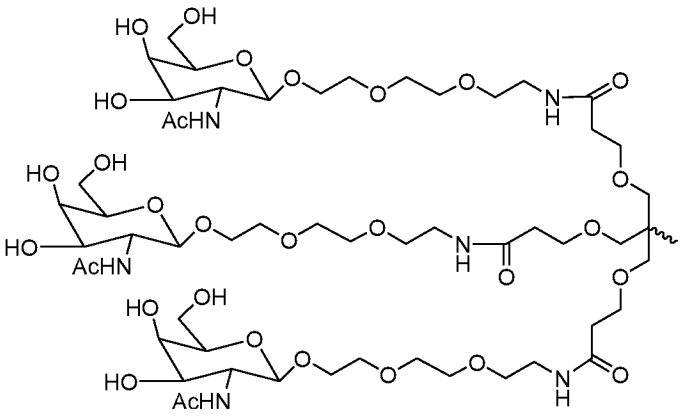
Формула VI,



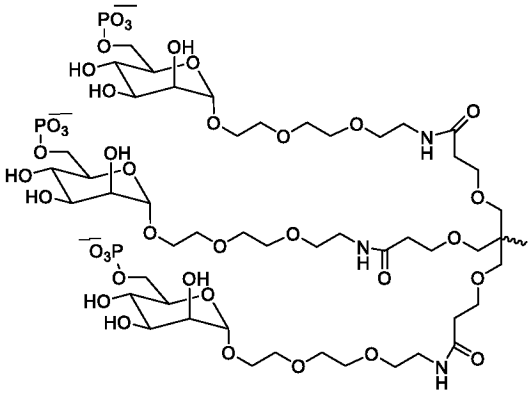
Формула VII,



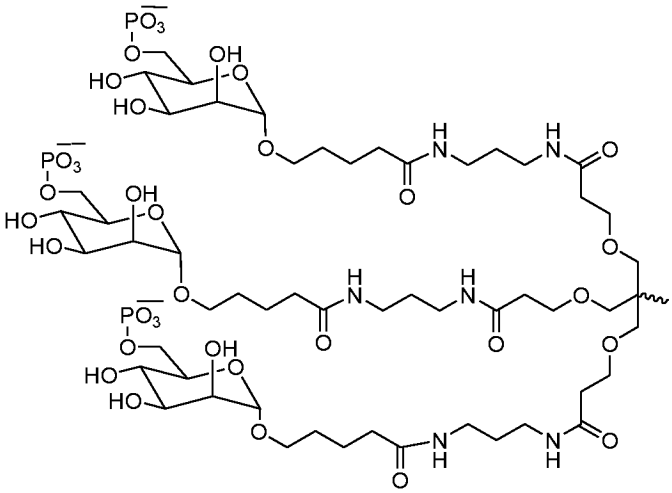
Формула VIII,



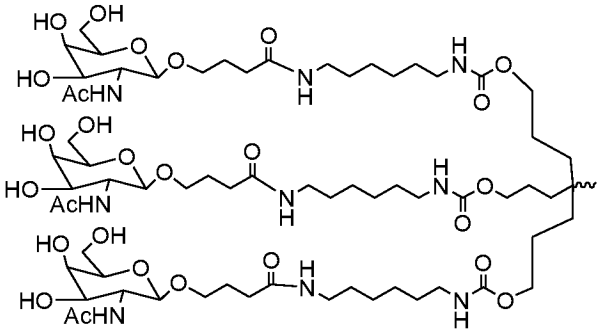
Формула IX,



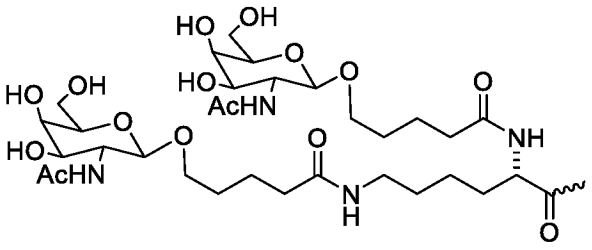
Формула X,



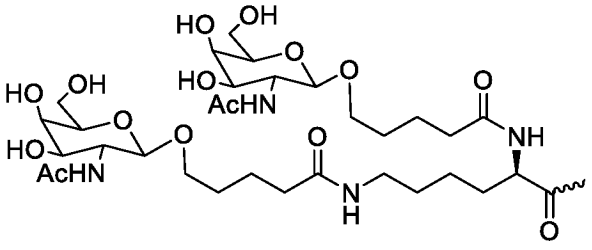
Формула XI,



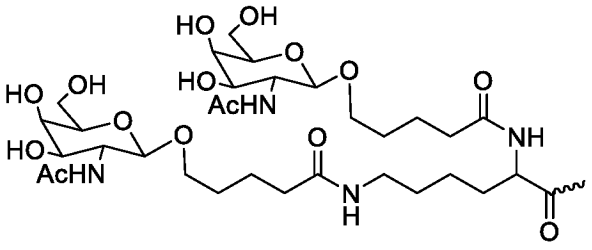
Формула XII,



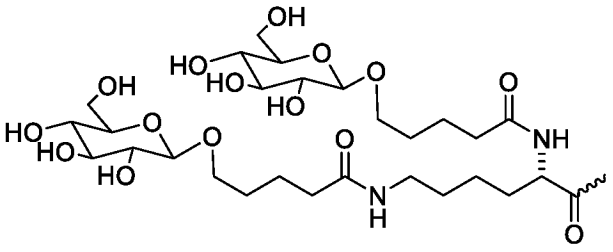
Формула XIII,



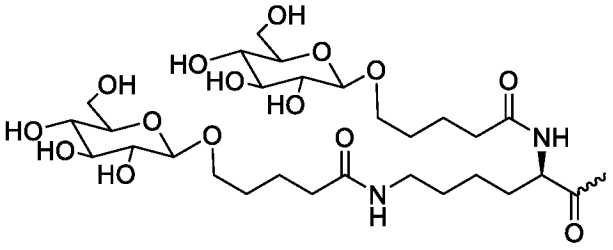
Формула XIV,



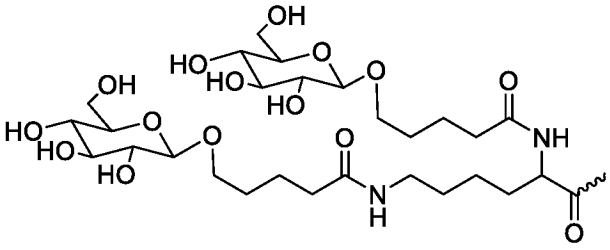
Формула XV,



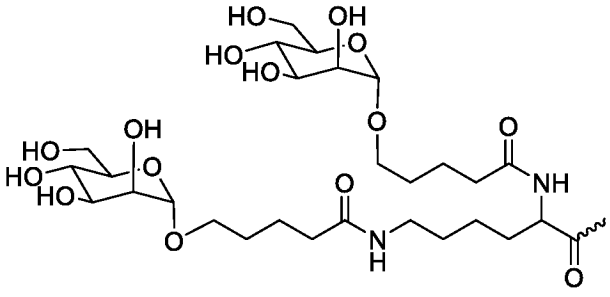
Формула XVI,



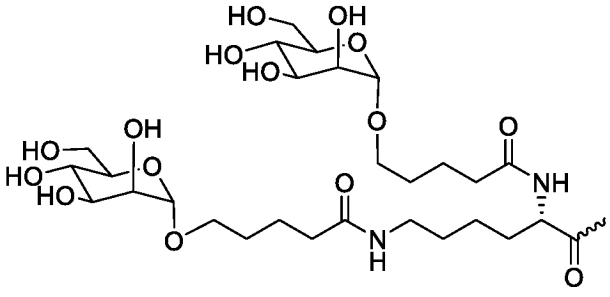
Формула XVII,



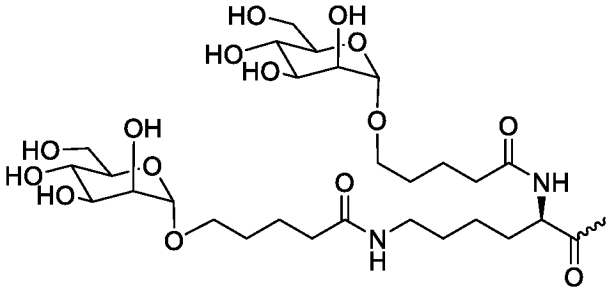
Формула XVIII,



Формула XIX,

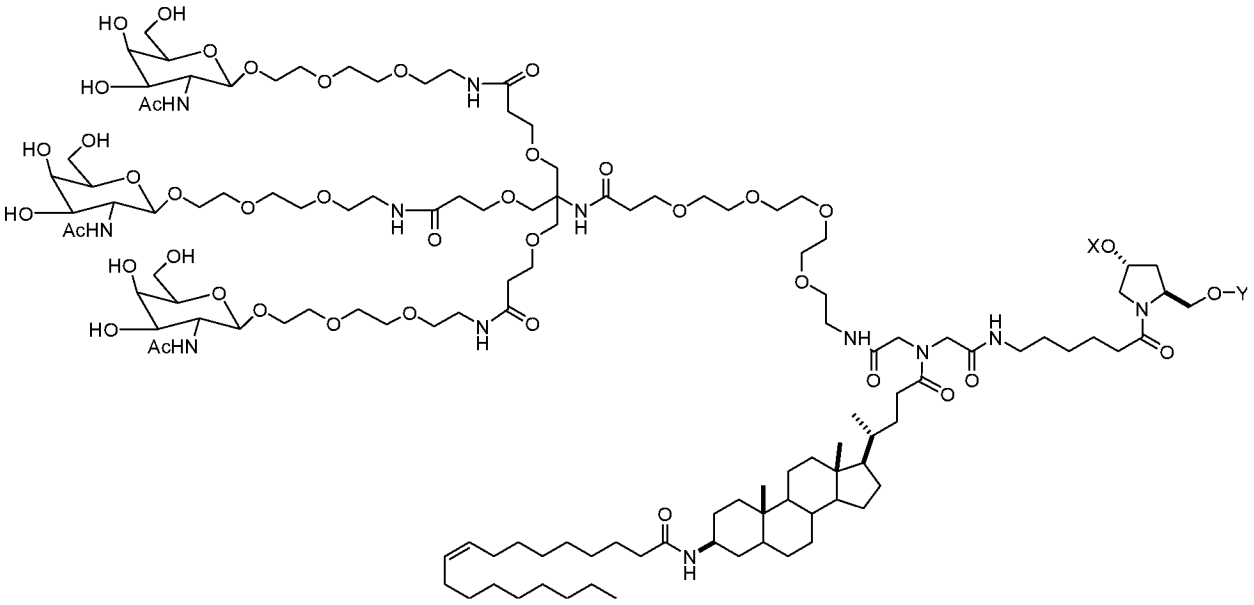


Формула XX, и



Формула XXI.

Другой репрезентативный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается ими,



(Формула XXII), где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах реализации изобретения углеводный конъюгат дополнительно содержит другой лиганд, такой как, но не ограничиваясь ими, ФК (фармакокинетический) модулятор, эндосомолитический лиганд или пептид для проникновения в клетку.

(iv) Линкеры. В некоторых вариантах реализации конъюгаты, описанные в настоящем документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду агента РНКи с различными линкерами, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин "линкер" или "линкерная группа" означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения. Линкеры обычно содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR_8, C(O), C(O)NH, SO, SO_2, SO_2NH, или цепь атомов, такую как, но не ограничиваясь этим замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгерероциклилалкинил,

алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил и алкинилгерероарил, в которых один или несколько метиленов могут быть прерваны или оканчиваются O, S, S(O), SO_2, $N(R_8)$, C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, или замещенный или незамещенный гетероцикл; где R8 представляет собой водород, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер находится между 1-24 атомами, между 4-24 атомами, между 6-18 атомами, между 8-18 атомами или между 8-16 атомами.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая при попадании в клетку-мишень расщепляется для высвобождения двух частей, удерживаемых линкером вместе. В некоторых вариантах реализации расщепляемая линкерная группа расщепляется по меньшей мере в 10 раз или по меньшей мере в 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первом эталонном условии (которое может, например, быть выбрано для имитации или представления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при втором эталонном условии (которое может, например, быть выбрано для имитации или представления условий, обнаруженных в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы восприимчивы к агентам расщепления, например, к pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию деградирующих молекул. Как правило, агенты расщепления более распространены или находятся на более высоких уровнях или активности внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких деградирующих агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не имеют субстратной специфичности, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать окислительно-восстановительно расщепляемую линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислотную среду, например, те, которые приводят к pH пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать кислотно-расщепляемую линкерную группу, действуя в качестве общей кислоты, пептидаз (которые могут быть субстратно-специфичными) и фосфатаз. Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчивой к pH. pH человеческой сыворотки составляет 7,4, в то время как средний внутриклеточный pH немного ниже, в диапазоне от

около 7,1 до 7,3. Эндосомы имеют более кислый pH в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы имеют еще более кислый pH около 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при определенном pH, тем самым высвобождая катионный липид из лиганда внутри клетки или в желаемый компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки-мишени. Например, лиганды, нацеленные на печень, могут быть связаны с катионными липидами через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразой. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легкого, почечной коры и яичка.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, могут быть использованы при нацеливании на типы клеток, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В общем, пригодность расщепляемой связывающей группы-кандидата может быть оценена путем тестирования способности деградирующего агента (или условия) расщеплять связывающую группу-кандидата. Также может быть желательно проверить расщепляемую связывающую группу-кандидата на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым состоянием, где первое выбрано как указывающее на расщепление в клетке-мишени, а второе выбрано как указывающее на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или у целых животных. Может быть полезно провести первоначальные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтвердить дальнейшими оценками на целых животных. В некоторых вариантах реализации изобретения пригодные соединения-кандидаты расщепляют в клетке по меньшей мере в 2, по меньшей мере в 4, по меньшей мере в 10 или по меньшей мере в 100 раз быстрее (или в условиях in vitro, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях in vitro, выбранных для имитации внеклеточных условий).

Один класс расщепляемых линкерных групп представляет собой окислительно-восстановительные расщепляемые линкерные группы, которые расщепляются при восстановлении или окислении. Примером восстановительно расщепляемой линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли

расщепляемая кандидатом линкерная группа подходящей "восстанавливающе расщепляемой линкерной группой" или, например, подходящей для применения с конкретным фрагментом РНКи и конкретным нацеливающим агентом, можно обратиться к способам, описанным в настоящем документе. Например, кандидат может быть оценен путем инкубации с дитиотрейтолом (DTT) или другим восстановителем с использованием реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, клетке-мишени. Кандидаты также могут быть оценены в условиях, которые выбраны для имитации условий крови или сыворотки. В некоторых вариантах реализации изобретения соединения-кандидаты расщепляются не более чем на 10% в крови. В некоторых вариантах реализации изобретения пригодные соединения-кандидаты разрушаются в клетке по меньшей мере в 2, по меньшей мере в 4, по меньшей мере в 10 или по меньшей мере в 100 раз быстрее (или в условиях in vitro, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях in vitro, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления соединений-кандидатов может быть определена с помощью стандартных анализов кинетики ферментов в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

Фосфатные расщепляемые линкерные группы расщепляются агентами, которые разлагают или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примеры связывающих групп на основе фосфатов представляют собой -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O- P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O- P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. В некоторых вариантах реализации изобретения фосфатные линкерные группы выбраны из: -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O- P(0)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O- P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, и -O-P(S)(H)-S-. В конкретных вариантах реализации фосфат-связывающая группа представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

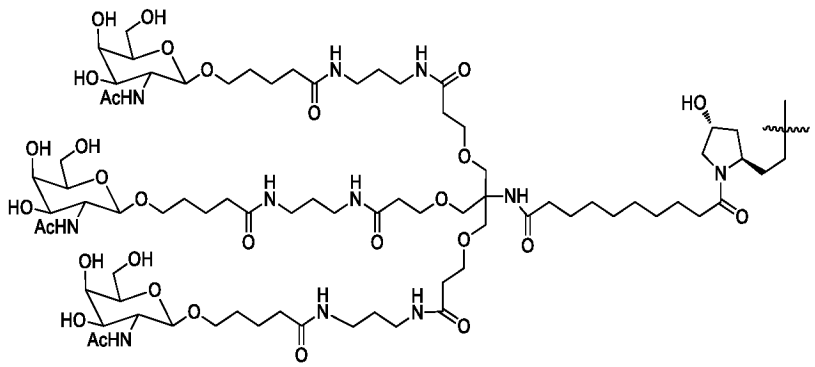
Кислото-расщепляемые линкерные группы представляют собой линкерные группы, которые расщепляются в кислотных условиях. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляют в кислой среде с pH около 6,5 или ниже (например, около 6,0, 5,5, 5,0 или ниже) или с помощью агентов, таких

как ферменты, которые могут действовать как общая кислота. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать среду расщепления для кислото-расщепляемых линкерных групп. Примеры кислото-расщепляемых линкерных групп включают, но не ограничиваются ими, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислото-расщепляемые группы могут иметь общую формулу -C=N-, C(O)O или -OC(O). В некоторых вариантах реализации изобретения углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппы), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

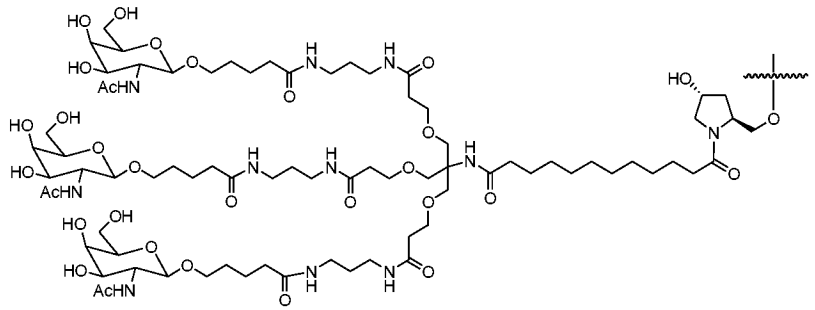
Расщепляемые линкерные группы на основе сложного эфира расщепляются ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых линкерных групп на основе сложного эфира включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложные расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу -C(O)O- или -OC(O)-. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

Расщепляемые линкерные группы на основе пептидов расщепляются ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые линкерные группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептидов не включают амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкинеленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Группа расщепления на основе пептида, как правило, ограничена пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами, дающими пептиды и белки, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые линкерные группы на основе пептидов имеют общую формулу -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB являются R-группами двух смежных аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

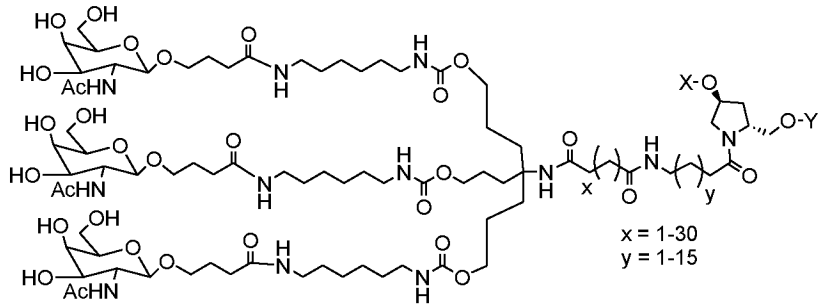
Репрезентативные углеводные конъюгаты с линкерами включают, но не ограничиваются ими,



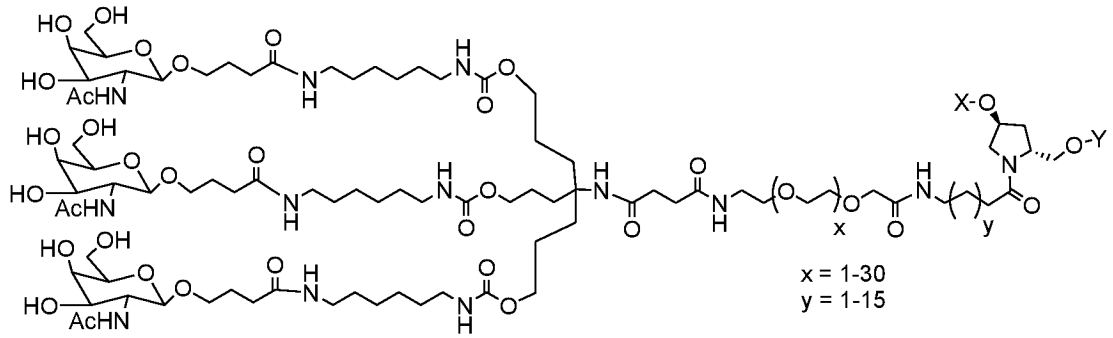
(Формула XXIII),



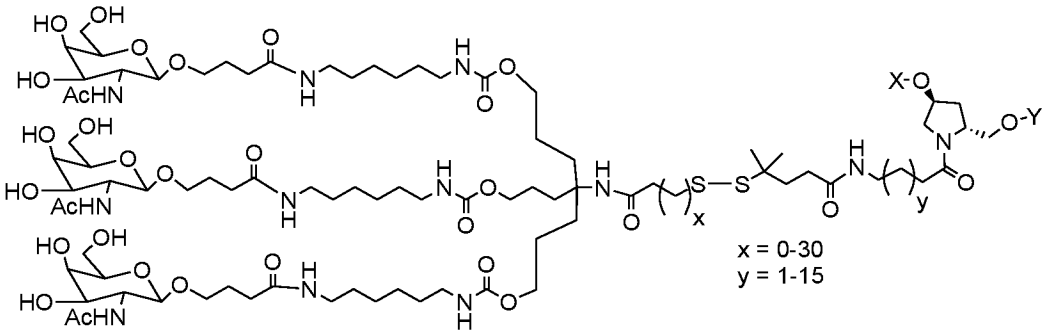
(Формула XXIV),



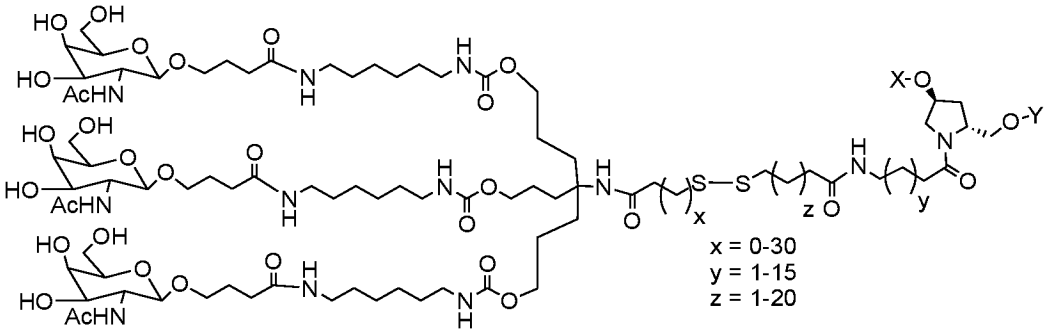
(Формула XXV),



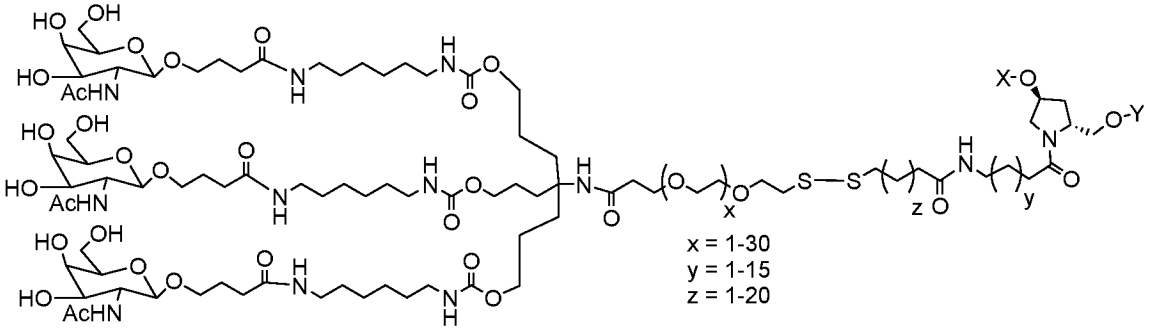
(Формула XXVI),



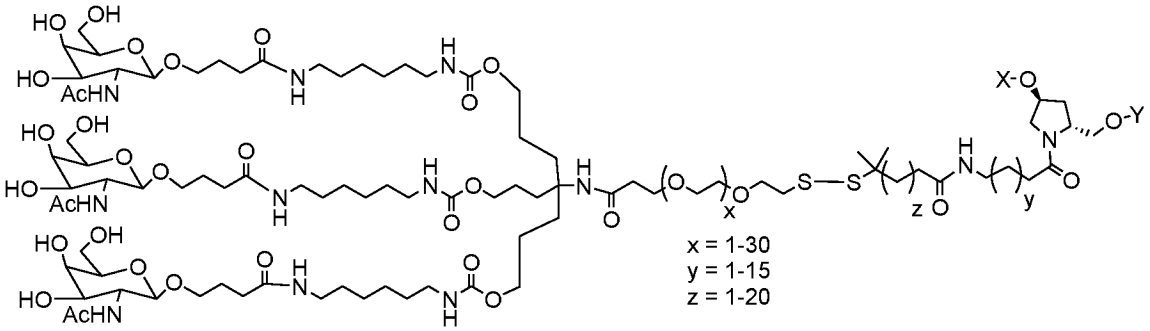
(Формула XXVII),



(Формула XXXVIII),



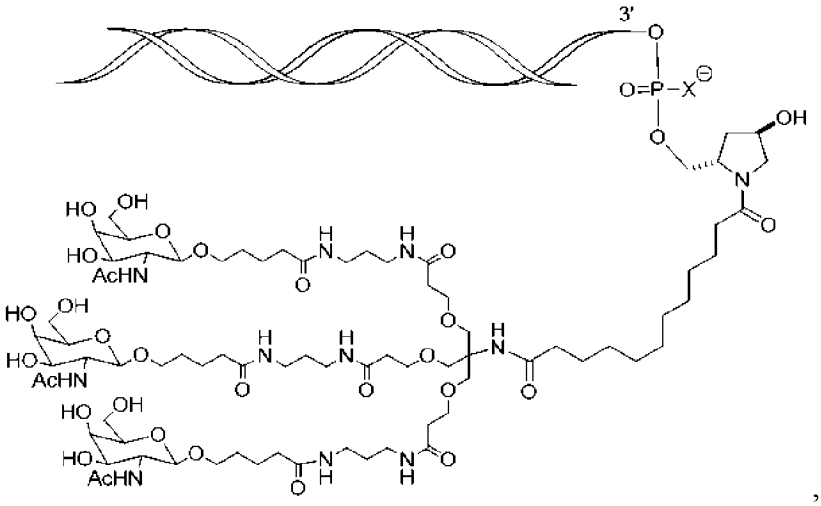
(Формула XXIX) и



(Формула XXX),

где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

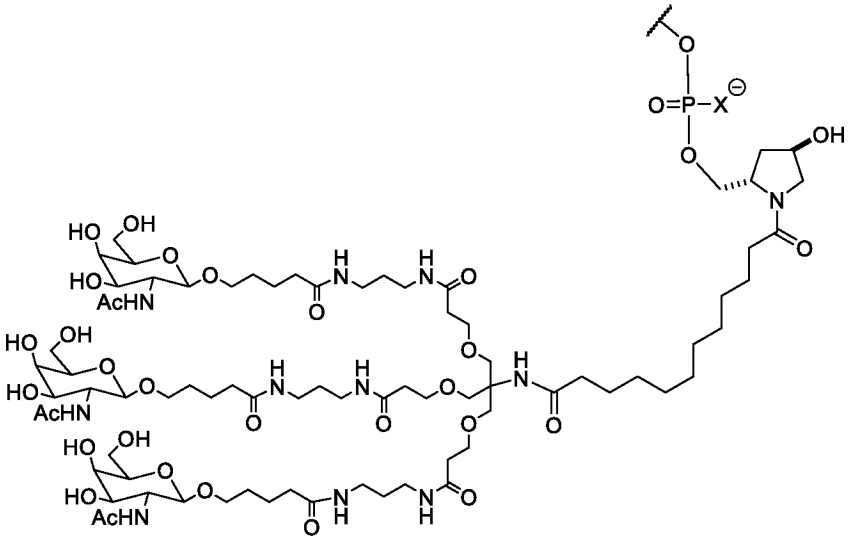
В некоторых вариантах реализации композиций и способов лиганд представляет собой одно или более производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения миРНК конъюгирована с лигандом GalNAc, как показано на следующей структуре:



,

где X представляет собой O или S.

В некоторых вариантах реализации изобретения смысловая цепь миРНК конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце смысловой цепи через линкер, как показано в следующей структуре:

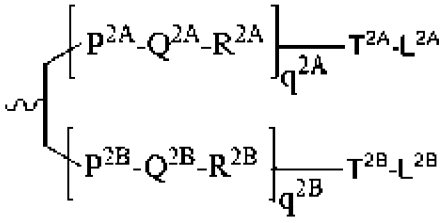


,

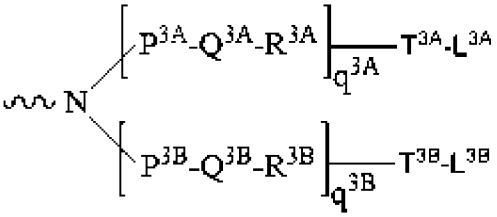
где X представляет собой O или S.

В некоторых вариантах реализации изобретения комбинированная терапия включает миРНК, которая конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным

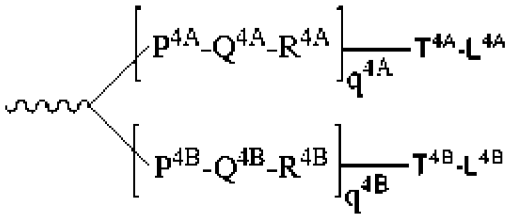
разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой формуле (XXXI) – (XXXIV):



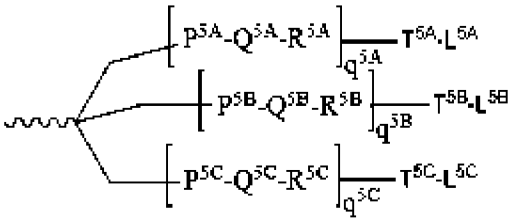
Формула XXXI,



Формула XXXII,



Формула XXXIII или



Формула XXXIV;

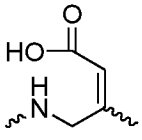
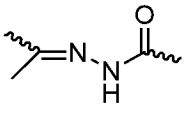
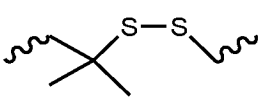
где:

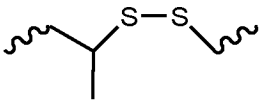
q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B, и q5C представлют собой независимо для каждого случая 0-20, и при этом повторяющаяся единица может быть одинаковой или различной;

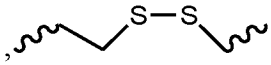
каждыйP^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, и T^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2, CH_2NH, или CH_2O;

Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, и Q^{5C} независимо для каждого случая отсутствуют, алкилен или замещенный алкилен, причем один или более метиленов могут быть прерваны или могут заканчиваться одним или более из O, S, S(O), SO_2, $N(R^N)$, C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

каждый R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, и R^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, NH, O, S, CH_2, C(O)O, C(O)NH, $NHCH(R^a)C(O)$, $-C(O)-CH(R^a)-NH-$, CO,

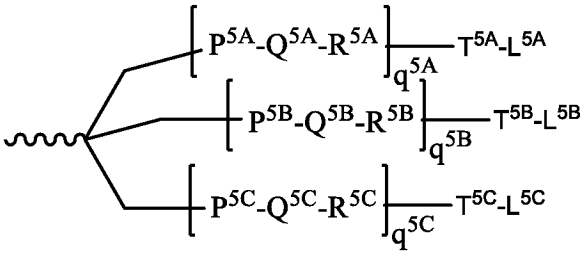
CH=N-O,  ,  ,  ,



, 

или гетероциклил;

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B}, и L^{5C} представляют собой лиганд; т.е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно пригодны для применения с агентами РНКи для ингибирования экспрессии целевого гена, такие как формулы (XXXIV):



Формула XXXIV,

где L^{5A}, L^{5B} и L^{5C} представляют собой моносахарид, такой как производное GalNAc.

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNAc, включают, но не ограничиваются ими, структуры, перечисленные выше в виде формул I, VI, X, IX и XII.

Типичные патенты США, в которых описано получение конъюгатов РНК, включают патенты США №№ 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241 5391723; 5416203 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 и 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; и 7037646; каждый из которых включен здесь в качестве ссылки для информации, относящейся к таким способам получения.

В некоторых случаях РНК агента РНКи может быть модифицирована нелигандной группой. Ряд нелигандных молекул были конъюгированы с агентами РНКи с целью усиления активности, клеточного распределения или клеточного поглощения агентов РНКи, и процедуры для выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе.

Такие нелигандные фрагменты включают липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 365(1):54-61 (2007); Letsinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553 (1989)), холевую кислоту (Manoharan, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:1053 (1994)), тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:306 (1992); Manoharan, et al., Bioorg. Med. Chem. Let. 3:2765 (1993)), тиохолестерин (Oberhauser, et al., Nucl. Acids Res. 20:533 (1992)), алифатическую цепь, например, додекандиола или ундециловых остатков (Saison-Behmoaras, et al., EMBO J. 10:111 (1991); Kabanov, et al., FEBS Lett. 259:327 (1990); Svinarchuk, et al., Biochimie 75:49 (1993)), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рак-глицерин или триэтиламмоний-1,2-ди-О-гексадецил-рак-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan, et al., Tetrahedron Lett. 36:3651-54 (1995); Shea, et al., Nucl. Acids Res. 18:3777 (1990)), полиамин или цепь полиэтиленгликоля (Manoharan, et al., Nucleosides & Nucleotides 14:969 (1995)), или адамантановую уксусную кислоту (Manoharan, et al., Tetrahedron Lett. 36:3651 (1195)), пальмитиловый фрагмент (Mishra, et al., Biochim. Biophys. Acta 1264:229 (1995)), или октадециламиновый или гексиламино-карбонилоксихолестериновый фрагмент (Crooke, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:923 (1996)).

Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих аминолинкер, в одном или более положениях последовательности. Затем аминогруппу подвергают взаимодействию с молекулой, конъюгированной с использованием соответствующего сочетания или активирующих реагентов. Реакцию конъюгации можно проводить либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после расщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

d. Доставка агента РНКи

"Введение в клетку", когда речь идет об агенте РНКи, означает облегчение или осуществление поглощения или абсорбции в клетку, как понимают специалисты в данной области техники.

Всасывание или поглощение агента РНКи может происходить посредством неконтролируемых диффузионных или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Смысл этого термина не ограничивается клетками in vitro; агент РНКи также может быть "введен в клетку", когда клетка является частью живого организма. В таком случае введение в клетку будет включать доставку в организм. Например, для доставки in vivo агент РНКи можно вводить в участок ткани или вводить системно. Доставка in vivo также может осуществляться с помощью системы доставки бета-глюкана, такой как описанные в патенте США №№ 5,032,401 и 5,607,677, и

публикацию США № 2005/0281781, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в отношении информации, относящейся к таким системам доставки. Введение in vitro в клетку включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в настоящем документе ниже или известны в данной области техники.

Доставка агента РНКи субъекту, нуждающемуся в этом, может быть достигнута несколькими различными способами. Доставка in vivo может быть осуществлена непосредственно путем введения композиции, содержащей агент РНКи, например, миРНК, субъекту. Альтернативно, доставка может быть выполнена опосредованно путем введения одного или более векторов, которые кодируют и направляют экспрессию агента РНКи. Эти альтернативы обсуждаются ниже.

В общем, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты может быть адаптирован для применения с агентом РНКи (см., например, Akhtar S. and Julian RL., Trends Cell. Biol. 2(5):139-44 (1992) и WO94/02595, которые включены в настоящий документ посредством ссылки для информации, относящейся к таким способам доставки). Три фактора, которые особенно важны для успешной доставки агента РНКи in vivo: (a) биологическая стабильность доставленной молекулы, (2) предотвращение неспецифических эффектов и (3) накопление доставленной молекулы в ткани-мишени. Неспецифические эффекты агента РНКи могут быть минимизированы путем местного введения, например, путем прямой инъекции или имплантации в ткань (в качестве неограничивающего примера, опухоли) или местного введения препарата. Местное введение в место обработки максимизирует локальную концентрацию агента, ограничивает воздействие агента на системные ткани, которые в противном случае могут быть повреждены агентом или которые могут разрушить агент, и позволяет вводить более низкую общую дозу агента РНКи. Несколько исследований показали успешный нокдаун продуктов генов, когда агент РНКи вводится локально. Например, внутриглазная доставка миРНК VEGF путем интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, M.J., et al., Retina 24:132-38 (2004)) и субретинальные инъекции у мышей (Reich, S.J., et al., Mol. Vis. 9:210-16 (2003)) было показано, что оба метода предотвращают неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дегенерации. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция миРНК у мышей уменьшает объем опухоли (Pille, J., et al., Mol. Ther. 11:267-74 (2005)) и может продлевать выживаемость мышей, имеющих опухоль (Kim, W.J., et al., Mol. Ther. 14:343-50 (2006); Li, S., et al., Mol. Ther. 15:515-23 (2007)). Интерференция РНК также показала успех при локальной доставке в ЦНС путем прямой инъекции (Dorn, G., et al., Nucleic Acids 32:e49 (2004); Tan, P.H., et al., Gene Ther. 12:59-66

(2005); Makimura, H., et al., BMC Neurosci. 3:18 (2002); Shishkina, G.T., et al., Neuroscience 129:521-28 (2004); Thakker, E.R., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-75 (2004); Akaneya,Y., et al., J. Neurophysiol. 93:594-602 (2005)) и в легкие путем интраназального введения (Howard, K.A., et al., Mol. Ther. 14:476-84 (2006); Zhang, X., et al., J. Biol. Chem. 279:10677-84 (2004); Bitko, V., et al., Nat. Med. 11:50-55 (2005)). Для системного введения агента РНКи для лечения заболевания РНК может быть модифицирована или альтернативно доставлена с использованием системы доставки лекарственного средства; оба способа действуют для предотвращения быстрой деградации миРНК эндо- и экзонуклеазами in vivo. Модификация РНК или фармацевтического носителя также может обеспечить нацеливание композиции агента РНКи на ткань-мишень и избежать нежелательных нецелевых эффектов. Агенты РНКи могут быть модифицированы путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для усиления клеточного поглощения и предотвращения деградации. Например, агент РНКи, направленный против АроВ, конъюгированный с фрагментом липофильного холестерина, вводили системно мышам и приводили к нокдауну мРНК apoB как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J., et al., Nature 432:173-78 (2004)). В некоторых других вариантах реализации агент РНКи может быть доставлен с использованием систем доставки лекарственного средства, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки обычно облегчают связывание агента РНКи (отрицательно заряженного) и усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране, чтобы обеспечить эффективное поглощение агента РНКи клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связаны с РНКи, либо индуцированы с образованием везикулы или мицеллы (см., например, Kim, S,H., et al., Journal of Controlled Release 129(2):107-16 (2008)), который охватывает агент РНКи. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию агента РНКи при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов агентов РНКи находятся в пределах возможностей специалиста в данной области (см., например, Sorensen, D.R., et al., J. Mol. Biol 327:761-66 (2003); Verma, U.N., et al., Clin. Cancer Res. 9: 1291-1300 (2003); Arnold, A.S. et al., J. Hypertens. 25:197-205 (2007); способы которых включены в настоящий документ посредством ссылки). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки агентов РНКи, включают DOTAP (Sorensen, D.R., et al. (2003), выше; Verma, U.N., et al., (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы липидов нуклеиновой кислоты" (Zimmermann, T.S., et al., Nature 441:111-14 (2006)), кардиолипин (Chien, P.Y., et al., Cancer Gene Ther.

12:321-28 (2005); Pal, A., et al., Int J. Oncol. 26: 1087-91 (2005)), полиэтиленимин (Bonnet, M.E., et al., Pharm. Res. 25(12):2972-82; Aigner, A., J. Biomed. Biotechnol. 2006(4):71659 (2006)), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S., Mol. Pharm. 3:472-487 (2006)) и полиамидоамины (Tomalia, D.A., et al., Biochem. Soc. Trans. 35:61-7 (2007); Yoo, H., et al., Pharm. Res. 16:1799-1804 (1999)).

В данном контексте термин "SNALP" относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты-липида. SNALP представляет собой везикулу липидов, покрывающую восстановленную водную внутреннюю часть, содержащую нуклеиновую кислоту, такую как агент РНКи или плазмиду, из которой транскрибируется агент РНКи. SNALP описаны, например, в публикациях патентных заявок США № US2006/0240093 и US2007/0135372, и в публикации международной заявки № WO 2009/082817. Эти заявки включены в настоящий документ посредством ссылки для информации, относящейся к SNALP.

В некоторых вариантах реализации изобретения РНКи образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции РНКи и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7,427,605, которая включена в настоящий документ посредством ссылки для информации, относящейся к таким композициям и способам. В некоторых вариантах реализации изобретения ген, кодирующий РНКи, кодируется и экспрессируется из вектора экспрессии. Примеры векторов и их применение при доставке РНКи описаны в заявке на патент США № US2017/0349900A1, где указанные примеры включены в настоящий документ посредством ссылки.

е. Фармацевтические композиции и составы агентов РНКи

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие агент РНКи, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Фармацевтическая композиция, содержащая агент РНКи, применима в комбинированной терапии для лечения инфекции HBV или снижения вирусной нагрузки HBV у субъекта. Такие фармацевтические композиции составлены на основе способа доставки. Например, композиции могут быть составлены для системного введения путем парентеральной доставки, например, путем внутривенной (IV) доставки, или для прямой доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в мозг, например, путем непрерывной инфузии помпой.

В некоторых контекстах "фармацевтически приемлемый носитель" или "вспомогательное вещество" представляет собой фармацевтически приемлемый

растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или более нуклеиновых кислот животному. Вспомогательное вещество может быть жидким или твердым и выбирается с учетом планируемого способа введения, чтобы обеспечить желаемую нагарузку, консистенцию и т. д. в сочетании с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются ими, связующие агенты (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлозу); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты, гидрофосфат кальция); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, металлостеараты, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия); разрыхлители (например, крахмал, крахмалгликолят натрия); и смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия).

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, пригодные для непарентерального введения, которые не вступают во вредную реакцию с нуклеиновыми кислотами, также могут быть использованы для составления композиций согласно настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и тому подобное.

В определенных контекстах составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основаниях. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Могут быть использованы фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, пригодные для непарентерального введения, которые не вступают во вредную реакцию с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются ими, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли,

желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и тому подобное.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, содержащие агент РНКи, описанный в настоящем документе, вводят в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена HBV. Как правило, подходящая доза агента РНКи будет находиться в диапазоне от 0,001 до 200,0 мг на кг массы тела реципиента в день и, более типично, в диапазоне от 1 до 50 мг на кг массы тела в день. Например, миРНК можно вводить в дозе 0,01 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг или 50 мг/кг за однократную дозу. Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в сутки, или агент РНКи можно вводить в виде двух, трех или более субдоз с соответствующими интервалами в течение дня или даже с использованием непрерывной инфузии или доставки через состав с контролируемым высвобождением. В этом случае доза агента РНКи, содержащегося в каждой субдозе, должно быть соответственно меньше для достижения общей суточной дозы. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, с использованием обычного состава с замедленным высвобождением, который обеспечивает устойчивое высвобождение РНКи в течение нескольких дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области техники и особенно полезны для доставки агентов в конкретное место, например, могут быть использованы с агентами технологии, описанные в настоящем документе. В этом варианте реализации изобретения единица дозирования содержит соответствующее кратное суточной дозе количество.

Влияние однократной дозы на уровень экспрессии гена HBV может быть длительным, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней, или с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 недели.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, но не ограничиваясь этим, тяжесть заболевания или расстройства, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие присутствующие заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать один эпизод лечения или курс лечения. Оценки эффективных доз и периодов полувыведения in vivo для отдельных агентов РНКи, охватываемых технологией, описанной в настоящем документе, могут быть сделаны с использованием обычных методик или на основе тестирования in vivo с

использованием подходящей модели на животных, как описано в другом месте настоящего документа.

Модели на мышах доступны для изучения инфекции HBV, и такие модели можно использовать для тестирования РНКи in vivo, а также для определения дозы, которая эффективна для снижения экспрессии гена HBV.

В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтических композиций и составов, описанных в настоящем документе, может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе небулайзером); интратрахеальным; интраназальным; эпидермальным и трансдермальным; пероральным; или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное, внутриартериальное, подкожное, внутрибрюшинное и внутримышечное введение или инфузию; подкожное введение (например, через имплантированное устройство); или внутричерепное введение (например, путем интрапаренхимального, интратекального или внутрижелудочкового введения).

В некоторых вариантах реализации агент РНКи, используемый в комбинированной терапии для лечения HBV, как описано в настоящем документе, доставляют подкожно.

В некоторых вариантах реализации агенты РНКи могут быть доставлены таким образом, чтобы воздействовать на конкретную ткань, такую как печень (например, гепатоциты печени).

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Обычные фармацевтические носители, водные, порошковые или маслянистые основания, загустители и т.п. могут быть необходимыми или желательными. Презервативы с покрытием, перчатки и тому подобное также могут быть полезны. Подходящие составы для местного применения включают составы, в которых РНК, представленные в технологии, описанной в настоящем документе, находятся в смеси с агентом для местного применения, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие агенты и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидилэтаноламин DOPE, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеаролифосфатидилхолин), анионные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтаноламин DOTMA). Средства РНКи могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать комплексы к ним, в частности, к катионным

липосомам. Альтернативно, агенты РНКи могут быть объединены с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, но не ограничиваются ими, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или его алкиловый эфир C1-20 (например, изопропилмиристат IPM), моноглицерид, диглицерид или фармацевтически приемлемую соль. Примеры составов для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в настоящий документ посредством ссылки для информации, относящейся к таким составам для местного применения.

Везикулы, такие как липосомы, могут быть использованы в составах для доставки агентов РНКи, описанных в настоящем документе; такой состав может обладать желательными свойствами, такими как специфичность и продолжительность действия. В данном контексте термин "липосома" означает везикулу, состоящую из амфифильных липидов, расположенных в сферическом бислое или бислоях.

Липосомы представляют собой однослойные или многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала и водной внутренней части. Водная часть содержит композицию, подлежащую доставке. Катионные липосомы могут обладать преимуществом способности сливаться с клеточной стенкой. Некатионные липосомы, хотя и не могут так эффективно сливаться с клеточной стенкой, могут быть поглощены макрофагами in vivo. Важными соображениями при приготовлении липосомных составов являются поверхностный заряд липидов, размер везикул и водный объем липосом.

В некоторых вариантах реализации изобретения липосомная доставка может обладать следующими преимущественными свойствами: обладать высокой деформируемостью и способностью проходить через тонкие поры в коже; биосовместимостью и биоразлагаемостью; способностью включать широкий спектр водо- и липидорастворимых лекарственных средств; способностью защищать инкапсулированные лекарственные средства в их внутренних отсеках от метаболизма и деградации (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245 (1998)); для местного применения снижение побочных эффектов, связанных с высокой системной абсорбцией вводимого препарата, повышенным накоплением вводимого препарата в нужной мишени, а также

возможностью введения в кожу широкого спектра препаратов, как гидрофильных, так и гидрофобных; и способностью доставлять в кожу агенты, включая высокомолекулярные нуклеиновые кислоты, анальгетики, антитела и гормоны.

Липосомы делятся на два широких класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс ДНК/липосома связывается с отрицательно заряженной поверхностью клетки и интернализуется в эндосоме. Из-за кислотного pH внутри эндосомы липосомы разрываются, высвобождая их содержимое в клеточную цитоплазму (Wang, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 147, 980-985 (1987)).

Липосомы, которые являются чувствительными к pH или отрицательно заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты, а не образуют с ними комплекс. Поскольку и ДНК, и липид одинаково заряжены, происходит отталкивание, а не комплексообразование. Тем не менее, некоторые ДНК захватываются в водной среде этих липосом. pH-чувствительные липосомы применяли для доставки нуклеиновых кислот в клеточные монослои в культуре (например, Zhou, et al., Journal of Controlled Release 19, 269-74 (1992)).

В некоторых вариантах реализации липосомная композиция образована из фосфатидилхолина (ФХ), такого как, например, соевый ФХ и яичный ФХ. В некоторых вариантах реализации липосомные композиции включают фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Нейтральные липосомные композиции, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомные композиции могут быть образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, в то время как анионные фузогенные липосомы могут быть образованы из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). В других вариантах реализации липосомная композиция образована из смесей фосфолипида и/или фосфатидилхолина и/или холестерина.

В некоторых вариантах реализации изобретения липосомные лекарственные формы доставляют местно на кожу.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи, используемый в комбинированной терапии, описанной в настоящем документе, полностью инкапсулирован в липидный состав, например, с образованием SPLP, pSPLP, SNALP или другой частицы нуклеиновой кислоты-липида. В данном контексте термин "SNALP" относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты-липида, включая SPLP. В данном контексте термин "SPLP" относится к частице нуклеиновой кислоты-липида, содержащей

плазмидную ДНК, инкапсулированную в липидную везикулу. SNALP и SPLP обычно содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частицы (например, ПЭГ-липидный конъюгат). SNALP и SPLP могут быть использованы для системных применений, поскольку они демонстрируют увеличенный срок циркуляции после внутривенной (в/в) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). SPLP включают "pSPLP", которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующий агент-нуклеиновая кислота, как указано в публикации международной заявки № WO 00/03683. Частицы технологии, описанной в настоящем документе, обычно имеют средний диаметр от около 50 нм до около 150 нм, более типично от около 60 нм до около 130 нм, более типично от около 70 нм до около 110 нм и наиболее типично от около 70 нм до около 90 нм и по существу нетоксичны. Кроме того, в некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты, присутствующие в частицах нуклеиновой кислоты-липида, устойчивы в водном растворе к разложению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и родственные способы получения описаны, например, в патенте США № 5,976,567; 5,981,501; 6,534,484; 6,586,410; 6,815,432; и в публикации международной заявки № WO 96/40964.

В некоторых вариантах реализации агент РНКи доставляют через липосому или другой липидный состав, где отношение липидов к лекарственным средствам (отношение массы к массе) (например, отношение липидов к миРНК) находится в диапазоне от около 1:1 до около 50:1, от около 1:1 до около 25:1, от около 3:1 до около 15:1, от около 4:1 до около 10:1, от около 5:1 до около 9:1 или от около 6:1 до около 9:1.

Фармацевтические композиции, содержащие антитела, антигенсвязывающие фрагменты, слитые белки, полинуклеотиды, векторы и/или клетки-хозяева

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок, согласно настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению и/или клетку согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит ингибитор экспрессии белка HBV и систему доставки (например, агент РНКи).

Фармацевтические композиции могут также содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество. Хотя носитель или вспомогательное вещество могут облегчать введение, они сами по себе не должны

индуцировать выработку антител, вредных для индивидуума, получающего композицию. Они также не должны быть токсичными. Подходящими носителями могут быть большие, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, аминокислотные сополимеры и неактивные вирусные частицы. В общем, фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению могут представлять собой активные компоненты или неактивные компоненты.

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

Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты или вещества буферизующие pH, могут присутствовать в таких композициях. Такие носители позволяют фармацевтическим композициям быть составленными в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, кашиц и суспензий для приема субъектом внутрь.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены в различных формах. Например, композиции могут быть получены в виде инъекционных веществ, либо в виде жидких растворов, либо суспензий. Также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией (например, лиофилизированная композиция, аналогичная Synagis™ и Herceptin™, для восстановления со стерильной водой, содержащей консервант). Композиция может быть получена для местного введения, например, в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть приготовлена для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея или в виде сиропа (необязательно ароматизированного). Композиция может быть получена для легочного введения, например, в качестве ингалятора, с использованием тонкодисперсного порошка или спрея. Композиция может быть получена в виде суппозитория или пессария. Композиция может быть получена для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Композиция может быть в форме набора, сконструированной таким образом, что объединенная композиция восстанавливается непосредственно перед введением субъекту. Например, лиофилизированное антитело может быть представлено в форме набора со стерильной водой или стерильным буфером.

В конкретных вариантах осуществления активный ингредиент в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой молекулу антитела, фрагмент или вариант антитела или его производное, в частности, активный ингредиент в композиции представляет собой антитело, фрагмент антитела, слитый белок или их варианты и производные, как описано в настоящем документе. Таким образом, он может быть подвержен деградации в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композицию следует вводить с использованием желудочно-кишечного тракта, композиция может содержать агенты, которые защищают антитело от деградации, но которые высвобождают антитело после того, как оно было абсорбировано из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут иметь pH от 5,5 до 8,5, и в некоторых вариантах реализации pH может составлять от 6 до 8. В других вариантах реализации pH фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, может составлять около 7. pH можно поддерживать с помощью буфера. Композиция может быть стерильной и/или апирогенной. Композиция может быть изотонической по отношению к человеку. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению поставляются в герметично закрытых контейнерах.

В объем настоящего изобретения входят композиции, присутствующие в нескольких формах введения; формы включают, но не ограничиваются ими, формы, подходящие для парентерального введения, например, путем инъекции или инфузии, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Если продукт предназначен для инъекций или инфузий, он может принимать форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе и может содержать лекарственные средства, такие как суспендирующие, консервантные, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, молекула антитела может находиться в сухой форме для восстановления перед использованием с подходящей стерильной жидкостью. Носитель, как правило, понимается как материал, который подходит для хранения, транспортировки и/или введения соединения, такого как фармацевтически активное соединение, в частности, антитела согласно настоящему описанию. Например, носитель может представлять собой физиологически приемлемую жидкость, которая подходит для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтически активного соединения, в частности, антител согласно настоящему описанию. После составления композиции по

настоящему изобретению можно вводить непосредственно субъекту. В одном варианте реализации композиции адаптированы для введения млекопитающим, например, людям.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить любым количеством путей, включая, но не ограничиваясь ими, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, внутрибрюшинный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрезкожный, местный, подкожный, интраназальный, энтеральный, сублингвальный, интравагинальный или ректальный пути. Гипоспреи также могут быть использованы для введения фармацевтических композиций согласно описанию. В конкретных вариантах реализации фармацевтическая композиция может быть получена для перорального введения, например, в виде таблеток, капсул и т.п., для местного введения или в виде инъекций, например, в виде жидких растворов или суспензий. Также могут быть использованы твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией, например, фармацевтическая композиция находится в лиофилизированной форме.

Для инъекции, например, внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в месте поражения, активный ингредиент может быть представлен в форме парентерально приемлемого водного раствора, который не содержит апирогенов и имеет подходящий pH, изотоничность и стабильность. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Композиция может быть в форме твердого вещества или жидкости. В некоторых вариантах осуществления носитель (носители) являются твердыми частицами, так что композиции находятся, например, в форме таблетки или порошка. Носитель (носители) может быть жидким (жидкими), причем композиции представляют собой, например, масло для полости рта, инъекционную жидкость или аэрозоль, который можно применять, например, при ингаляционном введении. Когда фармацевтическая композиция предназначена для перорального введения, она предпочтительно находится либо в твердой, либо в жидкой форме, где полутвердая, полужидкая, суспензионная и гелевая формы включены в формы, рассматриваемые в настоящем документе как твердые или жидкие.

В качестве твердой композиции для перорального введения фармацевтическая композиция может быть составлена в виде порошка, гранулы, прессованной таблетки, пилюли, капсулы, жевательной резинки, облатки или т. п. Такая твердая композиция обычно содержит один или более инертных разбавителей или съедобных носителей. Кроме того, могут присутствовать одно или более из следующих веществ: связующие

вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательные вещества, такие как крахмал, лактоза или декстрины, дезинтегрирующие агенты, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, примогель, кукурузный крахмал и т. п.; смазывающие вещества, такие как стеарат магния или стеротекс; скользящие агенты, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор; и краситель. Когда композиция находится в форме капсулы, например, желатиновой капсулы, она может содержать, помимо веществ вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

Композиция может быть в форме жидкости, например, эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть предназначена для перорального введения или для доставки путем инъекции, в качестве двух примеров. Если они предназначены для перорального введения, предпочтительные композиции содержат в дополнение к настоящим соединениям один или более подсластителей, консервантов, красящих веществ/красителей и усилителей вкуса. В композицию, предназначенную для введения путем инъекции могут быть включены одно или более из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергирующего агента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

Жидкие фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другие подобные формы, могут включать один или несколько из следующих адъювантов: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, физиологический раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, жирные масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты и агенты для достижения тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть включен в ампулы, одноразовые шприцы или флакон из стекло или пластика с несколькими дозами. Физиологический раствор является предпочтительным адъювантом. Инъецируемая фармацевтическая композиция, предпочтительно, является стерильной.

Жидкая композиция, предназначенная для парентерального или перорального введения, должна содержать количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента,

как описано в настоящем документе, таким образом, чтобы была получена подходящая дозировка. Как правило, это количество составляет по меньшей мере 0,01% от антитела или антигенсвязывающего фрагмента в композиции. Когда это предназначено для перорального введения, это количество может варьироваться от 0,1 до около 70% от массы композиции. Некоторые пероральные фармацевтические композиции содержат от около 4% до около 75% антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и препараты согласно настоящему изобретению получали таким образом, что парентеральная единица дозирования содержит от 0,01 до 10% по массе антитела или антигенсвязывающего фрагмента перед разведением.

Композиция может быть предназначена для местного введения, и в этом случае носитель может подходящим образом содержать раствор, эмульсию, мазь или гелевую основу. Основа, например, может содержать одно или более из следующего: петролатум, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, и эмульгаторы и стабилизаторы. Загустители могут присутствовать в композиции для местного введения. Если композиция предназначена для трансдермального введения, она может включать трансдермальный пластырь или устройство для ионофореза. Фармацевтическая композиция может быть предназначена для ректального введения, в форме, например, суппозитория, который будет растворяться в прямой кишке и высвобождать лекарственное средство. Композиция для ректального введения может содержать маслянистое основу в качестве подходящего не раздражающего вспомогательного вещества. Такие основания включают, без ограничения, ланолин, масло какао и полиэтиленгликоль.

Композиция может содержать различные вещества, которые модифицируют физическую форму твердой или жидкой единицы дозирования. Например, композиция может включать материалы, которые образуют оболочку покрытия вокруг активных ингредиентов. Вещества, которые образуют оболочку покрытия, обычно являются инертными и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других энтеросолюбильных покрывающих агентов. Альтернативно активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу. Композиция в твердой или жидкой форме может содержать агент, который связывается с антителом или антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему описанию и тем самым способствует доставке соединения. Подходящие агенты, которые могут действовать в этом качестве, включают моноклональные или поликлональные антитела, один или более белков или липосому. Композиция может состоять по существу из единиц дозирования, которые можно вводить

в виде аэрозоля. Термин "аэрозоль" используется для обозначения различных систем, начиная с систем коллоидной природы и кончая системами, состоящими из упаковок под давлением. Доставка может осуществляться сжиженным или сжатым газом или с помощью подходящей насосной системы, которая дозирует активные ингредиенты. Аэрозоли могут доставляться в однофазных, двухфазных или трехфазных системах для доставки активного (активныых) ингредиента (ингридиентов). Доставка аэрозоля включает необходимый контейнер, активаторы, клапаны, субконтейнеры и т. п., которые вместе могут образовывать набор. Специалист в данной области техники без излишних экспериментов может определить предпочтительные аэрозоли.

Следует понимать, что композиции по настоящему изобретению также охватывают молекулы-носители для полинуклеотидов, как описано в настоящем документе (например, липидные наночастицы, платформы доставки в наноразмерном масштабе и т. п.).

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит первый вектор, содержащий первую плазмиду, и второй вектор, содержащий вторую плазмиду, где первая плазмида содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, VH или VH+CH, и вторая плазмида содержит полинуклеотид, кодирующий родственную легкую цепь, VL или VL+CL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах реализации композиция содержит полинуклеотид (например, мРНК), связанный с подходящим средством доставки или носителем. Примерные носители или носители для введения субъекту-человеку включают липид или липидное средство доставки, такой как липосома, твердая липидная наночастица, маслянистая суспензия, субмикронная липидная эмульсия, липидный микропузырь, обратная липидная мицелла, кохлеарная липосома, липидная микротрубочка, липидный микроцилиндр или липидная наночастица (LNP) или наноразмерная платформа (см., например, Li и др. Wilery Interdiscip Rev. Nanomed Nanobiotechnol. 11(2):e1530 (2019)). Принципы, реагенты и методики конструирования подходящей мРНК и и составления мРНК-LNP и доставки их описаны, например, в Pardi и др. (J Control Release 217345-351 (2015)); Thess et al. (Mol Ther 23: 1456-1464 (2015)); Thran и др. (EMBO Mol Med 9(10):1434-1448 (2017); Kose et al. (Sci. Immunol. 4 eaaw6647 (2019); and Sabnis et al. (Mol. Ther. 26: 1509-1519 (2018)), которые включают кэппинг, оптимизацию кодонов, нуклеозидную модификацию, очистку мРНК, включение мРНК в стабильные липидные наночастицы (например, ионизируемый катионный липид/фосфатидилхолин/холестерин/PEG-липид (PEG - полиэтиленгликоль); ионизируемый липид:дистеароил PC:холестерин:полиэтиленгликолевый липид (PC - фосфатидилхолин)) и подкожное, внутримышечное, внутрикожное, внутривенное,

внутрибрюшинное и интратрахеальное введение того же, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Фармацевтические композиции могут быть получены с помощью методики, хорошо известной в данной области техники. Например, композиция, предназначенная для введения путем инъекции, может быть получена путем комбинирования композиции, которая содержит антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или другую композицию как описано в настоящем документе, и, необязательно, одну или более солей, буферов и/или стабилизаторов, со стерильной дистиллированной водой с образованием раствора. Поверхностно-активное вещество может быть добавлено для облегчения образования гомогенного раствора или суспензии. Поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, которые нековалентно взаимодействуют с пептидной композицией таким образом, чтобы облегчить растворение или гомогенную суспензию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в водной системе доставки.

Независимо от того, является ли оно полипептидом, пептидом или молекулой нуклеиновой кислоты, клеткой или другим фармацевтически полезным соединением в соответствии с настоящим изобретением, которое должно быть введено индивидууму, введение, как правило, осуществляется в " профилактически эффективном количестве" или "терапевтически эффективном количестве" или "эффективном количестве" (в зависимости от случая), что является достаточным для того, чтобы продемонстрировать пользу для индивидуума (например, улучшение клинического исхода; уменьшение или облегчение симптомов, связанных с заболеванием; уменьшение появления симптомов; улучшение качества жизни; более длительное отсутствие заболевания; уменьшение степени заболевания, стабилизация состояния заболевания; задержка прогрессирования заболевания; ремиссия; выживаемость; или пролонгированная выживаемость статистически значимым образом). Когда речь идет об отдельном активном ингредиенте, вводимом отдельно, терапевтически эффективное количество относится к эффектам этого ингредиента или клетки, экспрессирующей этот ингредиент отдельно. Когда речь идет о комбинации, терапевтически эффективное количество относится к объединенным количествам активных ингредиентов или комбинированного вспомогательного активного ингредиента с клеткой, экспрессирующей активный ингредиент, что приводит к терапевтическому эффекту, независимо от того, вводится ли оно серийно, последовательно или одновременно.

Композиции вводили в эффективном количестве (например, для лечения инфекции SARS-CoV-2), которое будет варьироваться в зависимости от множества факторов, включая активность конкретного применяемого соединения; метаболическую

стабильность и продолжительность действия соединения; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету субъекта; режим и время введения; скорость выведения; комбинацию лекарственного средства; тяжесть конкретного расстройства или состояния; и субъект, проходящий терапию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения при последующем введении лекарственных средств в соответствии с составами и способами согласно настоящему изобретению у субъектов будет наблюдаться снижение одного или более симптомов, связанных с заболеванием или расстройством, подлежащим лечению, на от около 10% вплоть до около 99% по сравнению с субъектами, получающими плацебо, или другими подходящими контрольными субъектами.

Как правило, терапевтически эффективная суточная доза антитела или антигенсвязывающего фрагмента составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от около 0,001 мг/кг (т.е.0,07 мг) до около 100 мг/кг (т.е. 7,0 г); предпочтительно терапевтически эффективная доза составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от около 0,01 мг/кг (т.е.0,7 мг) до около 50 мг/кг (т.е.3,5 г); более предпочтительно терапевтически эффективная доза составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от около 1 мг/кг (т.е.70 мг) до около 25 мг/кг (т.е.1,75 г). В настоящем документе предложены другие дозы для антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Для полинуклеотидов, векторов, клеток-хозяев и связанных композиций по настоящему изобретению терапевтически эффективная доза может отличаться от дозы для антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Фактическое вводимое количество, а также скорость и продолжительность введения будут зависеть от характера и тяжести того, что лечится. Для инъекции фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть предложена, например, в предварительно наполненном шприце.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть введены перорально в любой приемлемой для перорального применения лекарственной форме, включая, но этим не ограничиваясь, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения традиционно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также, как правило, добавляют смазывающие агенты, такие как стеарат магния. Для перорального введения в виде капсул подходящие разбавители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Когда водные суспензии требуются для перорального применения, активный ингредиент, т.е. молекулу конъюгата груза и транспортера согласно изобретению, как определено выше, объединяют с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При необходимости

также можно добавлять определенные подслащивающие, вкусоароматические, окрашивающие агенты.

Фармацевтические композиции согласно настоящему описанию также могут быть введены местно, особенно когда мишень лечения включает области или органы, легко доступные для местного применения, например, включая заболевания кожи или любой другой доступной эпителиальной ткани. Подходящие препараты для местного применения можно легко получать для каждого из указанных участков или органов. Для местного применения фармацевтическая композиция может быть составлена в подходящей мази, содержащей фармацевтическую композицию по изобретению, в частности, ее компоненты, как определено выше, суспендированные или растворенные в одном или более носителях. Носители для местного нанесения включают, но этим не ограничиваются, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, соединение полиоксипропилена, эмульгирующий воск и воду. Альтернативно, фармацевтическая композиция может быть составлена в виде подходящего лосьона или крема. В контексте настоящего изобретения подходящие носители включают, но не ограничиваются ими, минеральное масло, сорбитан моностеарата, полисорбат 60, сложноэфирный цетиловый воск, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

Дозы могут быть выражены по отношению к массе тела. Таким образом, доза, которая выражается как [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и т.д.), обычно относится к [г, мг или другая единица] "на кг (или г, мг и т.д.) массы тела", даже если термин "масса тела" прямо не упоминается.

В конкретных вариантах реализации в однократной дозе, например, суточной, еженедельной или ежемесячной дозе, количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтической композиции не превышает 1 г. В некоторых таких вариантах реализации изобретения однократная доза не превышает дозы, выбранной из 500 мг, 250 мг, 100 мг и 50 мг. В настоящем документе представлены дополнительные варианты реализации доз.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции субъекту в количестве 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента или композиции субъекту множество раз, где второе или последовательное введение осуществляли через около 6, около 7, около 8, около 9, около

10, около 11, около 12, около 24, около 48, около 74, около 96 часов или более после первого или предыдущего введения, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции по меньшей мере один раз до инфицирования субъекта.

Композиции, содержащие антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или композицию по настоящему изобретению, также можно вводить одновременно, до или после введения одного или более других терапевтических агентов. Такая комбинированная терапия может включать введение одной фармацевтической лекарственной формы, которая содержит соединение по изобретению и один или более дополнительных активных агентов, а также введение композиций, содержащих антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и каждый активный агент в своей отдельной лекарственной форме. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, и другой активный агент можно вводить пациенту вместе в одной пероральной лекарственной композиции, такой как таблетка или капсула, или каждый агент вводили в отдельных пероральных лекарственных формах. Аналогичным образом, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, и другой активный агент могут быть введены субъекту вместе в одной парентеральной лекарственной композиции, такой как физиологический раствор или другой физиологически приемлемый раствор, или каждый агент может быть введен в отдельных парентеральных лекарственных формах. В тех случаях, когда используются отдельные лекарственные формы, композиции, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент и один или более дополнительных активных агентов, могут быть введены по существу в одно и то же время, то есть одновременно, или в разное время, то есть последовательно и в любом порядке; предполагается, что комбинированная терапия включает все эти схемы.

В некоторых вариантах осуществления композиция или набор, как описано в настоящем документе, дополнительно содержит (i) ингибитор полимеразы, где ингибитор полимеразы необязательно содержит ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (ii) интерферон, где интерферон необязательно содержит IFN-бета и/или IFN-альфа; (iii) ингибитор контрольной точки, где ингибитор контрольной точки необязательно содержит антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент; (iv) агонист стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки; или (v) любую комбинацию (i)-

(iv). В некоторых вариантах реализации изобретения набор содержит композицию или комбинацию, как описано в настоящем документе, и дополнительно содержит инструкции по применению компонента для предотвращения, лечения, ослабления и/или диагностики инфекции гепатита B и/или инфекции гепатита D.

В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению (например, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, клетка-хозяин, нуклеиновую кислоту, вектор или фармацевтическую композиции) 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 любой их комбинацией. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с PD-L1-специфическим антителом или его связывающим фрагментом, таким как BMS-936559, дурвалумаб (MEDI4736), атезолизумаб (RG7446), авелумаб (MSB0010718C), MPDL3280A или любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором LAG3, таким как LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016 или любой их комбинацией. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CTLA4. В конкретных вариантах реализации композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с CTLA4-специфическим антителом или его связывающим фрагментом, таким как ипилимумаб, тремелимумаб, слитые белки CTLA4-Ig (например, абатацепт, белатацепт) или любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с B7-H3-специфическим антителом или его связывающим фрагментом, таким как эноблитузумаб (MGA271), 376,96 или и то, и другое. Анти-B7-H3 антитело-связывающий фрагмент может представлять собой scFv или слитый белок, содержащий его, как описано, например, в Dangaj et al., Cancer Res. 73:4820, 2013, а также описанные в патенте США № 9574000 и публикациях патентов PCT № WO /201640724A1 и WO 2013/025779A1. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CD244. В некоторых вариантах реализации композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором BLTA, HVEM, CD160 или любой их комбинацией. Антитела к CD-160 описаны, например, в публикации PCT № WO 2010/084158. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором TIM3. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с

ингибитором Gal9. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором передачи аденозиновых сигналов, таким как аденозиновый рецептор-приманка. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором A2aR. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором KIR, таким как лирилумаб (BMS-986015). В некоторых вариантах реализации композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором ингибирующего цитокина (обычно цитокином, отличным от TGFβ) или развития или активности Treg. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором IDO, таким как лево-1-метилтриптофан, эпакадостат (INCB024360; Liu et al., Blood 115:3520-30, 2010), ebselen (Terentis et al., Biochem. 49:591-600, 2010), индоксимод, NLG919 (Mautino et al., Американская ассоциация по исследованию рака 104-я ежегодная встреча 2013 года; 6-10 апреля 2013 года), 1-метилтриптофан (1-MT) -тира-пазамин или любая их комбинация. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором аргиназы, таким как N(омега)-нитро-L-аргинин сложный метиловый эфир (L-NAME), N-омега-гидрокси-нор-л-аргинин (NOR-NOHA), L-NOHA, 2(S)-амино-6-бороногексановая кислота (ABH), S-(2-борэтил)-L-цистеин (BEC) или любая их комбинация. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором VISTA, таким как CA-170 (Curis, Lexington, Mass.). В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором TIGIT, таким как, например, COM902 (Compugen, Торонто, Онтарио, Канада), ингибитором CD155, таким как, например, COM701 (Compugen), или и тем, и другим. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором PVRIG, PVRL2 или обоими. Антитела к PVRIG описаны, например, в публикации PCT № WO 2016/134333. Антитела к PVRL2 описаны, например, в публикации PCT № WO 2017/021526. В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором LAIR1. В некоторых вариантах реализации композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5 или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с агентом, который повышает активность (т.е. является агонистом) стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки. Например,

композицию по настоящему изобретению можно применять в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB) (таким как, например, урелумаб), агонистом CD134 (OX-40) (таким как, например, MEDI6469, MEDI6383 или MEDI0562), леналидомидом, помалидомидом, агонистом CD27 (таким как, например, CDX-1127), агонистом CD28 (таким как, например, TGN1412, CD80 или CD86), агонистом CD40 (таким как, например, CP-870,893, rhuCD40L или SGN-40), агонистом CD122 (таким как, например, IL-2), агонистом GITR (таким как, например, гуманизированные моноклональные антитела, описанные в публикации патента PCT № WO 2016/054638), агонист ICOS (CD278) (такой как, например, GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8 или любая их комбинация).

В любом из вариантов реализации изобретения, раскрытых в настоящем документе, способ может включать введение композиции по настоящему изобретению с одним или более агонистами стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки, включая любое из вышеперечисленного, по отдельности или в любой комбинации.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению могут присутствовать либо в той же фармацевтической композиции, что и дополнительный активный компонент, либо антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению могут быть включены в первую фармацевтическую композицию, а дополнительный активный компонент может быть включен во вторую фармацевтическую композицию, отличную от первой фармацевтической композиции.

Применения

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложены способы применения антитела, антигенсвязывающего фрагмента, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки, фармацевтической композиции, комбинации (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению с описанным в настоящем документе ингибитором экспрессии белка HBV и системой доставки (например, агентом РНКи) или набора согласно настоящему изобретению в (i) профилактике, лечении или ослаблении гепатита B и/или гепатита D; или в (ii) диагностике гепатита B и/или гепатита D (например, у субъекта-человека).

Способы диагностики (например, in vitro, ex vivo) могут включать приведение в контакт антитела, фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) или слитого белка с образцом. Такие образцы могут быть выделены из субъекта, например, выделенный образец ткани, взятый, например, из носовых ходов, полостей пазух,

слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, мозга, кожи или крови. Способы диагностики могут также включать обнаружение комплекса антиген/антитело или антиген/слитый белок, в частности, после приведения в контакт антитела, фрагмента антитела или слитого белка с образцом. Такая стадия обнаружения обычно выполняется в ламинарном боксе, то есть без какого-либо контакта с телом человека или животного. Примеры способов обнаружения хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, например, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

В настоящем описании также предложено применение (i) антитела, фрагмента антитела, слитого белка или их вариантов и производных согласно настоящему описанию, (ii) клетки-хозяина (которая может представлять собой иммортализованную B-клетку) согласно настоящему описанию, (iii) нуклеиновой кислоты или вектора согласно настоящему описанию (iv) фармацевтической композиции согласно настоящему описанию или (v) комбинации (например, раскрытого в настоящем описании антитела или антигенсвязывающего фрагмента с раскрытым в настоящем описании ингибитором экспрессии и системой доставки белка HBV (например, агентом РНКи)) в (a) производстве лекарственного средства для профилактики, лечения или ослабления гепатита B и/или гепатита D или для (b) диагностики гепатита B и/или гепатита D.

Термин "заболевание", используемый в настоящем документе, предназначен для общего синонима и используется взаимозаменяемо с терминами "расстройство" и "состояние" (как в медицинском состоянии), поскольку все они отражают аномальное состояние организма человека или животного или одной из его частей, которое нарушает нормальное функционирование, обычно проявляется отличительными признаками и симптомами и приводит к тому, что пораженный человек или животное имеют уменьшенную продолжительность или качество жизни.

В данном контексте ссылка на "лечение" субъекта или пациента предназначена для включения предупреждения, профилактики, ослабления, улучшения и терапии и относится к медицинскому лечению заболевания, расстройства или состояния субъекта. Преимущества лечения могут включать улучшение клинического исхода; уменьшение или облегчение симптомов, связанных с заболеванием; уменьшение появления симптомов; улучшение качества жизни; более длительное отсутствие заболевания; уменьшение степени заболевания; стабилизацию состояния заболевания; задержку прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; пролонгированную выживаемость; или любую их комбинацию. Термины "субъект" или "пациент" используются в настоящем документе

взаимозаменяемо для обозначения всех млекопитающих, включая людей. Примеры субъектов включают людей, коров, собак, кошек, лошадей, коз, овец, свиней и кроликов. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой человека. Субъекты могут быть мужского или женского пола и могут быть любого подходящего возраста, включая младенцев, несовершеннолетних, подростков, взрослых и пожилых субъектов.

В настоящем изобретении также предложены антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению, клетка согласно настоящему изобретению, фармацевтическая композиция согласно и/или комбинация (например, раскрытого антитела или антигенсвязывающего фрагмента с раскрытым в настоящем изобретении ингибитором экспрессии и системы доставки белка HBV (например, агентом РНКи) согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения гепатита B и/или гепатита D. Также предложено применение антитела, антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка согласно настоящему изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения субъекта и/или диагностики у субъекта. Также предложен способ лечения субъекта (например, субъекта-человека), включающий введение субъекту эффективного количества композиции или комбинации, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения субъектом является человек. Один из способов проверки эффективности терапевтического лечения включает мониторинг симптомов заболевания после введения композиции. Лечение может представлять собой схему однократной дозы или схему многократной дозы.

В одном варианте осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок, клетку-хозяина (например, иммортализованный клон B-клетки или T-клетку, NK-T-клетку или NK-клетку, которая экспрессирует слитый белок), фармацевтическую композицию или комбинацию согласно изобретению вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении. Такой субъект включает, но не ограничивается этим, субъекта, который особенно подвержен риску или восприимчив к гепатиту B и/или гепатиту D.

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты, слитые белки, полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, фармацевтические композиции и их комбинации в соответствии с настоящим изобретением также могут быть использованы в наборе для профилактики, лечения, ослабления и/или диагностики гепатита B и/или гепатита D. В некоторых вариантах реализации изобретения набор дополнительно содержит инструкции по применению компонента для предотвращения, лечения, ослабления и/или диагностики

инфекции гепатита B и/или инфекции гепатита D. Кроме того, эпитоп в области антигенной петли HBsAg, который способен связывать антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, может быть использован в наборе для мониторинга эффективности процедур нанесения путем обнаружения наличия или определения титра защитных антител к HBV.

В некоторых вариантах осуществления композиция или набор, как описано в настоящем документе, содержит ингибитор полимеразы, который необязательно содержит ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (ii) интерферон, где интерферон необязательно содержит IFNбета и/или IFNальфа; (iii) ингибитор контрольной точки, где ингибитор контрольной точки необязательно содержит антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент; (iv) агонист стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки; или (v) любую комбинацию (viii)-(xii).

В некоторых вариантах осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению, клетка согласно настоящему изобретению, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению и/или комбинация (например, описанного в настоящем документе антитела или антигенсвязывающего фрагмента с описанным в настоящем документе ингибитором системы экспрессии и доставки белка HBV (например, агентом РНКи) согласно настоящему изобретению используются для лечения или ослабления хронической инфекции гепатита B.

В конкретных вариантах осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению (i) нейтрализует инфекцию HBV, (ii) связывается с L-HBsAg (белок большой оболочки HBV, который присутствует в инфекционных частицах HBV), тем самым предотвращая распространение HBV, (iii) связывается с S-HBsAg, тем самым способствуя клиренсу субвирусных частиц (SVP) и/или (iv) может индуцировать сероконверсию, то есть активный иммунный ответ на вирус.

В конкретных вариантах осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению, клетка согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению могут быть использованы для предупреждения (повторной) инфекции

гепатита B после трансплантации печени, в частности, для лечения гепатита B, вызванного печеночной недостаточностью.

В дополнительных вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению, вектор согласно описанию, представленному в настоящем документе, клетка согласно настоящему изобретению, фармацевтическая композиция и/или комбинация (например, описанного в настоящем документе антитела или антигенсвязывающего фрагмента с описанным в настоящем документе ингибитором экспрессии белка HBV и системой доставки (например, агентом РНКи) согласно настоящему изобретению) могут быть использованы для предотвращения/профилактики гепатита B у неиммунизированных субъектов. Например, в случае (предполагаемого) случайного воздействия HBV (постконтактная профилактика). Термин "неиммунизированные субъекты" включает субъектов, которые никогда не получали вакцинацию и, таким образом, не иммунизированы, и субъектов, у которых не наблюдался иммунный ответ (например, отсутствие измеримых антител к гепатиту B) после вакцинации.

В некоторых вариантах осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению, клетка согласно настоящему изобретению, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению или комбинация (например, описанного в настоящем документе антитела или антигенсвязывающего фрагмента с описанным в настоящем документе ингибитором системы экспрессии и доставки белка HBV (например, агентом РНКи) согласно настоящему изобретению применяют для предотвращения гепатита B у пациентов с гемодиализом.

В некоторых вариантах осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению, клетка согласно настоящему изобретению, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению или комбинация (например, описанного в настоящем документе антитела или антигенсвязывающего фрагмента с описанным в настоящем документе ингибитором системы экспрессии и доставки белка HBV (например, агентом РНКи) согласно настоящему изобретению применяют для предотвращения гепатита B у новорожденного. В некоторых вариантах осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту согласно настоящему

изобретению, вектор согласно настоящему изобретению, клетку согласно настоящему изобретению, фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению или комбинацию (например, описанного в настоящем документе антитела или антигенсвязывающего фрагмента с описанным в настоящем документе ингибитором системы экспрессии и доставки белка HBV (например, агентом РНКи) согласно настоящему изобретению можно вводить при рождении или как можно скорее после рождения. Введение может быть повторено до сероконверсии после вакцинации.

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

Кроме того, предложено применение антитела, антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора в соответствии с настоящим изобретением, клетки в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением для определения того, инфицирован ли выделенный образец крови вирусом гепатита B и/или вирусом гепатита дельта.

Как описано выше, способы диагностики могут включать приведение в контакт антитела, фрагмента антитела или слитого белка с образцом. Такие образцы могут быть выделены из субъекта, например, выделенный образец ткани, взятый, например, из носовых ходов, полостей пазух, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, мозга, кожи или крови. Способы диагностики могут также включать обнаружение комплекса антиген/антитело, в частности, после приведения в контакт антитела или фрагмента антитела с образцом. Такая стадия обнаружения обычно выполняется в ламинарном боксе, то есть без какого-либо контакта с телом человека или животного. Примеры способов обнаружения хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, например, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Настоящее изобретение также относится к способу лечения, предотвращения и/или ослабления гепатита B и/или гепатита D у субъекта, где способ включает введение субъекту антитела, антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка согласно

настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, вектора согласно настоящему изобретению, клетки согласно настоящему изобретению, фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и/или комбинации (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению с раскрытым в настоящем документе ингибитором экспрессии белка HBV и системы доставки (например, агента РНКи) согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту одного или более из: (vii) ингибитора полимеразы, который необязательно содержит ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (viii) интерферона, который необязательно содержит IFNбета и/или IFNальфа; (ix) ингибитора контрольной точки, который необязательно содержит антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент; (x) агониста молекулы, стимулирующей иммунную контрольную точку; или (xi) любой комбинации (vii)-(x).

В некоторых вариантах реализации изобретения инфекция гепатита B представляет собой хроническую инфекцию гепатита B. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту была выполнена трансплантация печени. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект не иммунизирован против гепатита B. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект является новорожденным. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект подвергается или подвергался гемодиализу.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, которому была выполнена трансплантация печени, включающему введение субъекту, которому была выполнена трансплантация печени, эффективного количества антитела, антигенсвязывающего фрагмента или гибридного белка согласно настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, вектора согласно настоящему изобретению, клетки согласно настоящему изобретению, фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению или комбинации (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению с описанным в настоящем документе ингибитором экспрессии белка HBV и системы доставки (например, РНКи-агентом) согласно настоящему изобретению.

В настоящем документе также предложены способы обнаружения наличия или отсутствия эпитопа в правильной конформации в вакцине против гепатита B и/или гепатита D, при этом способы включают: (i) приведение вакцины в контакт с антителом, антигенсвязывающим фрагментом или слитым белком по любому из вариантов

осуществления настоящего изобретения; и (ii) определение того, образован ли комплекс, содержащий антиген и антитело, или содержащий антиген и антигенсвязывающий фрагмент, или содержащий антиген и слитый белок.

Термин "вакцина", используемый в настоящем документе, обычно понимается как профилактический или терапевтический материал, обеспечивающий по меньшей мере один антиген, такой как иммуноген. Антиген или иммуноген могут быть получены из любого материала, который подходит для вакцинации. Например, антиген или иммуноген может быть получен из патогена, например, из частиц бактерий, вирусных частиц, опухоли (включая твердую или жидкую опухоль) или другой раковой ткани. Антиген или иммуноген стимулирует адаптивную иммунную систему организма для обеспечения адаптивного иммунного ответа. В некоторых вариантах реализации "антиген" или "иммуноген" относится к веществу, которое может быть распознано иммунной системой, например, адаптивной иммунной системой, и которое способно вызывать антиген-специфический иммунный ответ, например, путем образования антител и/или антиген-специфических Т-клеток как части адаптивного иммунного ответа. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген может представлять собой или может содержать пептид или белок, который может быть представлен комплексом MHC (например, MHC класса I; MHC класса II) Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный антиген содержит антиген HBV и/или HBD; например, антиген HBsAg.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы лечения хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающие: (i) введение субъекту агента, который снижает антигенную нагрузку HBV; и (ii) введение субъекту антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах реализации агент, который снижает антигенную нагрузку HBV, вводят перед антителом к HBV или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации введение агента, снижающего антигенную нагрузку HBV, перед введением антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента приводит к снижению вирусной нагрузки при введении антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтически эффективное количество антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента при комбинированной терапии меньше, чем терапевтически эффективное количество антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента, доставленного, когда агент, снижающий антигенную нагрузку HBV, не вводили субъекту (например, когда антитело к HBV или его антигенсвязывающий

фрагмент вводят отдельно в качестве монотерапии). В некоторых вариантах реализации изобретения агент, который снижает антигенную нагрузку HBV, представляет собой агент РНКи (например, миРНК), который ингибирует экспрессию транскрипта HBV.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предлагается способ лечения хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий: введение субъекту агента, который снижает антигенную нагрузку HBV; и введение субъекту антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента; и дополнительно включающий измерение количества HBsAg, присутствующего в образце крови от субъекта до и после введения агента, который снижает антигенную нагрузку HBV, причем снижение HBsAg указывает на снижение экспрессии по меньшей мере одного гена HBV.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предлагается агент, который снижает антигенную нагрузку HBV для применения при лечении хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания у субъекта, при этом субъекту впоследствии вводят антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых других вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания у субъекта, и субъекту ранее вводили агент, который снижает антигенную нагрузку HBV. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения экспрессию по меньшей мере одного гена HBV снижают после введения агента, который снижает антигенную нагрузку HBV, и антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту, когда экспрессия по меньшей мере одного гена HBV снижается.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к применению агента, который снижает антигенную нагрузку HBV и/или антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента, в производстве лекарственного средства для лечения хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы лечения хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающие: (i) введение субъекту ингибитора экспрессии гена HBV; и (ii) введение субъекту антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор экспрессии гена HBV вводят перед антителом к HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора экспрессии гена HBV перед антителом к HBV или его антигенсвязывающим фрагментом приводит к снижению вирусной нагрузки при введении антитела к HBV. В

некоторых вариантах реализации изобретения терапевтически эффективное количество антитела к HBV при комбинированной терапии меньше, чем терапевтически эффективное количество антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента, доставленного, когда ингибитор экспрессии гена HBV не вводили субъекту (например, когда антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент вводят отдельно в качестве монотерапии).

В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессию по меньшей мере одного гена HBV снижают после введения ингибитора экспрессии гена HBV, а антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту, когда экспрессия по меньшей мере одного гена HBV снижается. В конкретных вариантах реализации изобретения по меньшей мере один ген HBV представляет собой ген HBV X и/или HBsAg.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предлагается способ лечения хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий: введение субъекту ингибитора экспрессии гена HBV; и введение субъекту антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента; и дополнительно включающий измерение количества HBsAg, присутствующего в образце крови от субъекта до и после введения ингибитора экспрессии гена HBV, причем снижение HBsAg указывает на снижение экспрессии по меньшей мере одного гена HBV.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предлагается ингибитор экспрессии гена HBV для применения при лечении хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания у субъекта, при этом субъекту впоследствии вводят антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых других вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания у субъекта, и субъекту ранее вводили ингибитор экспрессии гена HBV. В дополнительных вариантах реализации изобретения экспрессию по меньшей мере одного гена HBV снижают после введения ингибитора экспрессии гена HBV, и антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту, когда экспрессия по меньшей мере одного гена HBV снижается.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к применению ингибитора экспрессии гена HBV и/или антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента, в производстве лекарственного средства для лечения хронической инфекции HBV или HBV-ассоциированного заболевания.

В любом из вышеуказанных способов, композиций для применения или применений в производстве, способы и композиции могут быть использованы для лечения хронической инфекции HBV.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ингибитор экспрессии гена HBV вводят в виде разовой дозы, двух доз, трех доз, четырех доз или пяти доз. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения по меньшей мере первую дозу ингибитора экспрессии гена HBV вводят перед введением антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ингибитор экспрессии гена HBV вводят в виде разовой дозы, двух доз, трех доз, четырех доз или пяти доз, шести доз, семи доз или восьми доз. Дозу или дозы можно вводить, например, два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые четыре недели или один раз в месяц.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента включает введение антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые две недели или один раз в месяц.

В некоторых вариантах реализации введение антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента включает введение по меньшей мере двух доз терапевтически эффективного количества антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере две дозы вводят два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые две недели или один раз в месяц.

В некоторых вариантах реализации введение антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента начинается по меньшей мере через 1 неделю после введения ингибитора экспрессии гена HBV. В некоторых вариантах реализации введение антитела к HBV начинается через 2 недели после введения ингибитора экспрессии гена HBV. В некоторых вариантах реализации введение антитела к HBV или его антигенсвязывающего фрагмента начинается через 8 недель после введения ингибитора экспрессии гена HBV.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент и ингибитор экспрессии гена HBV вводят каждый подкожно.

В конкретных вариантах осуществления вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве антитело к HBV или его

антигенсвязывающий фрагмент может распознавать генотипы HBV A, B, C, D, E, F, G, H, I и J.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применения в производстве антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с первой специфичностью к HBsAg и второй специфичностью, которая стимулирует иммунный эффектор (например, второй специфичностью, которая стимулирует цитотоксичность или вакцинный эффект). В некоторых других вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве, описанных в настоящем документе, антитело к HBV представляет собой моноклональное антитело.

В конкретных вариантах осуществления вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве антитело к HBV или его антигенсвязывающий фрагмент содержат неприродный вариант HBC34, как описано в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело к HBV содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO: 35 или 36 и аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO: 37; и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность CDRL1, представленную в любом из SEQ ID NO: 40-43, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно любому из SEQ ID NO: 45-53, и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO: 55 или 56, где CDR определены в соответствии системой нумерации CCG, и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с областью антигенной петли HBsAg и нейтрализовать инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I, или J, или любой их комбинации.

В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 представляют собой SEQ ID NO: (i) 34, 35, 37, 41, 45 и 55, соответственно; (ii) 34, 35, 37, 41, 46 и 55, соответственно; (iii) 34, 35, 37, 41, 47 и 55, соответственно; (iv) 34, 35, 37, 41, 48 и 55, соответственно; (v) 34, 35, 37, 41, 49 и 55, соответственно; (vi) 34, 35, 37, 41, 50 и 55, соответственно; (vii) 34, 35, 37, 41, 41, 51 и 55, соответственно; (viii) 34, 35, 37, 41, 52 и 55, соответственно; или (ix) 34, 35, 37, 41, 53, 55 и 55, соответственно.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где: (i) VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или любое нецелое значение между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или 39; и/или (ii) VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или любое нецелое значение между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-66, 69, 71 или 72.

В некоторых вариантах реализации изобретения VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или 39; и/или VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 58-66, 69, 71 или 72.

В конкретных вариантах реализации изобретения VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: (i) 38 и 58, соответственно; (ii) 38 и 59, соответственно; (iii) 38 и 60, соответственно; (iv) 38 и 61, соответственно; (v) 38 и 62, соответственно; (vi) 38 и 63, соответственно; (vii) 38 и 64, соответственно; (viii) 38 и 65, соответственно; (ix) 38 и 66, соответственно; (x) 38 и 71, соответственно; или (xi) 38 и 72, соответственно.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему: вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: (i) 38 и 67, соответственно; или (ii) 38 и 68, соответственно, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной петлевой областью HBsAg и нейтрализующие инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J, или любой их комбинации.

Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH согласно SEQ ID NO: 38 или 39 и вариант VL любой из SEQ ID NO: 57-72, который содержит одну или более из следующих мутаций в каркасной области 3 относительно SEQ ID NO: 57-72, как определено согласно нумерации CCG: R60A, R60N, R60K, S64A, I74A. В некоторых вариантах реализации изобретения в варианте не содержится дополнительной мутации относительно SEQ ID NO: 57-72, соответственно.

Также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH согласно SEQ ID NO: 38 или 39 и вариант VL любой из SEQ ID NO: 57-72, который содержит мутацию по типу замены (такую как, например, консервативная аминокислотная замена или мутация с аминокислотой, кодируемой зародышевой линией) в Q78, D81 или в обоих случаях. В некоторых вариантах реализации изобретения в варианте не содержится дополнительной мутации относительно SEQ ID NO: 57-72, соответственно.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов реализации изобретения в образце, содержащем множество антител или антигенсвязывающих фрагментов, менее 12%, 11% или менее, 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее или 2% или менее из множества присутствует в виде димера антитела, когда образец инкубировали в течение от около 120 до около 168 часов при около 40°C, где, необязательно, присутствие димера антитела определяется абсолютной эксклюзионной хроматографией. В данном контексте димер или мультимер антитела представляет собой комплекс, содержащий два или более антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению (например, димер антитело:антитело, димер Fab:Fab или димер антитело:Fab).

В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтически эффективное количество антитела к HBV или антигенсвязывающего фрагмента меньше терапевтически эффективного количества антитела к HBV или антигенсвязывающего фрагмента, доставленного субъекту, когда ингибитор экспрессии гена HBV не введили субъекту. Например, комбинированная терапия может снизить эффективную дозу антитела или антигенсвязывающего фрагмента к HBV по сравнению с введением только антитела или антигенсвязывающего фрагмента к HBV.

В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент к HBV вводят в по меньшей мере двух отдельных дозах. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две дозы вводят два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые две недели или один раз в месяц.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект представляет собой человека, и ему вводят терапевтически эффективное количество антитела к HBV; при этом терапевтически эффективное количество составляет от около 3 до около 30 мг/кг.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве ингибитор представляет собой агент РНКи, который ингибирует экспрессию транскрипта HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибирование экспрессии транскрипта HBV измеряют с

помощью РТ-ПЦР. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибирование экспрессии транскрипта HBV измеряют по снижению уровней белка, при измерении с помощью ELISA.

В некоторых вариантах реализации агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, при этом смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов 1579-1597 SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах реализации агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем смысловая цепь содержит нуклеотиды 1579-1597 SEQ ID NO: 116.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве по меньшей мере одна цепь агента РНКи может содержать 3'-липкий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида или по меньшей мере 2 нуклеотидов.

В конкретных вариантах осуществления вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве двухцепочечная область агента РНКи может иметь длину из 15-30 нуклеотидных пар; 17-23 нуклеотидных пар; 17-25 нуклеотидных пар; 23-27 нуклеотидных пар; 19-21 нуклеотидных пар; или 21-23 нуклеотидных пар.

В конкретных вариантах осуществления вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве каждая цепь агента РНКи может представлять собой 15-30 нуклеотидов или 19-30 нуклеотидов.

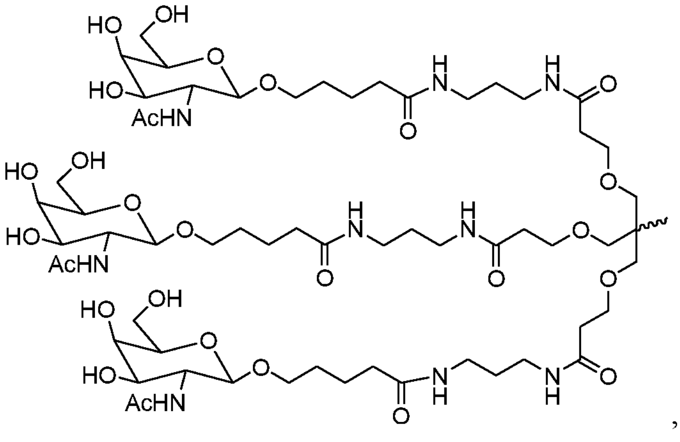
В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве агент РНКи представляет собой миРНК. В конкретных вариантах реализации изобретения миРНК ингибирует экспрессию транскрипта HBV, который кодирует белок HBsAg, белок HBcAg и белок HBx или белок ДНК-полимеразы HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения миРНК связывается по меньшей мере с 15 смежными нуклеотидами мишени, кодируемыми: геном P, нуклеотидами 2309-3182 и 1-1625 NC_003977.2; геном S (кодирующим белки L, M и S), нуклеотидами 2850-3182 и 1-837 NC_003977.2; HBx, нуклеотидами 1376-1840 NC_003977.2; или геном C, нуклеотидами 1816-2454 NC_003977.2.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве агент РНКи представляет собой миРНК, и антисмысловая цепь миРНК включает по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов или 19 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 119). В некоторых вариантах

реализации антисмысловая цепь миРНК включает нуклеотидную последовательность 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 119).В некоторых вариантах реализации антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 119). В некоторых вариантах реализации изобретения смысловая цепь миРНК включает нуклеотидную последовательность 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 118). В некоторых вариантах реализации изобретения смысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 118).

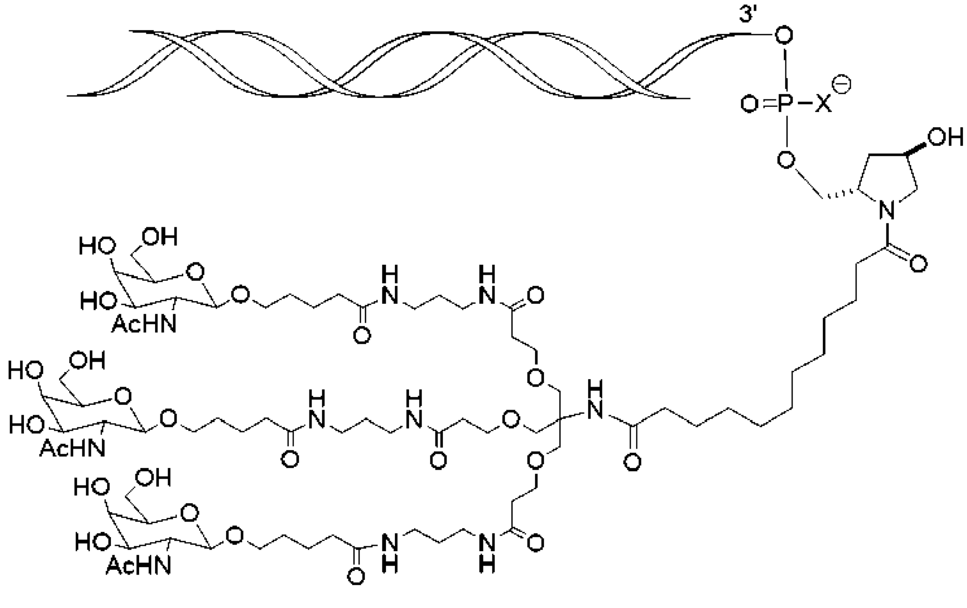
В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве агент РНКи представляет собой миРНК, и антисмысловая цепь миРНК включает по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов или 19 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO: 121). В некоторых вариантах реализации антисмысловая цепь миРНК включает нуклеотидную последовательность 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO: 121). В некоторых вариантах реализации антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO: 121). В некоторых вариантах реализации изобретения смысловая цепь миРНК включает нуклеотидную последовательность 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3' (SEQ ID NO: 120). В некоторых вариантах реализации изобретения смысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3' (SEQ ID NO: 120).

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве агент РНКи представляет собой миРНК, где по существу все нуклеотиды указанной смысловой цепи и по существу все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды, и где указанная смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце. В конкретных вариантах реализации изобретения лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный линкер, двухвалентный разветвленный линкер или трехвалентный разветвленный линкер. В некоторых вариантах реализации производное GalNAc, присоединенное через линкер, представляет собой или содержит:



,

В конкретных вариантах реализации изобретения миРНК конъюгирована с лигандом, как показано на следующей схеме (т.е. производное GalNAc, присоединенное через линкер):



,

где X представляет собой O или S.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве агент РНКи представляет собой миРНК, где по меньшей мере один нуклеотид миРНК представляет собой модифицированный нуклеотид, включающий дезоксинуклеотид, 3'-концевой дезокситиминовый (dT) нуклеотид, 2'-O-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезокси-модифицированный нуклеотид, блокированный нуклеотид, разблокированный нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, ограниченный этиловый нуклеотид, безосновный нуклеотид, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-O-аллил-модифицированный нуклеотид, 2'-C-алкил-модифицированный нуклеотид, 2'-

гидроксил-модифицированный нуклеотид, 2'-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид, фосфорамидат, нуклеотид, включающий неприродное основание, нуклеотид, модифицированный тетрагидропираном, нуклеотид, модифицированный 1,5-ангидрогекситолом, нуклеотид, модифицированный циклогексенилом, нуклеотид, включающий тиофосфатную группу, нуклеотид, включающий метилфосфонатную группу, нуклеотид включающий 5'-фосфат, аденозин-гликолевую нуклеиновую кислоту или нуклеотид, включающий миметик 5'-фосфата. В некоторых вариантах реализации изобретения миРНК включает модификацию фосфатного каркаса, модификацию 2'-рибозы, модификацию 5'-трифосфата или модификацию конъюгацией GalNAc. В некоторых вариантах реализации изобретения модификация фосфатного остова включает тиофосфатную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения 2'-рибозная модификация включает фтор- или -О-метильную замену.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве агент РНКи представляет собой миРНК, имеющую смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 122), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 123),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве агент РНКи представляет собой миРНК, имеющую смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 124), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 125)

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве агент РНКи представляет собой миРНК, имеющую смысловую цепь, содержащую 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuaL96-3' (SEQ ID NO: 126), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID NO: 127),

где a, c, g и u представляют собой 2'-O-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-O-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-O-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

В конкретных вариантах реализации вышеуказанных способов, композиций для использования или применений в производстве субъект представляет собой человека и субъекту вводят терапевтически эффективное количество агента РНКи или миРНК; и при этом эффективное количество агента РНКи или миРНК составляет от около 1 мг/кг до около 8 мг/кг.

В некоторых вариантах реализации способов, композиций для применения или применений, описанных в настоящем документе, миРНК вводят субъекту два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в четыре недели или один раз в месяц. В некоторых вариантах реализации изобретения миРНК вводят субъекту каждые четыре недели.

В некоторых вариантах реализации изобретения способы включают введение двух ингибиторов экспрессии гена HBV с антителом к HBV. Два ингибитора экспрессии гена HBV могут представлять собой две миРНК, такие как две миРНК, которые нацелены на разные гены HBV. Два разных гена HBV могут, например, представлять собой HBsAg и HBV X. Два ингибитора экспрессии гена HBV могут быть введены одновременно. В некоторых вариантах реализации изобретения вводят две миРНК, каждая из которых

направлена на ген HBV, и первая миРНК имеет антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 125; и вторая миРНК включает миРНК, имеющую смысловую цепь, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в нуклеотидах 2850-3182 SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах реализации изобретения вводят две миРНК, каждая из которых направлена на ген HBV, и первая миРНК имеет антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 121 или SEQ ID NO: 127; и вторая миРНК включает миРНК, имеющую смысловую цепь, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в нуклеотидах 2850-3182 SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах реализации изобретения вводят две миРНК, каждая из которых направлена на ген HBV, и первая миРНК имеет антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 125; и вторая миРНК имеет антисмысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO: 121 или SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах реализации изобретения первая миРНК имеет смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 122 или SEQ ID NO: 124; и вторая миРНК имеет смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 120 или SEQ ID NO: 126.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к HBV и ингибитор экспрессии гена HBV проявляют синергетический терапевтический эффект. Термин "синергия" используется для описания комбинированного эффекта двух или более активных агентов, который больше, чем сумма индивидуальных эффектов каждого соответствующего активного агента. Таким образом, если комбинированный эффект двух или более агентов приводит к "синергетическому ингибированию" активности или процесса, предполагается, что ингибирование активности или процесса больше, чем сумма ингибирующих эффектов каждого соответствующего активного агента. Термин "синергетический терапевтический эффект" относится к терапевтическому эффекту, наблюдаемому при комбинации двух или более методов лечения, где терапевтический эффект (измеряемый любым из ряда параметров) больше, чем сумма отдельных терапевтических эффектов, наблюдаемых при соответствующих индивидуальных методах лечения.

В некоторых вариантах реализации изобретения агент РНКи, нацеленный на мРНК HBV, вводят субъекту, имеющему инфекцию HBV и/или ассоциированное с HBV заболевание, таким образом, что экспрессия одного или более генов HBV, уровней cccDNA (ковалентнонепрерывная кольцевая ДНК) HBV, уровней антигена HBV, уровней вирусной нагрузки HBV, ALT и/или AST, например, в клетке, ткани, крови или жидкости субъекта снижается по меньшей мере примерно на 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%,

33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% или более.

В некоторых вариантах реализации агент РНКи, нацеленный на мРНК HBV, вводят субъекту, имеющему инфекцию HBV и/или ассоциированное с HBV заболевание, и ингибирует экспрессию гена HBV по меньшей мере примерно на 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%, или около 100%, т.е., ниже уровня обнаружения при анализе.

В некоторых вариантах реализации изобретения комбинированная терапия в соответствии с настоящим изобретением включает введение нуклеотидного (ых) аналога (ов) в качестве третьего компонента. В данном контексте термин "нуклеотидный (нуклеозидный) аналог" (или "ингибитор полимеразы" или "ингибитор обратной транскриптазы") представляет собой ингибитор репликации ДНК, который структурно подобен нуклеотиду или нуклеозиду и специфически ингибирует репликацию cccDNA HBV и существенно не ингибирует репликацию ДНК хозяина (например, человека). Такие ингибиторы включают тенофовир дизопроксилфумарат (TDF), тенофовир алафенамид (TAF), ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин (FTC), клевудин, ритонавир, дипивоксил, лобукавир, фамвир, N-ацетил-цистеин (NAC), PC1323, терадигм-HBV, тимозин-альфа, ганцикловир, бесифовир (ANA-380/LB-80380) и тенофовир-эксалиады (TLX/CMX157). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеот(з)идный аналог представляет собой энтекавир (ETV). Нуклеот(з)идные аналоги являются коммерчески доступными из ряда источников и используются в способах, представленных в настоящем документе, в соответствии с их показаниями к применению (например, обычно перорально вводят в определенной дозе) или как определено квалифицированным специалистом в лечении HBV.

Антитело к HBV или ингибитор экспрессии гена HBV могут присутствовать либо в той же фармацевтической композиции, что и третий активный компонент, либо антитело к HBV, ингибитор экспрессии гена HBV и третий активный компонент присутствуют в

трех различных фармацевтических композициях. Такие различные фармацевтические композиции можно вводить либо в комбинации/одновременно, либо в отдельные моменты времени, либо в отдельных местах (например, отдельных частях тела).

Настоящее изобретение также относится к следующим вариантам осуществления:

Вариант осуществления 1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 41, 40, 42 и 43, аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 49, 44-48 и 50-53 и аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55 или 56, где, необязательно, VL содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию, относительно SEQ ID NO: 58, и где аминокислотная нумерация мутации(мутаций) по типу замены соответствует SEQ ID NO: 58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит какой-либо дополнительной мутации (мутаций) относительно SEQ ID NO: 58, и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной петлевой областью HBsAg и, необязательно, нейтрализуют инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J, или любая их комбинации.

Вариант осуществления 2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации изобретения 1, содержащее:(i) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35, и 37, соответственно, а в VL, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 49, и 55, соответственно; (ii) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35, и 37, а в VL, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 46 и 55, соответственно; (iii) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 47 и 55, соответственно; (iv) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, и в VL, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 48 и 55, соответственно; (v) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL - аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 45 и 55, соответственно; (vi) в VH - аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а

в VL - аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 50 и 55, соответственно; (vii) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, и в VL, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 51 и 55, соответственно; (viii) в VH, аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL - аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 52 и 55, соответственно; или (ix) в VH - аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 35 и 37, соответственно, а в VL - аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 53 и 55, соответственно.

Вариант осуществления 3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO: 35 или 36 и аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO: 37; и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность CDRL1 согласно любой из SEQ ID NO: 40-43, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно любой из SEQ ID NO: 49, 44-48 и 50-53, и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO: 55 или 56, где CDR определены в соответствии с системой нумерации CCG, и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной петлевой областью HBsAg и, необязательно, нейтрализуют инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J или любая их комбинация, при условии, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 согласно SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 45, соответственно.

Вариант осуществления 4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации изобретения 3, где аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 представляют собой SEQ ID NO: (i) 34, 35, 37, 41, 49 и 55, соответственно; (ii) 34, 35, 37, 41, 46 и 55, соответственно; (iii) 34, 35, 37, 41, 47 и 55, соответственно; (iv) 34, 35, 37, 41, 48 и 55, соответственно; (v) 34, 35, 37, 41, 45 и 55, соответственно; (vi) 34, 35, 37, 41, 50 и 55, соответственно; (vii) 34, 35, 37, 41, 41, 51 и 55, соответственно; (viii) 34, 35, 37, 41, 52 и 55, соответственно; (ix) 34, 35, 37, 41, 53 и 55, соответственно; или (x) 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно.

Вариант осуществления 5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH и VL содержат CDRH1, CDRH2, CDRH3 и CDRL1, CDRL2, CDRL3,

соответственно, согласно: HBC34-v40; HBC34-v36; HBC34-v37; HBC34-v38; HBC34-v39; HBC34-v41; HBC34-v42; HBC34-v43; HBC34-v44; HBC34-v45; HBC34-v46; HBC34-v47; HBC34-v48; HBC34-v49; или HBC34-v50,

где CDR определены в соответствии с нумерацией IMGT, необязательно, где VL дополнительно содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию относительно SEQ ID NO: 58, и где аминокислотная нумерация мутации (мутаций) по типу замены соответствует SEQ ID NO: 58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит какой-либо дополнительной мутации (мутаций) относительно SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH и VL содержат CDRH1, CDRH2, CDRH3 и CDRL1, CDRL2, CDRL3, соответственно, согласно: HBC34-v40; HBC34-v36; HBC34-v37; HBC34-v38; HBC34-v39; HBC34-v41; HBC34-v42; HBC34-v43; HBC34-v44; HBC34-v45; HBC34-v46; HBC34-v47; HBC34-v48; HBC34-v49; или HBC34-v50,

где CDR определены в соответствии с нумерацией CCG, необязательно, где VL дополнительно содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию относительно SEQ ID NO: 58, и где аминокислотная нумерация мутации (мутаций) по типу замены соответствует SEQ ID NO: 58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит какой-либо другой мутации (мутаций) относительно SEQ ID NO: 58.

Вариант осуществления 7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-6, где: (i) VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или 39; и/или (ii)

VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61, 63-66, 69, 71 и 72.

Вариант осуществления 8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-7, где: (i) VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или любое нецелое значение между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или

39; и/или (ii) VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или любое нецелое значение между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61, 63-66, 69, 71 и 72.

Вариант осуществления 9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-8, где VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или любое нецелое значение между ними) идентичных аминокислотным последовательностям, показанным в SEQ ID NO: (i) 38 и 62, соответственно; (ii) 38 и 59, соответственно; (iii) 38 и 60, соответственно; (iv) 38 и 61, соответственно; (v) 38 и 58, соответственно; (vi) 38 и 63, соответственно; (vii) 38 и 64, соответственно; (viii) 38 и 65, соответственно; (ix) 38 и 66, соответственно; (x) 38 и 71, соответственно; или (xi) 38 и 72, соответственно.

Вариант осуществления 10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38 или 39, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит вариант любой из SEQ ID NO: 62, 57-61 и 63-72, где вариант содержит любую одну или более из следующих мутаций: R60A; R60N; R60K; S64A; и I74A, и где, необязательно, вариант VL не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 62, 57-61 и 63-72, соответственно.

Вариант осуществления 11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38 или 39, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит вариант любой из SEQ ID NO: 62, 57-61 и 63-72, где вариант содержит мутацию по типу замены (такую как, например, консервативная замена аминокислоты или мутация в аминокислоту, кодируемую зародышевой линией) в Q78, D81 или в обоих случаях, и где, необязательно, вариант VL не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 62, 57-61 и 63-72, соответственно.

Вариант осуществления 12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-9, где: VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или 39; и/или VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61, 63-66, 69, 71 или 72.

Вариант осуществления 13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-9 и 12, где VH и VL содержат или состоят из

аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: (i) 38 и 62, соответственно; (ii) 38 и 59, соответственно; (iii) 38 и 60, соответственно; (iv) 38 и 61, соответственно; (v) 38 и 58, соответственно; (vi) 38 и 63, соответственно; (vii) 38 и 64, соответственно; (viii) 38 и 65, соответственно; (ix) 38 и 66, соответственно; (x) 38 и 71, соответственно; или (xi) 38 и 72, соответственно.

Вариант осуществления 14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: (i) 38 и 62, соответственно; (ii) 38 и 66, соответственно; (iii)

38 и 67, соответственно; (iv) 38 и 68, соответственно; или (v) 38 и 72, соответственно,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной областью петли HBsAg и нейтрализовать инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J или любой их комбинации.

Вариант осуществления 15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-14, которые способны нейтрализовать инфекцию вируса гепатита D (HDV).

Вариант осуществления 16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-15, где в образце, содержащем множество антител или антигенсвязывающих фрагментов, менее 12%, 11% или менее, 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее или 2% или менее из множества присутствует в виде димера, когда образец инкубировали в течение от около 120 до около 168 часов при около 40°C, где, необязательно, присутствие димера определяется абсолютной эксклюзионной хроматографией.

Вариант осуществления 17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-16, где инкубация множества антител или антигенсвязывающих фрагментов приводит к уменьшению образования димера по сравнению с инкубацией множества эталонных антител или антигенсвязывающих фрагментов,

где эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную

последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57,

и где, необязательно, присутствие димера антитела определяют с помощью абсолютной эксклюзионной хроматографии.

Вариант осуществления 18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-17, которые образуют меньшее количество димера и/или образуют димеры с пониженной частотой и/или в виде более низкого процента от общего количества молекул антитела или антигенсвязывающего фрагмента в образце или композиции по сравнению с эталонным антителом:

(i) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 4°C;

(ii) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 25°C; и/или

(iii) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 40°C,

где эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

Вариант осуществления 19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-18, где процентное содержание антитела или антигенсвязывающего фрагмента в композиции, содержащегося в виде димера, составляет менее 4/5, менее 3/4, менее 1/2, менее 1/3, менее 1/4, менее 1/5, менее 1/6, менее 1/7, менее 1/8, менее 1/9 или менее 1/10 процентного содержания эталонных молекул антитела в композиции, присутствующей в виде димера, соответственно.

Вариант осуществления 20. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-19, где клетка-хозяин, трансфицированная полинуклеотидом, кодирующим антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обеспечивает 1,5x или более, 2x или более, 3x или более, или 4x или более количества аминокислотных последовательностей антитела или антигенсвязывающего фрагмента, соответственно, чем эталонная клетка-хозяин, трансфицированная полинуклеотидом, кодирующим эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, причем эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно

содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38 и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

Вариант осуществления 21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-20, которые продуцируются в трансфицированных клетках с более высоким титром по сравнению с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые продуцируются в эталонных трансфицированных клетках, где эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержат аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

Вариант осуществления 22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-21, которые продуцируются в трансфицированных клетках при титрах по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза или по меньшей мере в 4 раза выше титра, при котором получают эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержат аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

Вариант осуществления 23. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-22, которые способны связываться с HBsAg (ADW) со значением EC50 (нг/мл) около 3,2 или менее, менее 3,0, менее 2,5, менее 2,0, менее 1,5 или менее 1,0.

Вариант осуществления 24. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-23, которые способны связываться с HBsAg (например, подтипа adw) с EC50 (нг/мл) менее 3,5, менее 3,4, менее 3,3, менее 3,2, менее 3,1, менее 3,0, менее 2,9, менее 2,8, менее 2,7, менее 2,6, менее 2,5, менее 2,4, менее 2,3, менее 2,1, менее 2,0, менее 1,9, менее 1,8, менее 1,7, менее 1,6, менее 1,5, менее 1,4, менее 1,3, менее 1,2, менее 1,1 или менее 1,0.

Вариант осуществления 25. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-24, которые способны связываться с HBsAg

(например, подтипа ADW) с EC50 (нг/мл) от 0,9 до 2,0, или от 0,9 до 1,9, или от 0,9 до 1,8, или от 0,9 до 1,7, или от 0,9 до 1,6, или от 0,9 до 1,5, или от 0,9 до 1,4, или от 0,9 до 1,3, или от 0,9 до 1,2, или от 0,9 до 1,1, или от 0,9 до 1,0, или от 1,0 до 2,0.

Вариант осуществления 26. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-25, которые способны связываться с HBsAg (adw) со значением EC50 (нг/мл) 2,0 или менее.

Вариант осуществления 27. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-26, которые имеющий EC50 нейтрализации инфекции вируса гепатита B менее 20 нг/мл, предпочтительно 15 нг/мл или менее, более предпочтительно 10 нг/мл или менее.

Вариант осуществления 28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-27, которые способны нейтрализовать вирусную инфекцию гепатита B с EC50 нейтрализации инфекции 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 нг/мл.

Вариант осуществления 29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-28, которые способны нейтрализовать вирус гепатита B с EC50 нейтрализации инфекции, которая ниже, чем EC50 нейтрализации инфекции эталонного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержат аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 57.

Вариант реализации изобретения 30. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-29, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает человеческое антитело, моноклональное антитело, очищенное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab’, F(ab’)2, Fv или scFv.

Вариант осуществления 31. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-30, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 32. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-31, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 33. Антитело по любому из вариантов реализации 1-32 или его антигенсвязывающий фрагмент,которые содержат Fc-фрагмент.

Вариант осуществления 34. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 33, где Fc-фрагмент содержит мутацию, усиливающую связывание с FcRn по сравнению с эталонным Fc-фрагментом, который не содержит мутацию.

Вариант осуществления 35. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 33 или 34, где Fc-фрагмент содержит мутацию, усиливающую связывание с FcγR, предпочтительно FcγRIIA и/или FcγRIIIA, по сравнению с эталонным Fc-фрагментом, который не содержит мутацию.

Вариант осуществления 36. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно вариантам реализации 33-35, где Fc-фрагмент представляет собой изотип IgG, такой как IgG1, или получен из изотипа IgG, такого как IgG1.

Вариант осуществления 37. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 33-36, которые содержат или являются производными от Ig G1m17, 1 (IgHG1*01).

Вариант осуществления 38. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 34-37, где мутация, усиливающая связывание с FcRn, содержит: (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), причем аминокислотная нумерация Fc-фрагмента соответствует системе нумерации EU.

Вариант осуществления 39. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 38, где мутация, усиливающая связывание с FcRn, включает M428L/N434S.

Вариант осуществления 40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 35-39, где мутация, усиливающая связывание с FcγR, содержит S239D; I332E; A330L; G236A; или любую их комбинацию, причем нумерация аминокислот Fc-фрагмента соответствует системе нумерации EU.

Вариант осуществления 41. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации изобретения 40, где мутация, усиливающая связывание с FcγR, содержит: (i) S239D/I332E; (ii) S239D/A330L/I332E; (iii) G236A/S239D/I332E; или (iv) G236A/A330L/I332E.

Вариант осуществления 42. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 40 или 41, где мутация, усиливающая связывание с FcγR, содержит или состоит из G236A/A330L/I332E, и необязательно при этом антитело или

антигенсвязывающий фрагмент не содержит S239D, и при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно необязательно содержит нативный S в положении 239.

Вариант осуществления 43. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 33-42, где Fc-фрагмент содержит мутации по типу аминокислотной замены: M428L; N434S; G236A; A330L; и I332E, и необязательно не содержит S239D.

Вариант осуществления 44. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-43, содержащие константную область легкой цепи (CL), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79.

Вариант осуществления 45. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-44, содержащие CH1-CH2-CH3, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73, или ее варианта, который содержит одну или более из следующих аминокислотных замен (нумерация EC): G236A; A330L; I332E; M428L; N434S.

Вариант осуществления 46. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 45, где в CH1-CH2-CH3 удален C-концевой лизин.

Вариант осуществления 47. Антитело, содержащее: тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 75, необязательно с удаленным C-концевым лизином; и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61 и 63-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO: 79.

Вариант осуществления 48. Антитело согласно варианту реализации 47, где LC содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из SEQ ID NO: 62, 66, 67 и 72.

Вариант осуществления 49. Антитело, содержащее тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, необязательно с удаленным C-концевым лизином, и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61 и 63-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO: 79.

Вариант осуществления 50. Антитело согласно варианту реализации 49, где LC содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из SEQ ID NO: 62, 66, 67 и 72.

Вариант осуществления 51. Антитело, содержащее тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 77, необязательно с удаленным C-концевым лизином, и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61 и 63-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO: 79.

Вариант осуществления 52. Антитело согласно варианту реализации 51, где LC содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из SEQ ID NO: 62, 66, 67 и 72.

Вариант осуществления 53. Антитело, содержащее тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 78, необязательно с удаленным C-концевым лизином, и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61 и 63-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO: 79.

Вариант осуществления 54. Антитело согласно варианту реализации 53, где LC содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из SEQ ID NO: 62, 66, 67 и 72.

Вариант осуществления 55. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-54, которые способны связывать HBsAg генотипа, выбранного из генотипов HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J, или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 56. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-55, которые способны снижать концентрацию ДНК HBV в сыворотке у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Вариант осуществления 57. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-56, которые способны снижать концентрацию HBsAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Вариант осуществления 58. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-57, которые способны снижать концентрацию HBeAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Вариант осуществления 59. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-58, которые способны снижать концентрацию HBcrAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

Вариант осуществления 60. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-59.

Вариант осуществления 61. Полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи (VL) и, необязательно, константная область легкой цепи (CL) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов реализации 1-59.

Вариант осуществления 62. Полинуклеотид согласно варианту реализации 61, где нуклеотидная последовательность, кодирующая указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке-хозяине.

Вариант осуществления 63. Полинуклеотид согласно варианту реализации 62, содержащий нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную нуклеотидной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 89, 85-88 и 90-99.

Вариант осуществления 64. Полинуклеотид по любому из вариантов реализации 60-63, содержащий (i) полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82, и (ii) полинуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 89, 85-88 и 90-99.

Вариант осуществления 65. Полинуклеотид по любому из вариантов реализации 60-63, содержащий (i) полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83, и (ii) полинуклеотидную последовательность, представленную в любой одной или более SEQ ID NO: 89, 85-88 и 90-99.

Вариант осуществления 66. Полинуклеотид по любому из вариантов реализации 60-63, содержащий (i) полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84, и (ii) полинуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 89, 85-88 и 90-99.

Вариант осуществления 67. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из вариантов реализации изобретения 60-66.

Вариант осуществления 68. Вектор согласно варианту реализации 67, который включает лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.

Вариант осуществления 69. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из вариантов реализации изобретения 60-66 и/или вектор по варианту реализации изобретения 67 или 68.

Вариант осуществления 70. Фармацевтическая композиция, содержащая: (i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-59; (ii) полинуклеотид по любому из вариантов реализации 60-66; (iii) вектор по варианту реализации 67 или 68; (iv) клетку-хозяина по варианту реализации 69; или (v) любую комбинацию (i)-(iv) и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

Вариант осуществления 71. Набор, содержащий:

(a) компонент, выбранный из: (i) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов реализации 1-59; (ii) полинуклеотида по любому из вариантов реализации 60-66; (iii) вектора по варианту реализации 67 или 68;

(iv) клетку-хозяина по варианту реализации 69; (v) фармацевтическую композицию по варианту реализации 70; или (vi) любую комбинацию (i)-(vi); и

(b) (1) инструкции по применению компонента для предотвращения, лечения, ослабления и/или диагностики инфекции гепатита B и/или инфекции гепатита D и/или (2) средства для введения компонента субъекту, такого как шприц.

Вариант осуществления 72. Композиция по варианту реализации изобретения 70 или набор по варианту реализации изобретения 71, дополнительно содержащий: (i) ингибитор полимеразы, где ингибитор полимеразы необязательно содержит ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (ii) интерферон, где интерферон необязательно содержит IFN-бета и/или IFN-альфа; (iii) ингибитор контрольной точки, где ингибитор контрольной точки необязательно содержит антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент; (iv) агонист стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки; или (v) любую комбинацию (i)-(iv).

Вариант осуществления 73. Композиция или набор по варианту реализации изобретения 72, где ингибитор полимеразы содержит ламивудин.

Вариант осуществления 74. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов реализации 1-59, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту реализации 69 в условиях и в течение времени, достаточных для получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 75. Применение (i) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов реализации 1-59; (ii) полинуклеотида по любому из пп. 60-66; (iii) вектора по варианту реализации 67 или 68; (iv) клетки-хозяина по варианту реализации 69; и/или (v) фармацевтической композиции по вариантам реализации 70, 72

или 73 при изготовлении лекарственного средства для профилактики, лечения, ослабления и/или диагностики инфекции гепатита B и/или инфекции гепатита D у субъекта.

Вариант осуществления 76. Способ лечения, профилактики и/или ослабления инфекции гепатита B и/или гепатита D у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества: (i) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов реализации 1-59; (ii) полинуклеотида по любому из вариантов реализации 60-66; (iii) вектора по варианту реализации 67 или 68; (iv) клетки-хозяина по варианту реализации 69; и/или (v) фармацевтической композиции по вариантам реализации 70, 72 или 73.

Вариант осуществления 77. Способ по варианту реализации 76, дополнительно включающий введение субъекту одного или более из: (vi) ингибитора полимеразы, который необязательно содержит ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (vii) интерферона, который необязательно содержит IFN-бета и/или IFN-альфа; (viii) ингибитора контрольной точки, который необязательно содержит антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент; (ix) агониста молекулы, стимулирующей иммунную контрольную точку; или (x) любой комбинации (vi)-(ix).

Вариант осуществления 78. Способ по вариантам реализации 76 или 77, где инфекция гепатита B представляет собой хроническую инфекцию гепатита B.

Вариант осуществления 79. Способ по любому из вариантов реализации 76-78, где субъект получил трансплантат печени.

Вариант осуществления 80. Способ по любому из вариантов реализации 76-79, где субъект не иммунизирован против гепатита B.

Вариант осуществления 81. Способ по любому из вариантов реализации 76-80, где субъект является новорожденным.

Вариант осуществления 82. Способ по любому из вариантов реализации 76-81, где субъект подвергается или подвергался гемодиализу.

Вариант осуществления 83. Способ по любому из вариантов реализации 76-82, который включает введение субъекту однократной дозы указанной фармацевтической композиции, содержащей указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 84. Способ по варианту реализации 83, где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в диапазоне от 2 до 18 мг/кг (масса тела субъекта).

Вариант осуществления 85. Способ по варианту реализации 83 или 84, где разовая доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 6 мг, вплоть до 10 мг, вплоть до 15 мг, вплоть до 18 мг, вплоть до 25 мг, вплоть до 30 мг, вплоть до 35 мг, вплоть до 40 мг, вплоть до 45 мг, вплоть до 50 мг, вплоть до 55 мг, вплоть до 60 мг, вплоть до 75 мг, вплоть до 90 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 900 мг или вплоть до 3000 мг антитела,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 5 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 10 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 25 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 30 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 50 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 60 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 75 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 90 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 100 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 150 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 200 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 300 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 500 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 750 мг до 3000 мг, или в диапазоне от от 900 мг до 3000 мг или в диапазоне от 1500 мг до 3000 мг или в диапазоне от 2000 мг до 3000 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 900 мг или в диапазоне от 5 мг до 900 мг, или в диапазоне от 10 мг до 900 мг, или в диапазоне от 25 мг до 900 мг, или в диапазоне от 30 мг до 900 мг, или в диапазоне от 50 мг до 900 мг, или в диапазоне от 60 мг до 900 мг, или в диапазоне от 75 мг до 900 мг, или в диапазоне от 90 мг до 900 мг, или в диапазоне от 100 мг до 900 мг, или в диапазоне от 150 мг до 900 мг, или в диапазоне от 200 мг до 900 мг, или в диапазоне от 300 мг до 900 мг, или в диапазоне от 500 мг до 900 мг, или в диапазоне от 750 мг до 900 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, отличающемся тем, что однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 500 мг, или в диапазоне от 5 мг до 500 мг, или в диапазоне от 10 мг до 500 мг, или в диапазоне от 25 мг до 500 мг, или в диапазоне от 30 мг до 500 мг, или в диапазоне от 50 мг до 500 мг, или в диапазоне от 60 мг до 500 мг, или в диапазоне от 75 мг до 500 мг, или в диапазоне от 90 мг до 500 мг, или в диапазоне от 100 мг до 500 мг, или в диапазоне от 150 мг до 500 мг, или в диапазоне от 200 мг до 500 мг, или в диапазоне от 300 мг до 500 мг, или в диапазоне от 400 мг до 500 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 300 мг или в диапазоне от 5 мг до 300 мг, или в диапазоне от 10 мг до 300 мг, или в диапазоне от 25 мг до 300 мг, или в диапазоне от 30 мг до 300 мг, или в диапазоне от 50 мг до 300 мг, или в диапазоне от 60 мг

до 300 мг, или в диапазоне от 75 мг до 300 мг, или в диапазоне от 90 мг до 300 мг, или в диапазоне от 100 мг до 300 мг, или в диапазоне от 150 мг до 300 мг, или в диапазоне от 200 мг до 300 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 200 мг или в диапазоне от 5 мг до 200 мг, или в диапазоне от 10 мг до 200 мг, или в диапазоне от 25 мг до 200 мг, или в диапазоне от 30 мг до 200 мг, или в диапазоне от 50 мг до 200 мг, или в диапазоне от 60 мг до 200 мг, или в диапазоне от 75 мг до 200 мг, или в диапазоне от 90 мг до 200 мг, или в диапазоне от 100 мг до 200 мг, или в диапазоне от 150 мг до 200 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 100 мг, или в диапазоне от 5 мг до 100 мг, или в диапазоне от 10 мг до 100 мг, или в диапазоне от 25 мг до 100 мг, или в диапазоне от 30 мг до 100 мг, или в диапазоне от 50 мг до 100 мг, или в диапазоне от 60 мг до 100 мг, или в диапазоне от 75 мг до 100 мг, или в диапазоне от 75 мг до 100 мг, или в диапазоне от 90 мг до 100 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 25 мг, или в диапазоне от 5 мг до 25 мг, или в диапазоне от 10 мг до 25 мг, или в диапазоне от 15 мг до 25 мг, или в диапазоне от 20 мг до 25 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 50 мг, или в диапазоне от 1 мг до 25 мг, или в диапазоне от 5 мг до 50 мг, или в диапазоне от 5 мг до 25 мг, или в диапазоне от 10 до 50 мг, или в диапазоне от 10 до 25 мг, или в диапазоне от 1 до 15 мг, или в диапазоне от 5 мг до 15 мг, или в диапазоне от 10 мг до 15 мг, или где разовая доза фармацевтической композиции содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885,

890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, или 1000 мг или более антитела

или где разовая доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое составляет менее 3000 мг, менее 2500 мг, менее 2000 мг, менее 1500 мг, менее 1000 мг, менее 900 мг, менее 500 мг, менее 300 мг, менее 200 мг, менее 100 мг, менее 90 мг, менее 75 мг, менее 50 мг, менее 25 мг или менее 10 мг, но составляет более 1 мг, более 2 мг, более 3 мг, более 4 мг или более 5 мг.

Вариант осуществления 86. Способ по любому из вариантов реализации 83-85, где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в концентрации в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл, 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 87. Способ по любому из вариантов реализации 83-86, где однократная доза фармацевтической композиции содержит около 75 мг антитела.

Вариант осуществления 88. Способ по любому из вариантов реализации 83-87, где однократная доза фармацевтической композиции содержит около 90 мг антитела.

Вариант осуществления 89. Способ по любому из вариантов реализации 83-88, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 300 мг антитела.

Вариант осуществления 90. Способ по любому из вариантов реализации 83-89, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 900 мг антитела.

Вариант осуществления 91. Способ по любому из вариантов реализации 83-90, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 3000 мг антитела.

Вариант осуществления 92. Способ по любому из вариантов реализации 83-91, где способ включает введение однократной дозы путем подкожной инъекции, необязательно при этом однократная доза содержит или состоит из 6 мг антитела или 18 мг антитела.

Вариант осуществления 93. Способ по любому из вариантов реализации 83-92, который включает введение однократной дозы путем внутривенной инъекции.

Вариант осуществления 94. Способ по любому из вариантов реализации 83-93, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду, необязательно воду по Фармакопее США.

Вариант осуществления 95. Способ по любому из вариантов реализации 83-94, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит гистидин, необязательно в концентрации в диапазоне от 10 мМ до 40 мМ, такой как 20 мМ.

Вариант осуществления 96. Способ по любому из вариантов реализации 83-95, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит дисахарид, такой как сахароза,

необязательно в количестве 5%, 6%, 7%, 8% или 9%, предпочтительно около 7% (мас./об.).

Вариант осуществления 97. Способ по любому из вариантов реализации 83-96, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество или триблок-сополимер, необязательно полисорбат или полоксамер-188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), причем, необязательно, полисорбат или полоксамер-188 присутствует в диапазоне от 0,01 до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02% (мас./об.).

Вариант осуществления 98. Способ по любому из вариантов реализации 83-97, 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 99. Способ по варианту реализации изобретения 98, где фармацевтическая композиция содержит:

(i) антитело в концентрации 150 мг/мл;

ii) воду по Фармакопее США;

(iii) 20 мМ гистидина;

(iv) 7% сахарозы; и

(v) 0,02% PS80,

где фармацевтическая композиция имеет pH 6.

Вариант осуществления 100. Способ по любому из вариантов реализации 83-99, где субъект является взрослым.

Вариант осуществления 101. Способ по варианту реализации 100, где субъект находится в диапазоне от 18 до 65 лет.

Вариант осуществления 102. Способ по любому из вариантов реализации 83-101, где субъект весит от 40 до 125 кг и/или субъект имеет индекс массы тела (ИМТ) от 18 до 35 кг/м^2.

Вариант осуществления 103. Способ по любому из вариантов реализации 83-102, где субъект имеет хроническую инфекцию HBV; например, определяемую положительным сывороточным HBsAg, ДНК HBV и/или HBeAg в 2 случаях, причем 2 случая являются по меньшей мере 6-месячными интервалами.

Вариант осуществления 104. Способ по любому из вариантов реализации 83-103, где у субъекта отсутствует цирроз печени.

Вариант осуществления 105. Способ по варианту реализации изобретения 104, где отсутствие цирроза печени определяется:

оценкой с помощью фиброскана (например, в течение 6 месяцев до введения однократной дозы фармацевтической композиции); или

биопсией печени (например, в течение 12 месяцев до введения однократной дозы фармацевтической композиции),

где предпочтительно отсутствие цирроза определяется отсутствием фиброза F3 по Метавиру или отсутствием цирроза F4.

Вариант осуществления 106. Способ по любому из вариантов реализации 83-105, где субъект получил ингибитор обратной транскриптазы (NRTI), необязательно в течение 120 дней, дополнительно необязательно в течение 60 дней, до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 107. Способ по варианту реализации 106, где NRTI содержит один или более из: тенофовира; тенофовира дизопроксила (например, тенофовира диспроксилфумарата); тенофовира алафенамида; энтекавира; ламивудина; адефовира; и адефовира дипивоксила.

Вариант осуществления 108. Способ по любому из вариантов реализации 83-107, где субъект имеет концентрацию ДНК HBV в сыворотке менее 100 МЕ/мл не более чем за 28 дней до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 109. Способ по любому из вариантов реализации 83-108, где субъект имеет концентрацию HBsAg в сыворотке менее 3000 МЕ/мл до введения однократной дозы и необязательно менее 1000 МЕ/мл до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 110. Способ по любому из вариантов реализации 83-109, где субъект имеет концентрацию HBsAg в сыворотке более или равную 3000 МЕ/мл не более чем за 28 дней до введения однократной дозы и, необязательно, более или равную 1000 МЕ/мл не более чем за 28 дней до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 111. Способ по любому из вариантов реализации 83-110, где субъект был HB е-антиген (HBeAg) -отрицательным не более чем за 28 дней до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 112. Способ по любому из вариантов реализации 83-111, где у субъекта отсутствовали антитела к HB не более чем за 28 дней до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 113. Способ по любому из вариантов реализации 83-112, где субъект перед введением однократной дозы:

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

(ii) имеет аланинаминотрансферазу (АЛТ) меньше, чем 2 × верхний предел нормы (ULN).

Вариант осуществления 114. Способ по любому из вариантов реализации 83-113, где через 56 дней после введения однократной дозы у субъекта наблюдается более чем 2-кратное снижение HBsAg в сыворотке (например, концентрация HBsAg в сыворотке,

например, как определено с помощью анализа Abbott ARCHITECT) по сравнению с HBsAg в сыворотке субъекта за от 0 до 28 дней до введения однократной дозы.

Вариант осуществления 115. Способ по любому из вариантов реализации 83-114, где после введения разовой дозы (например, через 56 дней после введения разовой дозы) субъект:

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

(ii) имеет адаптивный иммунный ответ против HBV.

Вариант осуществления 116. Способ по любому из вариантов реализации 83-115, где субъект является мужчиной.

Вариант осуществления 117. Способ по любому из вариантов реализации изобретения 83-115, где субъект представляет собой субъект женского пола.

Вариант осуществления 118. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-59 в концентрации от 100 до 200 мг/мл, такой как 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,

и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант осуществления 119. Фармацевтическая композиция по варианту реализации 118, которая 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 120. Фармацевтическая композиция по варианту реализации 118 или 119, которая содержит около 75 мг антитела.

Вариант осуществления 121. Фармацевтическая композиция по варианту реализации 118 или 119, которая содержит около 90 мг антитела.

Вариант осуществления 122. Фармацевтическая композиция по варианту реализации 118 или 119, которая содержит около 300 мг антитела.

Вариант осуществления 123. Фармацевтическая композиция по варианту реализации 118 или 119, которая содержит около 900 мг антитела.

Вариант осуществления 124. Фармацевтическая композиция по варианту реализации 118 или 119, которая содержит около 3000 мг антитела.

Вариант осуществления 125. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов реализации 118-124, которая содержит воду, необязательно воду по Фармакопее США.

Вариант осуществления 126. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов реализации 118-125, которая содержит гистидин, необязательно в концентрации от 10 до 40 мМ, такой как 20 мМ.

Вариант осуществления 127. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов реализации 118-126, которая содержит дисахарид, такой как сахароза, необязательно в количестве 5%, 6%, 7%, 8% или 9%, предпочтительно около 7% (мас./об.).

Вариант осуществления 128. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов реализации 118-127, которая содержит поверхностно-активное вещество, необязательно полисорбат, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), причем, необязательно, полисорбат присутствует в диапазоне от 0,01% до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02% (мас./об.).

Вариант осуществления 129. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов реализации 118-128, которая 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 130. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов реализации 118-129, которая содержит:

(i) антитело в концентрации 150 мг/мл;

ii) воду по Фармакопее США;

(iii) 20 мМ гистидина;

(iv) 7% сахарозы; и

(v) 0,02% PS80,

где фармацевтическая композиция имеет pH 6.

Вариант осуществления 131. Способ по любому из вариантов реализации 83-117, где после введения однократной дозы HBsAg в сыворотке у субъекта снижено по сравнению с исходным уровнем на 1,0 $\log^{10}$ МЕ/мл, 1,5 $\log^{10}$ МЕ/мл или более, причем, необязательно, снижение сохраняется в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более дней после введения однократной дозы.

Вариант осуществления 132. Способ по любому из вариантов реализации 83-117 и 131, где после введения однократной дозы HBsAg субъекта в сыворотке снижено по сравнению с исходным уровнем в течение по меньшей мере 8, по меньшей мере 15, по меньшей мере 22 или по меньшей мере 29 дней.

Вариант осуществления 133. Способ диагностики in vitro гепатита B и/или инфекции гепатита D, включающий:

(i) приведение в контакт образца, полученного от субъекта, с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов реализации 1-59; и

(ii) обнаружение комплекса, содержащего антиген и антитело или содержащего антиген и антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 134. Способ согласно варианту осуществления 133, где образец включает кровь, полученную от субъекта.

Вариант осуществления 135. Способ обнаружения наличия или отсутствия эпитопа в правильной конформации в вакцине против гепатита B и/или гепатита D, включающий:

(i) приведение вакцины в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов реализации 1-59; и

(ii) определение того, образовался ли комплекс, содержащий антиген и антитело, или содержащий антиген и антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 136. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1-59, которые:

(i) имеют усиленное связывание с FcγRIIA человека, FcγRIIIA человека или с обоими, по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, который не содержит G236A/A330L/I332E, где FcγRIIA человека необязательно представляет собой H131 или R131, и/или FcγRIIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158;

(ii) имеют сниженное связывание с FcγRIIB человека по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, который не содержит G236A/A330L/I332E;

(iii) не связываются с FcγRIIB человека;

(iv) имеют сниженное связывание с C1q человека по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, который не содержит G236A/A330L/I332E;

(v) не связываются с C1q человека; (vi) активируют FcγRIIA, FcγRIIIA человека или и то, и другое в большей степени, чем эталонный полипептид, который содержит Fc-фрагмент, который не содержит G236A/A330L/I332E, где FcγRIIA человека необязательно представляет собой H131 или R131, и/или FcγRIIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158;

(vii) не активируют FcγRIIB человека;

(viii) активируют естественную киллерную (NK) клетку человека в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный полипептид, который включает Fc-фрагмент,

который не содержит G236A/A330L/I332E, причем эталонный полипептид необязательно представляет собой антитело, которое связывается с HB Ag, необязательно HBsAg;

(ix) способны связываться с вариантом HBsAg, содержащим HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A или любой их комбинацией; и/или (x) имеют улучшенное связывание с вариантом HBsAg, содержащим HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A или любой их комбинацией по сравнению с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с HBsAg и включают Fc-фрагмент, не содержащий G236A/A330L/I332E.

Вариант осуществления 137. Способ лечения хронической инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

введение субъекту агента, который снижает антигенную нагрузку HBV; и

введение субъекту антитела к HBV по любому из вариантов реализации 1-59.

Вариант осуществления 138. Способ лечения хронической инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

введение субъекту ингибитора экспрессии гена HBV; и

введение субъекту антитела к HBV по любому из вариантов реализации 1-59.

Вариант осуществления 139. Способ по варианту реализации 137 или 138, где агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, при этом смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов 1579-1597 SEQ ID NO: 116.

Вариант осуществления 140. Способ по любому из вариантов реализации 137-139, где агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем смысловая цепь содержит нуклеотиды 1579-1597 SEQ ID NO: 116.

Вариант осуществления 141. Способ по любому из вариантов реализации 137-140, где по меньшей мере одна цепь агента РНКи содержит 3'-липкий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида.

Вариант осуществления 142. Способ по любому из вариантов реализации 137-140, где по меньшей мере одна цепь агента РНКи содержит 3'-липкий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

Вариант осуществления 143. Способ по любому из вариантов реализации 137-142, где двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 15-30 нуклеотидных пар.

Вариант осуществления 144. Способ по любому из вариантов реализации 137-142, где двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 17-23 нуклеотидных пар.

Вариант осуществления 145. Способ по любому из вариантов реализации 137-142, где двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 17-25 нуклеотидных пар.

Вариант осуществления 146. Способ по любому из вариантов реализации 137-142, где двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 23-27 нуклеотидных пар.

Вариант осуществления 147. Способ по любому из вариантов реализации 137-142, где двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 19-21 нуклеотидных пар.

Вариант осуществления 148. Способ по любому из вариантов реализации 137-142, где двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 21-23 нуклеотидных пар.

Вариант осуществления 149. Способ по любому из вариантов реализации 137-142, где каждая цепь агента РНКи содержит 15-30 нуклеотидов.

Вариант осуществления 150. Способ по любому из вариантов реализации 137-142, где каждая цепь агента РНКи содержит 19-30 нуклеотидов.

Вариант осуществления 151. Способ по любому из вариантов реализации 137-150, где агент РНКи представляет собой миРНК.

Вариант осуществления 152. Способ по варианту реализации 151, где миРНК ингибирует экспрессию транскрипта HBV, который кодирует белок HBsAg, белок HBcAg и белок HBx или белок ДНК-полимеразы HBV.

Вариант осуществления 153. Способ по варианту реализации 151 или 152, где миРНК связывается по меньшей мере с 15 смежными нуклеотидами мишени, кодируемыми: геном P, нуклеотидами 2309-3182 и 1-1625 NC_003977.2; геном S (кодирующим белки L, M и S), нуклеотидами 2850-3182 и 1-837 NC_003977.2; HBx, нуклеотидами 1376-1840 NC_003977.2; или геном C, нуклеотидами 1816-2454 NC_003977.2.

Вариант осуществления 154. Способ по варианту реализации 151 или 152, где антисмысловая цепь миРНК включает по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 119).

Вариант осуществления 155. Способ по варианту реализации 151 или 152, где антисмысловая цепь миРНК включает по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 119).

Вариант осуществления 156. Способ по варианту реализации 151 или 152, где антисмысловая цепь миРНК включает нуклеотидную последовательность 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3' (SEQ ID NO: 119).

Вариант осуществления 157. Способ по варианту реализации 151 или 152, где антисмысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACUU-3' (SEQ ID NO: 119).

Вариант осуществления 158. Способ по любому из вариантов реализации 154-157, где смысловая цепь миРНК включает нуклеотидную последовательность 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 118).

Вариант осуществления 159. Способ по любому из вариантов реализации 154-157, где смысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3' (SEQ ID NO: 118).

Вариант осуществления 160. Способ по варианту реализации 151 или 152, где антисмысловая цепь миРНК включает по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UAAAUUGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO: 121).

Вариант осуществления 161. Способ по варианту реализации 151 или 152, где антисмысловая цепь миРНК включает по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO: 121).

Вариант осуществления 162. Способ по варианту реализации 151 или 152, где антисмысловая цепь миРНК включает нуклеотидную последовательность 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO: 121).

Вариант осуществления 163. Способ по варианту реализации 151 или 152, где антисмысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3' (SEQ ID NO: 121).

Вариант осуществления 164. Способ по любому из вариантов реализации 154-157, где смысловая цепь миРНК включает нуклеотидную последовательность 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3' (SEQ ID NO: 120).

Вариант осуществления 165. Способ, композиция для использования или применение по любому из вариантов реализации 154-157, где смысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3' (SEQ ID NO: 120).

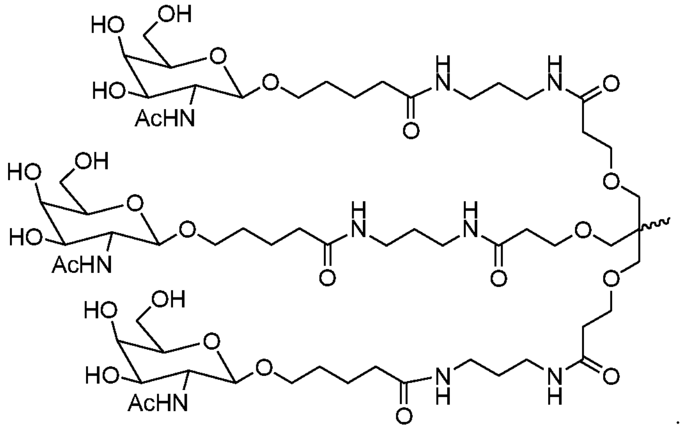
Вариант осуществления 166. Способ по любому из вариантов реализации 151-165, где по существу все нуклеотиды указанной смысловой цепи и по существу все

нуклеотиды указанной антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды, и

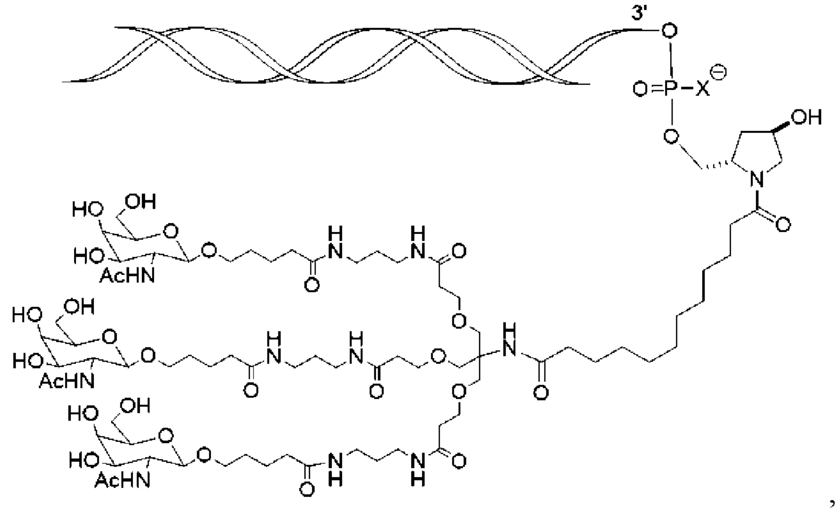
где указанная смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце.

Вариант осуществления 167. Способ по варианту реализации 166, где лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный линкер, двухвалентный разветвленный линкер или трехвалентный разветвленный линкер.

Вариант осуществления 168. Способ по варианту реализации изобретения 166 или 167, где лиганд представляет собой



Вариант осуществления 169. Способ по варианту реализации 168, где миРНК конъюгирована с лигандом, как показано в следующей структуре:



,

где X представляет собой O или S.

Вариант осуществления 170. Способ по любому из вариантов реализации 151-169, где по меньшей мере один нуклеотид миРНК представляет собой модифицированный нуклеотид, включающий дезоксинуклеотид, 3'-концевой дезокситиминовый (dT) нуклеотид, 2'-O-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный

нуклеотид, 2'-дезокси-модифицированный нуклеотид, блокированный нуклеотид, разблокированный нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, ограниченный этиловый нуклеотид, безосновный нуклеотид, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид, 2'-гидроксил-модифицированный нуклеотид, 2'-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид, фосфорамидат, нуклеотид, включающий неприродное основание, нуклеотид, модифицированный тетрагидропираном, нуклеотид, модифицированный 1,5-ангидрогекситолом, нуклеотид, модифицированный циклогексенилом, нуклеотид, включающий тиофосфатную группу, нуклеотид, включающий метилфосфонатную группу, нуклеотид содержащий 5'-фосфат, аденозин-гликолевую нуклеиновую кислоту или нуклеотид, включающий миметик 5'-фосфата.

Вариант осуществления 171. Способ по любому из вариантов реализации 151-169, где миРНК включает модификацию фосфатного каркаса, модификацию 2'-рибозы, модификацию 5'-трифосфата или модификацию конъюгацией GalNAc.

Вариант осуществления 172. Способ по варианту реализации 171, где модификация фосфатного каркаса содержит тиофосфатную связь.

Вариант осуществления 173. Способ по варианту реализации изобретения 171 или варианту реализации изобретения 172, где модификация 2'-рибозы содержит фтор- или -О-метильную замену.

Вариант осуществления 174. Способ по любому из вариантов реализации 151-159 и 166-173, где миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 122), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 123),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

Вариант осуществления 175. Способ по любому из вариантов реализации 151-159 и 166-173, где миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-

gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 124), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 125).

где a, c, g и u представляют собой 2'-O-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-O-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-O-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

Вариант осуществления 176. Способ, композиция для использования или применение по любому из вариантов реализации 151-153 и 160-173, где миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfuuuaL96-3' (SEQ ID NO: 126), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc-3' (SEQ ID NO: 127),

где a, c, g и u представляют собой 2'-O-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-O-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-O-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

Вариант осуществления 177. Способ по любому из вариантов реализации 137-176, где субъект представляет собой человека и субъекту вводят терапевтически эффективное количество агента РНКи или миРНК; и при этом эффективное количество агента РНКи или миРНК составляет от около 1 мг/кг до около 8 мг/кг.

Вариант осуществления 178. Способ по любому из вариантов реализации 137-177, где агент РНКи или миРНК вводят субъекту два раза в сутки, один раз в сутки, каждые два дня, каждые три дня, два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые четыре недели или один раз в месяц.

Вариант осуществления 179. Способ по любому из вариантов реализации 137-177, где агент РНКи или миРНК вводят субъекту каждые четыре недели.

Вариант осуществления 180. Способ по любому из вариантов реализации 151-179, где вводят две миРНК, каждая из которых направлена на ген HBV, и первая миРНК имеет антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 или SEQ ID NO: 126; и вторая миРНК включает миРНК, имеющую смысловую цепь, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в нуклеотидах 2850-3182 SEQ ID NO: 116.

Вариант осуществления 181. Способ по любому из вариантов реализации 151-179, где вводят две миРНК, направленные на ген HBV, причем две миРНК содержат: миРНК, направленную на ген X HBV, и миРНК, направленную на ген S HBV.

Вариант осуществления 182. Способ по любому из вариантов реализации 151-179, где вводят две миРНК, каждая из которых направлена на ген HBV, и первая миРНК имеет антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 125; и вторая миРНК имеет антисмысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO: 121 или SEQ ID NO: 127.

Вариант осуществления 183. Способ по варианту реализации 181, где первая миРНК имеет смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 122 или SEQ ID NO: 124; и вторая миРНК имеет смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 120 или SEQ ID NO: 126.

Вариант осуществления 184. Способ по любому из вариантов реализации 179-183, где две миРНК вводят одновременно.

Вариант осуществления 185. Способ по любому из вариантов реализации 137-184, дополнительно включающий введение субъекту нуклеотидного(ых) аналога(ов), или где субъекту также вводят нуклеотидный(ые) аналог(и).

Вариант осуществления 186. Способ, композиция для использования или применение по варианту реализации 185, где нуклеотидный (нуклеозидный) аналог IDE представляет собой тенофовир дизопроксилфумарат (TDF), тенофовир алафенамид (TAF), ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин (FTC), клевудин, ритонавир, дипивоксил, лобукавир, фамвир, N-ацетил-цистеин (NAC), PC1323, терадигм-HBV, тимозин-альфа и ганцикловир, бесифовир (ANA-380/LB-80380) или тенофир-алиады (CMX/X157).

В некоторых случаях элементы антител, антигенсвязывающих фрагментов, слитых белков, нуклеиновых кислот, клеток, композиций, комбинаций, применений и способов, предложенных в настоящем документе, описаны или перечислены со ссылкой на варианты осуществления или примеры. Однако следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, могут быть объединены различными способами для создания дополнительных вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

Далее представлены конкретные примеры, иллюстрирующие различные варианты осуществления и аспекты изобретения. Однако настоящее изобретение не должно быть ограничено по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе.

Пример 1: Образование димера антителом к HBV

Антитела к HBV описаны в публикации PCT № WO 2017/060504. Сконструированное антитело к HBV "HBC34-v7" продуцировало, в частности, антитело "HBC34-v35" (публикация PCT № WO 2020/132091), имеющие аминокислотные последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 38 и 57, соответственно. HBC34-v35 связывается с HBsAg с пикомолярной аффинностью и мощно нейтрализует десять (10) генотипов HBV и вирус гепатита D, связываясь с консервированным конформационным эпитопом. Репрезентативные данные связывания и нейтрализации для HBC34-v35 (выраженные как IgG1 и включающие мутации Fc G236A, A330L, I332E, M428L и N434S (нумерация EU; в совокупности именуемые "GAALIE-MLNS" или "GAALIE+MLNS" или "MLNS-GAALIE" или "MLNS + GAALIE")) показаны на Фигуре 1.

HBC34-v35 экспрессировали в виде рекомбинантного IgG (аллотип G1m17, 1) в линии клеток-хозяев, очищали от надосадочной жидкости и готовили для введения. Анализ эксклюзионной хроматографии состава после 1-недельной инкубации выявил пик, соответствующий мономеру антитела (то есть, одиночные молекулы антитела, содержащие две тяжелые цепи и две легкие цепи), и высокомолекулярные виды, соответствующие димеру антитела (то есть агрегату, образованному двумя одиночными молекулами антитела) (Фигура 2).

Было высказано предположение, что образование димера опосредовано взаимодействиями Fab-Fab, и что рекомбинантный Fab также должен димеризоваться. Эксклюзионную хроматографию использовали для очистки обогащенного димера IgG и димера Fab. На фиг. 3 показано, что димерная фракция Fab медленно увеличивается с

течением времени; кинетика образования димеров также увеличивается с температурой (данные не показаны).

Были описаны различные режимы димеризации Fab (см., например, Plath et al. MAbs 8(5):928-940 (2016)). В зависимости от способа димеризации Fab, Fab либо сохраняет, либо теряет способность связывать антиген. Например, можно ожидать, что димер IgG потеряет максимум 50% емкости связывания, при этом два из четырех Fab не будут затронуты. Как показано на фиг. 4, димер HBC34-v35 (полноразмерный IgG или Fab) имеет сниженное связывание с HBsAg, как определено поверхностным плазмонным резонансом (SPR; с аналогичными количествами (по массе) мономера и димерного антитела, захваченного на поверхности), что согласуется с димеризацией с участием CDR.

Затем проводили кристаллизацию димера или мономера rFab HBC34-v35. Димер rFab выделяли препаративной эксклюзионной хроматографией (Фигура 5A). 3 × 96 условий были установлены при RT (концентрация: 5,5 мг/мл). Кристаллы были получены в трех различных условиях, но плохо дифракционировали и были мультикристаллическими. Новый раунд оптимизации инкубации и кристаллизации привел к высококачественной дифракции (Фигура 5B). Для rFab мономера для очистки использовали препаративную эксклюзионную хроматографию (Фигура 6A). Материал, полученный после инкубации при 40ºC, не давал кристаллов (3 лотка при комнатной температуре, 5 мг/мл или 9 мг/мл). Вторую партию мономера получали без стадии инкубации; кристаллы образовывались при 4ºC, но не при комнатной температуре (4 лотка каждый, 2 концентрации) (Фигура 6B). Анализ кристаллической структуры димера Fab показал, что димеризация включает L-CDR2 (фиг. 7-9), что Fab, присутствующие в форме димера, имеют аналогичную конформацию и что L-CDR2 претерпевает изменение конформации между мономером и димером (фиг. 10). Были определены потенциальные взаимодействия между L-CDR2 и каркасными остатками.

Пример 2: Модифицированное антитело с образованием восстановленного димера

HBC34-v35 включает несколько мутаций в легкой цепи по сравнению с последовательностью зародышевой линии, в том числе в L-CDR2. Три смежные аминокислоты, присутствующие в L-CDR2 и, как полагают, участвующие во взаимодействиях Fab-Fab, были возвращены к зародышевой линии для получения дополнительного варианта антитела HBC34-v36. В отдельных экспериментах HBC34-v35 и HBC34-v36 Fab (больше 10 мг/мл) инкубировали при 40 ºC в течение 5-7 дней, а процент димера оценивали с помощью абсолютной эксклюзионной хроматографии (aSEC). Как показано на фиг. 11A, возврат к последовательности зародышевой линии резко снижает

димеризацию. HBC34-v36 полноразмерный IgG в дозе 3 мг/мл не димеризовался через 2 недели при 40 °C (данные не показаны).

Пример 3: Связывание и нейтрализация in vitro антителами

Сравнивали способность HBC34-v35 и HBC34-v36 связывать HBsAg и нейтрализовать инфекцию HBV. Связывание оценивали с помощью ELISA и показали, что HBC34-v36 обладает аналогичной активностью связывания с HBC34-v35 (EC50 равно 0,7 нг/мл по сравнению с 0,6 нг/мл, соответственно, Фигура 12). Нейтрализацию оценивали путем измерения уровней HBeAg (генотип D) в супернатанте клеточной культуры инфицированных HBV клеток HepG2, экспрессирующих NTCP. Данные показаны на Фигуре 13 и показывают, что нейтрализация генотипа D HBV примерно в 3 раза слабее для HBC34-v36, чем для HBC34-v35. Для этих экспериментов антитела включали Fc IgG1 дикого типа.

Пример 4: Проектирование и тестирование дополнительных сконструированных антител

Были получены дополнительные сконструированные варианты антител с мутациями в L-CDR2 и/или в каркасной последовательности относительно HBC34-v35, используя HBC34-v36 в качестве отправной точки. Эти варианты получили название HBC34-v37-HBC34-v50. Последовательности вариабельной области легкой цепи из различных антител и справка о мутациях по сравнению с HBC34-v35 представлены в таблице 6. Последовательности CDR и нумерация аминокислотных остатков, показанных в Таблице 6, соответствуют системе, разработанной Chemical Computing Group (chemcomp.com).

Таблица 6. Аминокислотные последовательности VL антител HBC34

HB C34-	Аминокислотная последовательность VL (L-CDR2 (CCG) подчеркнута)	Мутация (и) относительно HBC34-v35
v35	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:57)	--
v36	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI Y**QDSK**RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:58)	E49Q, V50D, K51S, Y52K
v37	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YE**DSK**RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:59)	V50D, K51S, Y52K
v38	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI Y**QVSK**RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:60)	E49Q, K51S, Y52K
v39	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI Y**QDKK**RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:61)	E49Q, V50D, Y52K
v40	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI Y**QDS**YRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:62)	E49Q, V50D, K51S
v41	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI Y**QVS**YRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:63)	E49Q, K51S

HB C34-	Аминокислотная последовательность VL (L-CDR2 (CCG) подчеркнута)	Мутация (и) относительно HBC34-v35
v42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YEVSYRPSGIPERFSGANSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:64)	K51S, S64A
v43	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YQVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:65)	E49Q
v44	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YAVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:66)	E49A
v45	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YEVKYRPSGIPENFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:67)	R60N
v46	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YEVKYRPSGIPEAFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTT VVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:68)	R60A
v47	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YEVSYRPSGIPENFSGANSGNTATLTASGTQAMDEAAYFCQTFDST TVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:69)	K51S, S64A, R60N, I74A
v48	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVI YEVKYRPSGIPENFSGANSGNTATLTASGTQAMDEAAYFCQTFDST TVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:70)	R60N, S64A, I74A

HBC34-	Аминокислотная последовательность VL (L-CDR2 (CCG) подчеркнута)	Мутация (и) относительно HBC34-v35
v49	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVSYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:71)	K51S
v50	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPEKFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:72)	R60K

Связывание HBsAg и нейтрализующую HBV активность HBC34-v37-HBC34-v50 тестировали с использованием анализов, как описано в настоящем документе. Результаты анализов связывания представлены на фиг. 14A-14E и показывают, что все тестируемые варианты антител, за исключением HBC34-v47 и HBC34-v48, имели сходное или даже более сильное связывание по сравнению с HBC34-v35. HBC34-v47 и HBC34-v48 также имели низкий выход и не были отобраны для дальнейших испытаний. Результаты анализа нейтрализации представлены на Фигуре 15 и показывают, что несколько антител (HBC34-v40-HBC34-v46, HBC34-v49 и HBC34-v50) обладали аналогичной или даже улучшенной нейтрализующей активностью (EC50) по сравнению с HBC34-v35. HBC34-v36-HBC34-v39 обладало менее мощной нейтрализующей активностью.

Пример 5: Очистка некоторых сконструированных антител

Модифицированные варианты антител оценивали на образование агрегатов после инкубации при различных температурах в течение 32 дней. Девять вариантов антител HBC34-v35 и исходный HBC34-v35 экспрессировали в виде рекомбинантного IgG (аллотип G1m17, 1) в линии клеток-хозяев и очищали от надосадочной жидкости. Антитела получали через неделю после продукции и концентрировали до 25 мг/мл. Анализ эксклюзионной хроматографии (ЭХ) использовали для мониторинга высокомолекулярных соединений (ВМВ), соответствующих димеру антитела, в день -1, день 0, день 5, день 15 и день 32. Образцы на день -1 оценивали перед концентрацией. Композиции антител инкубировали при 4°C (Фигура 16A), 25°C (Фигура 16B) или 40°C

(Фигура 16C) в течение 32-дневного анализа. Резюме частоты HMWS после 32-дневной инкубации при 40ºC показано на Фигуре 16D. Четыре варианта антител (-v40, -v44, -v45, -v50) демонстрировали низкую генерацию HMWS (Фигура 16D) и были отобраны для дальнейших исследований.

Пример 6: Связывание и нейтрализация in vitro

- определенными сконструированными антителами

Связывание HBC34-v40, HBC34-v44, HBC34-v45 и HBC34-v50 с HBsAg из десяти ((A)-(J)) генотипов тестировали с помощью FACS. HBC34-v35 был включен в качестве эталона. Все протестированные варианты связывались с HBsAg, причем HBC34-v40 демонстрировал наиболее сильное связывание (фигуры 17A-17J). Связывание мутантов HBC34-v40, HBC34-v44, HBC34-v45 и HBC34-v50 с десятью мутантами генотипа D HBsAg тестировали с помощью FACS. HBC34-v35 был включен в качестве эталона. Все сконструированные варианты связываются с HBsAg (Фигуры 18A-18K).

Пример 7: Получение некоторых сконструированных антител

Титры антител к HBC34-v35, HBC34-v40, HBC34-v44, HBC34-v45 и HBC34-v50 измеряли для оценки продуктивности в клетках-хозяевах. Антитела экспрессировали в виде рекомбинантного IgG (аллотип G1m17, 1) в линии клеток-хозяев и очищали от надосадочной жидкости. Были оценены системы трансфекции объемом 5 мл и 100 мл, при этом система объемом 100 мл тестировалась в двух или трех повторностях. Титры антител из отдельных тестов в масштабе 5 мл и 100 мл, а также средний титр из тестов в масштабе 100 мл показаны на Фигуре 19.

Пример 8: Термостабильность некоторых сконструированных антител

HBC34-v35, HBC34-v40, HBC34-v44, HBC34-v45 и HBC34-v50 экспрессировали в виде рекомбинантного IgG (аллотип G1m17, 1) в линии клеток-хозяев и очищали от надосадочной жидкости. Антитела концентрировали до 25 мг/мл и инкубировали при 40ºC в течение четырех дней. Анализ эксклюзионной хроматографии использовали для количественного определения высокомолекулярных соединений (HMWS), соответствующих димеру антитела, в день 4, как показано на Фигуре 20. Только HBC34-v35 показал значительную HMWS через 4 дня.

Пример 9: Анализ аминокислот легкой цепи

- Участие в формировании димеров антител

Структурные исследования определили количество аминокислотных остатков в области VL HBC34-v35, которые были вовлечены в формирование димеров антитело:антитело. Взаимодействия между остатками легкой цепи двух молекул антитела

HBC34-v35 (в настоящем документе "молекула антитела 1" и "молекула антитела 2") проиллюстрированы на Фигурах 21A, 22A и 23A, где: E49 (молекула антитела 1) взаимодействует с S64 и K51 (молекула антитела 2); V50 (молекула антитела 1) взаимодействует с V50 (молекула антитела 2); K51 (молекула антитела 1) взаимодействует с E49 (молекула антитела 2); и S64 (молекула антитела 1) взаимодействует с E49 (молекула антитела 2). Взаимодействия между другими аминокислотами легкой цепи двух антител HBC34-v35 показаны на фигурах 21B, 22B и 23B, где: R60 (молекула антитела 1) взаимодействует с D81 и Q78 (молекула антитела 2); F61 (антитело 1) взаимодействует с I74 (молекула антитела 2); I74 (молекула антитела 1) взаимодействует с F61 (молекула антитела 2); Q78 (молекула антитела 1) взаимодействует с R60 (молекула антитела 2); и D81 (молекула антитела 1) взаимодействует с R60 (молекула антитела 2).

Было определено, что четыре сконструированных антитела, HBC34-v40, HBC34-v44, HBC34-v45 и HBC34-v50, имеют низкую склонность к агрегации при сохранении сильного связывания.

HBC34-v40 содержит мутации E49Q, V50D и K51S в L-CDR2 (нумерация CCG) по сравнению с исходным HBC34-v35, как показано на фигуре 21C. Эти мутации изменяются от гидрофобного взаимодействия до электростатического отталкивания и потери солевого моста, хотя потеря одного солевого моста была недостаточной для уменьшения агрегации (по сравнению с HBC34-v41, содержащим мутации E49Q и K51S, но не V50D, и см. Фигуру 16D).

HBC34-v44 содержит мутацию E49A в L-CDR2 по сравнению с HBC34-v35, как показано на фиг. 22C. Эта мутация приводит к потере соляного моста.

HBC34-v45 и HBC34-v50 содержат каркасные мутации в R60 относительно HBC34-v35, как показано на фиг. 23C. Мутации R60N и R60K в HBC34-v45 и HBC34-v50, соответственно, снижали образование димеров. Мутация R60A в HBC34-v46 была менее эффективной в снижении образования димеров (см. фиг. 16D).

ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И НОМЕРА SEQ ID (ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ):

SEQ ID NO	Последовательность	Комментарий
1	X_1 X_2 X_3 TC X_4 X_5 X_6A X_7G где X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6 и X_7 может представлять собой любую аминокислоту	эпитоп

2	X_1 X_2 X_3 TC X_4 X_5 X_6A X_7G где X_1 представляет собой P, T или S, X_2 представляет собой C или S, X_3 представляет собой R, K, D или I, X_4 представляет собой M или T, X_5 представляет собой T, A или I, X_6 представляет собой T, P или L, и X_7 представляет собой Q, H или L.	
3	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFL GGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFL FILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT AQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWAS ARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSL YSILSPFLPLLPIFFCLWVYI	Домен S HBsAg (Номер GenBank J02203)
4	MENVTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNF LGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIF LFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWAS ARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSL YSTLSPFLPLLPIFFCLWVYI	Домен S HBsAg (Номер GenBank FJ899792)
5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	J02203 (D, ayw3)
6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	FJ899792 (D, adw2)
7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSW	AM282986 (A)
8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKP TDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSW	D23678 (B1)
9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKP SDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFSW	AB117758 (C1)
10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMFPSCCCSKP SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	AB205192 (E)
11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCCSK PSDGNCTCIPIPSSWALGKYLWEWASARFSW	X69798 (F4)
12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSW	AF160501 (G)
13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKYLWEWASARFSW	AY090454 (H)
14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASARFSW	AF241409 (I)
15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCTITAQGTSMFPSCCCTKP SDGNCTCIPIPSSWAFAKFLWEWASVRFSW	AB486012 (J)

16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT KPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Y100C/P120T
17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T
18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PLDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T/S143L
19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg C121S
20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122D
21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSMYPSCCCTKP SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122I
22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg T123N
23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129H
24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129L
25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSHYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133H
26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSLYPSCCCTKP SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133L
27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSTYPSCCCTKP SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133T
28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTE PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg K141E
29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK SSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P142S
30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PKDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg S143K
31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSAGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg D144A
32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSDRNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg G145R
33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSDGACTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg N146A
34	GRIFRSFYMS	HBC34 Ab CDRH1 aa (Нумерация CCG)
35	TINQDGSEKLYVDSVKG	HBC34 Ab CDRH2 aa (Нумерация CCG)
36	NINQDGSEKLYVDSVKG	HBC34 Ab CDRH2_2 aa (Нумерация CCG)

37	WSGNSGGMDV	HBC34 Ab CDRH3 aa (Нумерация CCG)
38	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQ APGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSL FLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVS VSS	HBC34 VH_1
39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQA PGKGLEWVANINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVTV SS	HBC34 VH_2
40	SGDKLGNKNVC	HBC34, -v7, -v31, -v32 CDRL1 aa (Нумерация CCG)
41	SGDKLGNKNVA	HBC34-v35 – v50 CDRL1 aa (Нумерация CCG)
42	SGDKLGNKNVS	HBC34-v34 CDRL1 aa (Нумерация CCG)
43	SGDKLGNKNAC	HBC34-v23, -v33 CDRL1 aa (Нумерация CCG)
44	EVKYRPS	HBC34, -v7, -v23, -v31-v33, -v35, -v45, -v46, -v48 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
45	QDSKRPS	HBC34-v36 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
46	EDSKRPS	HBC34-v37 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
47	QVSKRPS	HBC34-v38 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
48	QDDKRPS	HBC34-v39 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
49	QDSYRPS	HBC34-v40 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
50	QVSYRPS	HBC34-v41 CDRL2 aa (Нумерация CCG)

51	EVSYRPS	HBC34-v42, -v47, -v49, -v50 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
52	QVKYRPS	HBC34-v43 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
53	AVKYRPS	HBC34-v44 CDRL2 aa (Нумерация CCG)
54	[резерв]	
55	QTFDSTTVV	HBC34-v7, -v23, -v32, -v33, -v35-v50 CDRL3 aa (Нумерация CCG)
56	QTWDSTTVV	HBC34, -v31 CDRL3 aa (Нумерация CCG)
57	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v35 VL aa
58	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v36 VL aa
59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v37 VL aa
60	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYQVSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v38 VL aa
61	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYQDKKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v39 VL aa
62	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYQDSYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v40 VL aa
63	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYQVSYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v41 VL aa

64	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYEVSYRPSGIPERFSGANSGNTATLTISGTQAMDE AAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v42 VL aa
65	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYQVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDE AAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v43 VL aa
66	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYAVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDE AAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v44 VL aa
67	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYEVKYRPSGIPENFSGSNSGNTATLTISGTQAMDE AAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v45 VL aa
68	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYEVKYRPSGIPEAFSGSNSGNTATLTISGTQAMDE AAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v46 VL aa
69	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYEVSYRPSGIPENFSGANSGNTATLTASGTQAMD EAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v47 VL aa
70	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYEVKYRPSGIPENFSGANSGNTATLTASGTQAMD EAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v48 VL aa
71	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYEVSYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDE AAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v49 VL aa
72	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVAWFQHKPG QSPVLVIYEVKYRPSGIPEKFSGSNSGNTATLTISGTQAMDE AAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL	HBC34-v50 VL aa
73	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	WT hIgG1 Fc
74	ESKYGPPCPPCPAPPVAGP	Последовательность химерного шарнира

75	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQ APGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSL FLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVS VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHY TQKSLSLSPGK	HC of HBC34-v35-50 MLNS-GAALIE (g1M17, 1)
76	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQ APGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSL FLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVS VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHY TQKSLSLSPGK	HC of HBC34-v35-50 MLNS (g1M17, 1)
77	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQ APGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSL FLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVS VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	HBC34-v35-50 HC с мутацией GAALIE в hIgG1 Fc

78	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQ APGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSL FLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVS VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	HBC34-V35-50 HC (дикий тип)
79	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	Константная область легкой цепи антитела HBC
80	GAACTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCA GCCGGGGGGGTCCCAGAGACTGTCCTGTGCAGCCTCTGG ACGCATCTTTAGAAGTTTTTACATGAGCTGGGTCCGCCA GGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACTATAA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATTATATGTGGACTCTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTATTTCTGCAAATGAACAACCTGAGAGTCGAGGA CACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCTTGGAGCGGCAATAG TGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCT CCGTCTCCTCA	HBC34 VH нуклеотидная последовательность
81	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGGGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGTGCAGCTTCTGG AAGAATCTTCAGATCTTTTTACATGAGTTGGGTGAGACA GGCTCCTGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCGCAAACATCA ATCAGGACGGATCAGAAAAGCTGTATGTGGATAGCGTC AAAGGCAGGTTCACTATTTCCCGCGACAACGCCAAAAA TTCTCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGGGTGGAGGA TACCGCTGTCTACTATTGTGCAGCCTGGTCTGGCAACAG TGGAGGCATGGACGTGTGGGGACAGGGAACCACAGTGA CAGTCAGCTCC	HBC34-v35-v50 VH (нуклеотидная последовательность)

82	GAACTGCAGCTGGTCGAATCAGGAGGAGGGTGGGTCCA GCCCGGAGGGAGCCAGAGACTGTCTTGTGCCGCATCAG GGAGGATCTTCAGGAGCTTCTACATGTCCTGGGTGCGCC AGGCACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCCACCATC AACCAGGACGGATCTGAAAAGCTGTATGTGGATAGTGT CAAAGGCCGGTTCACAATTAGCAGAGACAACGCTAAAA ATTCTCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGAGTGGAGG ATACCGCCGTCTACTATTGCGCCGCTTGGTCTGGCAACA GCGGCGGGATGGATGTCTGGGGGCAGGGCACAACAGTG AGCGTCTCTTCC	HBC34 дикий тип VH кодон-оптимизированный
83	GCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTTCCACTGGCTCCC TCTTCCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGA TGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTG TCTTGGAACTCCGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCATACA TTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTGGCCTGTACTCTCTGT CCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCTTCCAGCCTGGGCACCC AGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGCAAT ACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCTTGTGA TAAGACCCATACATGCCCTCCATGTCCAGCTCCAGAGCT GCTGGGCGGCCCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCC TAAGGATACCCTGATGATCTCCAGAACCCCCGAGGTGAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCCTGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTC TACCTATCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGT CTAATAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCT CCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCACAGGTGTAC ACACTGCCTCCATCTCGCGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTTCC GACATCGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGA GAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACAGCG ATGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACA AGTCTCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTTCTG TGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTATACACAGAAGT CCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAG	HBC34-V35-50 CH1-шарнир-CH2-CH3 (кодон-оптимизированный)

84	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGCGGCTGGGTGCA GCCTGGCGGCTCCCAGAGGCTGAGCTGTGCCGCTTCTGG CAGGATCTTCCGGTCCTTTTACATGTCTTGGGTGCGGCA GGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTACCATCA ACCAGGACGGCTCCGAGAAGCTGTATGTGGATAGCGTG AAGGGCAGATTCACAATCTCTCGCGACAACGCCAAGAA CTCCCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGAGGGTGGAGGA TACCGCCGTGTACTATTGCGCCGCTTGGTCTGGCAATAG CGGCGGCATGGACGTGTGGGGACAGGGCACCACCGTGT CCGTGTCCAGCGCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTTC CACTGGCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAG CCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGC CCGTGACCGTGTCTTGGAACTCCGGCGCCCTGACCAGCG GAGTGCATACATTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTGGCC TGTACTCTCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCTTCCA GCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACA AGCCAAGCAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCC AAGTCTTGTGATAAGACCCATACATGCCCTCCATGTCCA GCTCCAGAGCTGCTGGGCGGCCCAAGCGTGTTCCTGTTT CCACCCAAGCCTAAGGATACCCTGATGATCTCCAGAACC CCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA GGATCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAG CAGTACAACTCTACCTATCGGGTGGTGTCCGTGCTGACA GTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAA GTGCAAGGTGTCTAATAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGA GAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGC CACAGGTGTACACACTGCCTCCATCTCGCGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGCT TCTATCCTTCCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATG GCCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTG CTGGACAGCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCTCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTT AGCTGTTCTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTAT ACACAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGTGATGA GGTACCGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGG CTCTCGCGGTCGTACGAGGAAAGCTT	HBC34-v35-50 VH-CH1-шарнир-CH2-CH3 (кодон-оптимизированный)
85	AGCTGACACAGCCCCCTTCCGTGTCCGTGTCCCCTGGAC AGACCGTGTCCATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGC AACAAGAACGTGGCCTGGTTTCAGCATAAGCCTGGCCA GTCCCCCGTGCTGGTCATCTACCAGGACTCCAAGAGGCC CAGCGGCATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAACAGCGG CAATACAGCCACCCTGACAATCTCTGGCACACAGGCTAT GGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCAC CACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAGACTGACAGTGC TGGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTG	HBC34-v36 VL нуклеотидная последовательность

86	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGATTCTA AGAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTGA CCGTGCTG	HBC34-v37 VL нуклеотидная последовательность
87	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACCAGGTGTCTA AGAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTGA CCGTGCTG	HBC34-v38 VL нуклеотидная последовательность
88	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACCAGGATAAGA AGAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTGA CCGTGCTG	HBC34-v39 VL нуклеотидная последовательность
89	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACCAGGATTCTT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTGA CCGTGCTG	HBC34-v40 VL нуклеотидная последовательность

90	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACCAGGTGTCTT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTGA CCGTGCTG	HBC34-v41 VL нуклеотидная последовательность
91	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGTCTT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTAGCGGCGCCA ACTCTGGCAATACCGCTACACTGACCATCTCCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATAGCACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTG ACCGTGCTG	HBC34-v42 VL нуклеотидная последовательность
92	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACCAGGTGAAGT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTGA CCGTGCTG	HBC34-v43 VL нуклеотидная последовательность
93	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGCTGTGAAGT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTGA CCGTGCTG	HBC34-v44 VL нуклеотидная последовательность
94	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAGT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGAACTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGAGGAGGAACAAGGCTG ACCGTGCTG	HBC34-v45 VL нуклеотидная последовательность

95	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAGT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGGCTTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGAGGAGGAACAAGGCTG ACCGTGCTG	HBC34-v46 VL нуклеотидная последовательность
96	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGTCTT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGCGGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACAAGGCTGA CCGTGCTG	HBC34-v49 VL нуклеотидная последовательность
97	TCCTACGAGCTGACACAGCCACCTTCCGTGAGCGTGTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCAGCGGCGACAA GCTGGGCAACAAGAATGTGGCCTGGTTCCAGCACAAGC CAGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAGT ATAGGCCTTCCGGCATCCCAGAGAAGTTTTCCGGCAGCA ACTCTGGCAATACCGCCACACTGACCATCAGCGGCACAC AGGCTATGGACGAGGCCGCTTATTTCTGTCAGACCTTTG ATTCTACCACAGTGGTGTTCGGAGGAGGAACAAGGCTG ACCGTGCTG	HBC34-v50 VL нуклеотидная последовательность
98	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTTCCA CCCTCTTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTG GTGTGCCTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCTGTGACA GTGGCTTGGAAGGCTGATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGC GTGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAA GTACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGACACCAGAGCA GTGGAAGTCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGACCCA TGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCACCG AGTGTTCT	HBC34-V35-50 CL (кодон-оптимизированный)_1

99	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTTCCA CCCTCTTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTG GTGTGCCTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCTGTGACA GTGGCTTGGAAGGCTGATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGC GTGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAA GTACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGACACCAGAGCA GTGGAAGTCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGACCCA TGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCACCG AGTGTTCT	HBC34-V35-50 CL (кодон-оптимизированный)_2
100	XGSSTTSTGPCRTCMTXPSDGNATAIPIPSSWX где остатки, обозначенные как X, были заменены цистеином	Пептид
101	TSTGPCRTCMTTAQG	Пептид
102	GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT	Пептид
103	XSMYPSASATKPSDGNXTGPCRTCMTTAQGTSX где остатки, обозначенные как X, были заменены цистеином	Пептид
104	PCRTCMTTAQG	аминокислоты 120-130 домена S HBsAg (HBV-D J02203
105	$PCX_1TCX_2X_3X_4AQG$, 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
106	GGSGG	Линкер
107	TGPCRTC	Эпитоп
108	GNCTCIP	Эпитоп
109	CCIPIPSSWAFGCSTTSTGPCRTCC где в частности, цистеины в положениях 2, 21, и 24 связаны с ацетамидометилом.	имитатор прерывистого эпитопа
110	CGNCTCIPIPSSWAFCSTTSTGPCRTCC где в частности, цистеины в положениях 4, 6, 24, и 27 связаны с ацетамидометилом.	имитатор прерывистого эпитопа
111	CGGGCSTTSTGPCRTCC где в частности, цистеины в положениях 13 и 16 связаны с ацетамидометилом.	имитатор петлевого эпитопа
112	STTSTGPCRTC	эпитоп
113	GNCTCIPIPSSWAFC	эпитоп

114	GNCTCIPIPSSWAF	эпитоп
115	PCRXC	эпитоп
116	aattccacaa ccttccacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttccct gctggtggct ccagttcagg aacagtaaac cctgttctga ctactgcctc tcccttatcg tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc ctaggacccc ttctcgtgtt acaggcgggg tttttcttgt tgacaagaat cctcacaata ccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctcaattttc taggggggaac taccgtgtgt cttggccaaa attcgcagtc cccaacctcc aatcactcac caacctcttg tcctccaact tgtcctggtt atcgctggat gtgtctgcgg cgttttatca tcttcctctt catcctgctg ctatgcctca tcttcttgtt ggttcttctg gactatcaag gtatgttgcc cgtttgtcct ctaattccag gatcctcaac aaccagcacg ggaccatgcc ggacctgcat gactactgct caaggaacct ctatgtatcc ctcctgttgc tgtaccaaac cttcggacgg aaattgcacc tgtattccca tcccatcatc ctgggctttc ggaaaattcc tatgggagtg ggcctcagcc cgtttctcct ggctcagttt actagtgcca tttgttcagt ggttcgtagg gctttccccc actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggtattggg ggccaagtct gtacagcatc ttgagtccct ttttaccgct gttaccaatt ttcttttgtc tttgggtata catttaaacc ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc taaattttat gggttatgtc attggatgtt atgggtcctt gccacaagaa cacatcatac aaaaaatcaa agaatgtttt agaaaacttc ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtctt ttgggttttg ctgccccttt tacacaatgt ggttatcctg cgttgatgcc tttgtatgca tgtattcaat ctaagcaggc tttcactttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa caatacctga acctttaccc cgttgcccgg caacggccag gtctgtgcca agtgtttgct gacgcaaccc ccactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgcatgcg tggaaccttt tcggctcctc tgccgatcca tactgcggaa ctcctagccg cttgttttgc tcgcagcagg tctggagcaa acattatcgg gactgataac tctgttgtcc tatcccgcaa atatacatcg tttccatggc tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgtc ctttgtttac gtcccgtcgg cgctgaatcc tgcggacgac ccttctcggg gtcgcttggg actctctcgt ccccttctcc gtctgccgtt ccgaccgacc acggggcgca cctctcttta cgcggactcc ccgtctgtgc cttctcatct gccggaccgt gtgcacttcg cttcacctct gcacgtcgca tggagaccac cgtgaacgcc caccaaatat tgcccaaggt cttacataag aggactcttg gactctcagc aatgtcaacg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaaag actgggagga gttgggggag gagattaggt taaaggtctt tgtactagga ggctgtaggc ataaattggt ctgcgcacca gcaccatgca actttttcac ctctgcctaa tcatctcttg ttcatgtcct actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggctttggg gcatggacat cgacccttat aaagaatttg gagctactgt ggagttactc tcgtttttgc cttctgactt ctttccttca gtacgagatc ttctagatac cgcctcagct ctgtatcggg aagccttaga gtctcctgag cattgttcac ctcaccatac tgcactcagg caagcaattc tttgctgggg ggaactaatg actctagcta cctgggtggg tgttaatttg gaagatccag cgtctagaga cctagtagtc agttatgtca acactaatat gggcctaaag ttcaggcaac tcttgtggtt tcacatttct tgtctcactt ttggaagaga aacagttata gagtatttgg tgtctttcgg agtgtggatt cgcactcctc cagcttatag accaccaaat gcccctatcc tatcaacact tccggagact actgttgtta gacgacgagg caggtcccct agaagaagaa ctccctcgcc tcgcagacga aggtctcaat cgccgcgtcg cagaagatct caatctcggg aatctcaatg ttagtattcc ttggactcat aaggtgggga actttactgg gctttattct tctactgtac ctgtctttaa tcctcattgg aaaacaccat cttttcctaa tatacattta caccaagaca ttatcaaaaa atgtgaacag tttgtaggcc cactcacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat gcctgccagg ttttatccaa aggttaccaa atatttacca ttggataagg gtattaaacc ttattatcca gaacatctag ttaatcatta cttccaaact agacactatt tacacactct	NC_003977.2

	atggaaggcg ggtatattat ataagagaga aacaacacat agcgcctcat tttgtgggtc accatattct tgggaacaag atctacagca tggggcagaa tctttccacc agcaatcctc tgggattctt tcccgaccac cagttggatc cagccttcag agcaaacacc gcaaatccag attgggactt caatcccaac aaggacacct ggccagacgc caacaaggta ggagctggag cattcgggct gggtttcacc ccaccgcacg gaggcctttt ggggtggagc cctcaggctc agggcatact acaaactttg ccagcaaatc cgcctcctgc ctccaccaat cgccagtcag gaaggcagcc taccccgctg tctccacctt tgagaaacac tcatcctcag gccatgcagt gg	
117	GTGTGCACTTCGCTTCAC	1579-1597 NC_003977.2
118	GUGUGCACUUCGCUUCACA	HBV001 смысловая
119	UGUGAAGCGAAGUGCACACUU	HBV001 антисмысловая
120	GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA	HBV003 смысловая
121	UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	HBV003 антисмысловая
122	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	HBV002v2 смысловая
123	usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu	HBV002v2 антисмысловая
124	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	HBV002v1 смысловая
125	usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu	HBV002v1 антисмысловая
126	gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuaL96	No. 126 смысловая
127	usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc	No. 127 антисмысловая
128	AAVALLPAVLLALLAP	RFGF
129	AALLPVLLAAP	Аналог RFGF
130	GRKKRRQRRRPPQ	Белок Tat ВИЧ
131	RQIKIWFQNRRMKWK	Белок Drosophila Antennapedia

132	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn	Искусственная последовательность каркасной области CDR
133	Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala	Искусственная последовательность каркасной области CDR
134	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34
135	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность GL L2
136	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность v36 + Q49E
137	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность v36 + D50V
138	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность v36 + S51K

139	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Ser Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys 35 40 45	Искусственная последовательность v36 + K52Y
140	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Val Ser Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность v36 + D50V + K52Y
141	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ala Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 +K51S + S64A
142	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 +E49Q
143	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Ala Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 +E49A
144	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Asn Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 +R60N
145	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 +R60A

146	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Asn Phe Ser Gly Ala Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ala Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 +K51S + S64A + R60N + I74A
147	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Asn Phe Ser Gly Ala Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ala Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 +R60N + S64A + I74A
148	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 +K51S
149	Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Lys Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys	Искусственная последовательность HBC34 + R60K
150	GRIFRSFY	CDRH1 (IMGT)
151	QDGSEK	CDRH2 – короткая (IMGT)
152	INQDGSEK	CDRH2 - длинная (IMGT)
153	AAWSGNSGGMDV	CDRH3 (IMGT)
154	KLGNKN	CDRL1 (IMGT)
155	EVK	HBC34-v35, -v45, -v46, -v48, -v50 CDRL2 - короткая (IMGT)
156	QDS	HBC34-v36, -v40 CDRL2 - короткая (IMGT)
157	EDS	HBC34-v37 CDRL2 - короткая (IMGT)

158	QVS	HBC34-v38, -v41, CDRL2 - короткая (IMGT)
159	QDK	HBC34-v39 CDRL2 - короткая (IMGT)
160	EVS	HBC34-v42, -v47, -v49, -v50 CDRL2 - короткая (IMGT)
161	QVK	HBC34-v43 CDRL2 - короткая (IMGT)
162	AVK	HBC34-v44 CDRL2 - короткая (IMGT)

158	QVS	HBC34-v38, -v41, CDRL2 - короткая (IMGT)
159	QDK	HBC34-v39 CDRL2 - короткая (IMGT)
160	EVS	HBC34-v42, -v47, -v49, -v50 CDRL2 - короткая (IMGT)
161	QVK	HBC34-v43 CDRL2 - короткая (IMGT)
162	AVK	HBC34-v44 CDRL2 - короткая (IMGT)

| 163 | VIY**EVKY**RPS | HBC34-v35, -v45, -v46, -v48, -v50 CDRL2 – длинная (IMGT) |

164	VIY**QDSK**RPS	HBC34-v36 CDRL2 – длинная (IMGT)
165	VIY**EDSK**RPS	HBC34-v37 CDRL2 – длинная (IMGT)
166	VIY**QVSK**RPS	HBC34-v38 CDRL2 – длинная (IMGT)
167	VIY**QDKK**RPS	HBC34-v39 CDRL2 – длинная (IMGT)
168	VIY**QDSY**RPS	HBC34-v40 CDRL2 – длинная (IMGT)
169	VIY**QVSY**RPS	HBC34-v41 CDRL2 – длинная (IMGT)
170	VIY**EVSY**RPS	HBC34-v42, -v47, -v49 CDRL2 – длинная (IMGT)
171	VIY**QVKY**RPS	HBC34-v43 CDRL2 – длинная (IMGT)
172	VIY**AVKY**RPS	HBC34-v44 CDRL2 – длинная (IMGT)
173	QTFDSTTVV	HBC34-v35-v50 CDRL3 (IMGT)

Различные варианты осуществления, описанные в настоящем документе, можно комбинировать, получая дополнительные варианты осуществления. Все патенты США, публикации патентных заявок США, заявки на патент США, иностранные патенты, заявки на иностранные патенты и непатентные публикации, упомянутые в этом описании и/или указанные в информационным листке заявки, включены сюда путем ссылки во всей их полноте. Аспекты вариантов осуществления могут быть модифицированы, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения еще нескольких дополниительных вариантов осуществления.

Предварительная заявка США 63/043692, поданная 24 июня 2020 года, включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В настоящий вариант осуществления можно вносить указанные и другие изменения в свете вышеприведенного подробного описания. В целом, термины, используемые в следующей формуле изобретения, не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничена описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:41, 40, 42 и 43, аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO:49, 44-48 и 50-53 и аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:55 или 56,

где, необязательно, VL содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию, относительно SEQ ID NO:58, и где аминокислотная нумерация мутации(мутаций) по типу замены соответствует SEQ ID NO:58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит какой-либо дополнительной мутации (мутаций) относительно SEQ ID NO:58, и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной областью петли HBsAg и, необязательно, нейтрализовать инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J или любой их комбинации.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее:

(i) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, соответственно, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:41, 49 и 55, соответственно;

(ii) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 46 и 55, соответственно;

(iii) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, соответственно, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 47 и 55, соответственно;

(iv) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, соответственно, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:41, 48 и 55, соответственно;

(v) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, соответственно, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:41, 45 и 55, соответственно;

(vi) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, соответственно, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:41, 50 и 55, соответственно;

(vii) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, соответственно, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:41, 51 и 55, соответственно;

(viii) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, соответственно, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:41, 52 и 55, соответственно; или

(ix) в VH аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:34, 35 и 37, соответственно, и в VL аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO:41, 53 и 55, соответственно.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность CDRH1 согласно SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность CDRH2 согласно SEQ ID NO:35 или 36 и аминокислотную последовательность CDRH3 согласно SEQ ID NO:37; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность CDRL1 согласно любой из SEQ ID NO:40-43, аминокислотную последовательность CDRL2 согласно любой из SEQ ID NO:49, 44-48 и 50-53 и аминокислотную последовательность CDRL3 согласно SEQ ID NO:55 или 56,

где CDR определены в соответствии с системой нумерации CCG, и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной областью петли HBsAg и, необязательно, нейтрализовать инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J или любой их комбинации, при условии, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не содержит аминокислотных последовательностей CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 согласно SEQ ID NO:34, 35, 37, 41, 44 и 45, соответственно.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответствуют SEQ ID NO:

(i) 34, 35, 37, 41, 49 и 55, соответственно;

(ii) 34, 35, 37, 41, 46 и 55, соответственно;

(iii) 34, 35, 37, 41, 47 и 55, соответственно;

(iv) 34, 35, 37, 41, 48 и 55, соответственно;

(v) 34, 35, 37, 41, 45 и 55, соответственно;

(vi) 34, 35, 37, 41, 50 и 55, соответственно;

(vii) 34, 35, 37, 41, 51 и 55, соответственно;

(viii) 34, 35, 37, 41, 52 и 55, соответственно;

(ix) 34, 35, 37, 41, 53 и 55, соответственно; или

(x) 34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH и VL содержат CDRH1, CDRH2, CDRH3 и CDRL1, CDRL2, CDRL3, соответственно, согласно: HBC34-v40; HBC34-v36; HBC34-v37; HBC34-v38; HBC34-v39; HBC34-v41; HBC34-v42; HBC34-v43; HBC34-v44; HBC34-v45; HBC34-v46; HBC34-v47; HBC34-v48; HBC34-v49; или HBC34-v50,

где CDR определены в соответствии с нумерацией IMGT, необязательно, где VL дополнительно содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию относительно SEQ ID NO:58, и где аминокислотная нумерация мутации (мутаций) по типу замены соответствует SEQ ID NO:58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит какой-либо дополнительной мутации (мутаций) относительно SEQ ID NO:58.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH и VL содержат CDRH1, CDRH2, CDRH3 и CDRL1, CDRL2, CDRL3, соответственно, согласно: HBC34-v40; HBC34-v36; HBC34-v37; HBC34-v38; HBC34-v39; HBC34-v41; HBC34-v42; HBC34-v43; HBC34-v44; HBC34-v45; HBC34-v46; HBC34-v47; HBC34-v48; HBC34-v49; или HBC34-v50,

где CDR определены в соответствии с нумерацией CCG, необязательно, где VL дополнительно содержит мутацию по типу замены R60N, мутацию по типу замены R60A, мутацию по типу замены R60K, мутацию по типу замены S64A, мутацию по типу замены I74A или любую их комбинацию относительно SEQ ID NO:58, и где аминокислотная нумерация мутации (мутаций) по типу замены соответствует SEQ ID NO:58, и, кроме того, необязательно, где VL не содержит какой-либо другой мутации (мутаций) относительно SEQ ID NO:58.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, где:

(i) VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:38 или 39; и/или

(ii) VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61, 63-66, 69, 71 и 72.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, где:

(i) VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или любым нецелым значением между ними) идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или 39; и/или

(ii) VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или любое нецелое значение между ними) идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61, 63-66, 69, 71 и 72.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, где VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, по меньшей мере на 90% (т.е. 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или любое нецелое значение между ними) идентичных аминокислотным последовательностям, показанным в SEQ ID NO: (i) 38 и 62, соответственно; (ii) 38 и 59, соответственно; (iii) 38 и 60, соответственно; (iv) 38 и 61, соответственно; (v) 38 и 58, соответственно; (vi) 38 и 63, соответственно; (vii) 38 и 64, соответственно; (viii) 38 и 65, соответственно; (ix) 38 и 66, соответственно; (x) 38 и 71, соответственно; или (xi) 38 и 72, соответственно.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:38 или 39, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит вариант любой из SEQ ID NO:62, 57-61 и 63-72, где вариант содержит любую одну или более из следующих мутаций: R60A; R60N; R60K; S64A; и I74A, и где, необязательно, вариант VL не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с SEQ ID NO:62, 57-61 и 63-72, соответственно.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:38 или 39, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит вариант любой из SEQ ID NO:62, 57-61 и 63-72, где

вариант содержит мутацию по типу замены (такую как, например, консервативная замена аминокислоты или мутация в аминокислоту, кодируемую зародышевой линией) в Q78, D81 или в обоих случаях, и где, необязательно, вариант VL не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с SEQ ID NO:62, 57-61 и 63-72, соответственно.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, где: VH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38 или 39; и/или VL содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62, 58-61, 63-66, 69, 71 или 72.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9 и 12, где VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:

(i) 38 и 62, соответственно;

(ii) 38 и 59, соответственно;

(iii) 38 и 60, соответственно;

(iv) 38 и 61, соответственно;

(v) 38 и 58, соответственно;

(vi) 38 и 63, соответственно;

(vii) 38 и 64, соответственно;

(viii) 38 и 65, соответственно;

(ix) 38 и 66, соответственно;

(x) 38 и 71, соответственно; или

(xi) 38 и 72, соответственно.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:

(i) 38 и 62, соответственно;

(ii) 38 и 66, соответственно;

(iii) 38 и 67, соответственно;

(iv) 38 и 68, соответственно; или

(v) 38 и 72, соответственно,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с антигенной областью петли HBsAg и нейтрализовать инфекцию вируса гепатита B (HBV) генотипа D, A, B, C, E, F, G, H, I или J или любой их комбинации.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, которые способны нейтрализовать инфекцию вируса гепатита D (HDV).

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-15, где в образце, содержащем множество антител или антигенсвязывающих фрагментов, менее 12%, 11% или менее, 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее или 2% или менее из множества присутствует в виде димера, когда образец инкубировали в течение от около 120 до около 168 часов при около 40ºC, где, необязательно, присутствие димера определяется абсолютной эксклюзионной хроматографией.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-16, при этом инкубация множества антител или антигенсвязывающих фрагментов приводит к уменьшению образования димера по сравнению с инкубацией множества эталонных антител или антигенсвязывающих фрагментов,

где эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO:38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO:57,

и где, необязательно, присутствие димера антитела определяют с помощью абсолютной эксклюзионной хроматографии.

18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, которые образуют меньшее количество димера и/или образуют димеры с пониженной частотой и/или в виде более низкого процента от общего количества молекул антитела или антигенсвязывающего фрагмента в образце или композиции по сравнению с эталонным антителом:

(i) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 4°C;

(ii) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 25°C; и/или

(iii) при 5-дневной, 15-дневной и/или 32-дневной инкубации при 40°C,

где эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO:38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO:57.

19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18, где процентное содержание антитела или антигенсвязывающего фрагмента в композиции, присутствующего в виде димера, составляет менее 4/5, менее 3/4, менее 1/2, менее 1/3, менее 1/4, менее 1/5, менее 1/6, менее 1/7, менее 1/8, менее 1/9 или менее 1/10 процентного содержания эталонных молекул антитела в композиции, присутствующего в виде димера, соответственно.

20. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, где клетка-хозяин, трансфицированная полинуклеотидом, кодирующим антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обеспечивает 1,5x или более, 2x или более, 3x или более, или 4x или более количества аминокислотных последовательностей антитела или антигенсвязывающего фрагмента, соответственно, чем эталонная клетка-хозяин, трансфицированная полинуклеотидом, кодирующим эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, причем эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, изложенными в SEQ ID NO:34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO:38 и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO:57.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-20, которые продуцируются в трансфицированных клетках с более высоким титром по сравнению с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые продуцируются в эталонных трансфицированных клетках, где эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержат аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO:38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO:57.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-21, которые продуцируются в трансфицированных клетках при титрах по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза или по меньшей мере в 4 раза выше титра, при котором получают эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в

SEQ ID NO:34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержат аминокислотную последовательность VH, представленную в SEQ ID NO:38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO:57.

23. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-22, которые способны связываться с HBsAg (ADW) со значением EC50 (нг/мл) около 3,2 или менее, менее 3,0, менее 2,5, менее 2,0, менее 1,5 или менее 1,0.

24. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23, которые способны связываться с HBsAg (например, подтипа adw) с EC50 (нг/мл) менее 3,5, менее 3,4, менее 3,3, менее 3,2, менее 3,1, менее 3,0, менее 2,9, менее 2,8, менее 2,7, менее 2,6, менее 2,5, менее 2,4, менее 2,3, менее 2,1, менее 2,0, менее 1,9, менее 1,8, менее 1,7, менее 1,6, менее 1,5, менее 1,4, менее 1,3, менее 1,2, менее 1,1 или менее 1,0.

25. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-24, которые способны связываться с HBsAg (например, подтипа ADW) с EC50 (нг/мл) от 0,9 до 2,0, или от 0,9 до 1,9, или от 0,9 до 1,8, или от 0,9 до 1,7, или от 0,9 до 1,6, или от 0,9 до 1,5, или от 0,9 до 1,4, или от 0,9 до 1,3, или от 0,9 до 1,2, или от 0,9 до 1,1, или от 0,9 до 1,0, или от 1,0 до 2,0.

26. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-25, которые способны связываться с HBsAg (adw) со значением EC50 (нг/мл) 2,0 или менее.

27. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-26, которые имеющий EC50 нейтрализации инфекции вирусом гепатита B менее 20 нг/мл, предпочтительно 15 нг/мл или менее, более предпочтительно 10 нг/мл или менее.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, которые способны нейтрализовать вирусную инфекцию гепатита B с EC50 нейтрализации инфекции 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 нг/мл.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-28, которые способны нейтрализовать вирус гепатита B с EC50 нейтрализации инфекции, которая ниже, чем EC50 нейтрализации инфекции эталонного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в соответствии с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:34, 35, 37, 41, 44 и 55, соответственно, и необязательно содержат аминокислотную последовательность VH, изложенную в SEQ ID NO:38, и аминокислотную последовательность VL, представленную в SEQ ID NO:57.

30. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает человеческое антитело,

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

31. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-30, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

32. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-31, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

33. Антитело по любому из пп. 1-32 или его антигенсвязывающий фрагмент,которые содержат Fc-фрагмент.

34. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 33, где Fc-фрагмент содержит мутацию, усиливающую связывание с FcRn по сравнению с эталонным Fc-фрагментом, который не содержит мутацию.

35. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 33 или 34, где Fc-фрагмент содержит мутацию, усиливающую связывание с FcγR, предпочтительно FcγRIIA и/или FcγRIIIA, по сравнению с эталонным Fc-фрагментом, который не содержит мутацию.

36. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 33-35, где Fc-фрагмент представляет собой изотип IgG, такой как IgG1, или получен из изотипа IgG, такого как IgG1.

37. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 33-36, которые содержат или являются производными от Ig G1m17, 1 (IgHG1*01).

38. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 34-37, 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),

где аминокислотная нумерация Fc-фрагмента соответствует системе нумерации EU.

39. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 38, где мутация, усиливающая связывание с FcRn, включает M428L/N434S.

40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-39, где мутация, усиливающая связывание с FcγR, содержит S239D; I332E; A330L; G236A; или любую их комбинацию, причем нумерация аминокислот фрагмента Fc соответствует системе нумерации EU.

41. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 40, где мутация, усиливающая связывание с FcγR, содержит:

(i) S239D/I332E;

(ii) S239D/A330L/I332E;

(iii) G236A/S239D/I332E; или

(iv) G236A/A330L/I332E.

42. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 40 или 41, где мутация, усиливающая связывание с FcγR, содержит или состоит из G236A/A330L/I332E, и необязательно при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент не содержит S239D, и при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кроме того, необязательно содержит нативный S в положении 239.

43. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 33-42, где Fc-фрагмент содержит мутации по типу аминокислотной замены: M428L; N434S; G236A; A330L; и I332E, и необязательно не содержит S239D.

44. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-43, содержащие константную область легкой цепи (CL), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:79.

45. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-44, содержащие CH1-CH2-CH3, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:73, или ее варианта, который содержит одну или более из следующих аминокислотных замен (нумерация EC): G236A; A330L; I332E; M428L; N434S.

46. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 45, где в CH1-CH2-CH3 удален C-концевой лизин.

47. Антитело, содержащее: тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:75, необязательно с

удаленным С-концевым лизином; и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO:62, 58-61 и 63-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO:79.

48. Антитело по п. 47, где LC содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из SEQ ID NO:62, 66, 67 и 72.

49. Антитело, содержащее тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:76, необязательно с удаленным С-концевым лизином, и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO:62, 58-61 и 63-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO:79.

50. Антитело по п. 49, где LC содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из SEQ ID NO:62, 66, 67 и 72.

51. Антитело, содержащее тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:77, необязательно с удаленным С-концевым лизином; и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO:62, 58-61 и 63-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO:79.

52. Антитело по п. 51, где LC содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из SEQ ID NO:62, 66, 67 и 72.

53. Антитело, содержащее: тяжелую цепь (HC), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:78, необязательно с удаленным С-концевым лизином; и легкую цепь (LC), где LC содержит или состоит из (i) аминокислотной последовательности VL, представленной в любой из SEQ ID NO:62, 58-61 и 63-72, и (ii) аминокислотной последовательности CL, представленной в SEQ ID NO:79.

54. Антитело по п. 53, где LC содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из SEQ ID NO:62, 66, 67 и 72.

55. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-54, которые способны связывать HBsAg генотипа, выбранного из генотипов HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I и J, или любую их комбинацию.

56. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-55, которые способны снижать концентрацию ДНК HBV в сыворотке у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

57. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-56, которые способны снижать концентрацию HBsAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

58. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-57, которые способны снижать концентрацию HBeAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

59. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-58, которые способны снижать концентрацию HBcrAg в сыворотке у млекопитающего, имеющего инфекцию HBV.

60. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59.

61. Полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи (VL) и, необязательно, константный домен легкой цепи (CL) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59.

62. Полинуклеотид по п. 60 или 61, где нуклеотидная последовательность, кодирующая указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке-хозяине.

63. Полинуклеотид по п. 62, содержащий нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную нуклеотидной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 89, 85-88 и 90-99.

64. Полинуклеотид по любому из пп. 60-63, содержащий (i) полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:82, и (ii) полинуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:89, 85-88 и 90-99.

65. Полинуклеотид по любому из пп. 60-63, содержащий (i) полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:83, и (ii) полинуклеотидную последовательность, представленную в любой одной или более SEQ ID NO:89, 85-88 и 90-99.

66. Полинуклеотид по любому из пп. 60-63, содержащий (i) полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:84, и (ii) полинуклеотидную последовательность, представленную в любой одной или более из SEQ ID NO:89, 85-88 и 90-99.

67. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 60-66.

68. Вектор по п. 67, который включает лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.

69. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 60-66 и/или вектор по п. 67 или 68.

70. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59;

(ii) полинуклеотид по любому из пп. 60-66;

(iii) вектор по п. 67 или 68;

(iv) клетку-хозяина по п. 69; или

(v) любую комбинацию (i)-(iv),

и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

71. Набор, содержащий:

(a) компонент, выбранный из:

(i) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59;

(ii) полинуклеотида по любому из пп. 60-66;

(iii) вектора по п. 67 или 68;

(iv) клетки-хозяина по п. 69;

(v) фармацевтической композиции по п. 70; или

(vi) любой комбинации (i)-(vi); и

(b) (1) инструкции по применению компонента для предотвращения, лечения, ослабления и/или диагностики инфекции гепатита B и/или инфекции гепатита D и/или (2) средства для введения компонента субъекту, такого как шприц.

72. Композиция по п. 70 или набор по п. 71, дополнительно содержащие:

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

(ii) интерферон, который необязательно включает IFNбета и/или IFNальфа;

(iii) ингибитор контрольной точки, который необязательно включает антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент и/или антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент;

(iv) агонист молекулы, стимулирующей иммунную контрольную точку; или

(v) любую комбинацию (i)-(iv).

73. Композиция или набор по п. 72, отличающиеся тем, что ингибитор полимеразы содержит ламивудин.

74. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 69 в условиях и в течение времени, достаточных для получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

75. Применение (i) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59; (ii) полинуклеотида по любому из пп. 60-66; (iii) вектора по п. 67 или 68; (iv) клетки-хозяина по п. 69; и/или (v) фармацевтической композиции по п. 70, 72 или 73 при изготовлении лекарственного средства для профилактики, лечения, ослабления и/или диагностики инфекции гепатита B и/или инфекции гепатита D у субъекта.

76. Способ лечения, профилактики и/или ослабления инфекции гепатита B и/или гепатита D у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества: (i) антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59; (ii) полинуклеотида по любому из пп. 60-66; (iii) вектора по п. 67 или 68; (iv) клетки-хозяина по п. 69; и/или (v) фармацевтической композиции по п. 70, 72 или 73.

77. Способ по п. 76, дополнительно включающий введение субъекту одного или более из: (vi) ингибитора полимеразы, который необязательно содержит ламивудин, адефовир, энтекавир, телбивудин, тенофовир или любую их комбинацию; (vii) интерферона, который необязательно содержит IFNbeta и/или IFNalpha; (viii) ингибитора контрольной точки, который необязательно содержит антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или антитело к CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент; (ix) агониста молекулы, стимулирующей иммунную контрольную точку; или (x) любой комбинации (vi)-(ix).

78. Способ по п. 76 или 77, отличающийся тем, что инфекция гепатита B представляет собой хроническую инфекцию гепатита B.

79. Способ по любому из пп. 76-78, отличающийся тем, что субъект получил трансплантат печени.

80. Способ по любому из пп. 76-79, отличающийся тем, что субъект не иммунизирован против гепатита B.

81. Способ по любому из пп. 76-80, отличающийся тем, что субъект является новорожденным.

82. Способ по любому из пп. 76-81, отличающийся тем, что субъект подвергается или подвергался гемодиализу.

83. Способ по любому из пп. 76-82, который включает введение субъекту однократной дозы указанной фармацевтической композиции, содержащей указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

84. Способ по п. 83, где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в диапазоне от 2 до 18 мг/кг (масса тела субъекта).

85. Способ по п. 83 или 84, где однократная доза фармацевтической композиции содержит вплоть до 6 мг, вплоть до 10 мг, вплоть до 15 мг, вплоть до 18 мг, вплоть до 25 мг, вплоть до 30 мг, вплоть до 35 мг, вплоть до 40 мг, вплоть до 45 мг, вплоть до 50 мг, вплоть до 55 мг, вплоть до 60 мг, вплоть до 75 мг, вплоть до 90 мг, вплоть до 300 мг, вплоть до 900 мг или вплоть до 3000 мг антитела,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 5 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 10 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 25 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 30 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 50 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 60 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 75 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 90 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 100 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 150 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 200 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 300 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 500 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 750 мг до 3000 мг, или в диапазоне от 900 мг до 3000 мг или в диапазоне от 1500 мг до 3000 мг или в диапазоне от 2000 мг до 3000 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 900 мг или в диапазоне от 5 мг до 900 мг, или в диапазоне от 10 мг до 900 мг, или в диапазоне от 25 мг до 900 мг, или в диапазоне от 30 мг до 900 мг, или в диапазоне от 50 мг до 900 мг, или в диапазоне от 60 мг до 900 мг, или в диапазоне от 75 мг до 900 мг, или в диапазоне от 90 мг до 900 мг, или в диапазоне от 100 мг до 900 мг, или в диапазоне от 150 мг до 900 мг, или в диапазоне от 200 мг до 900 мг, или в диапазоне от 300 мг до 900 мг, или в диапазоне от 500 мг до 900 мг, или в диапазоне от 750 мг до 900 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 500 мг, или в диапазоне от 5 мг до 500 мг, или в диапазоне от 10 мг до 500 мг, или в диапазоне от 25 мг до 500 мг, или в диапазоне от 30 мг до 500 мг, или в диапазоне от 50 мг до 500 мг, или в диапазоне от 60 мг до 500 мг, или в диапазоне от 75 мг до 500 мг, или в диапазоне от 90 мг до 500 мг, или в диапазоне от 100 мг до 500 мг, или в диапазоне от 150 мг до 500 мг, или в диапазоне от

200 мг до 500 мг, или в диапазоне от 300 мг до 500 мг, или в диапазоне от 400 мг до 500 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 300 мг или в диапазоне от 5 мг до 300 мг, или в диапазоне от 10 мг до 300 мг, или в диапазоне от 25 мг до 300 мг, или в диапазоне от 30 мг до 300 мг, или в диапазоне от 50 мг до 300 мг, или в диапазоне от 60 мг до 300 мг, или в диапазоне от 75 мг до 300 мг, или в диапазоне от 90 мг до 300 мг, или в диапазоне от 100 мг до 300 мг, или в диапазоне от 150 мг до 300 мг, или в диапазоне от 200 мг до 300 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 200 мг или в диапазоне от 5 мг до 200 мг, или в диапазоне от 10 мг до 200 мг, или в диапазоне от 25 мг до 200 мг, или в диапазоне от 30 мг до 200 мг, или в диапазоне от 50 мг до 200 мг, или в диапазоне от 60 мг до 200 мг, или в диапазоне от 75 мг до 200 мг, или в диапазоне от 90 мг до 200 мг, или в диапазоне от 100 мг до 200 мг, или в диапазоне от 150 мг до 200 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 100 мг, или в диапазоне от 5 мг до 100 мг, или в диапазоне от 10 мг до 100 мг, или в диапазоне от 25 мг до 100 мг, или в диапазоне от 30 мг до 100 мг, или в диапазоне от 50 мг до 100 мг, или в диапазоне от 60 мг до 100 мг, или в диапазоне от 75 мг до 100 мг, или в диапазоне от 75 мг до 100 мг, или в диапазоне от 90 мг до 100 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 25 мг, или в диапазоне от 5 мг до 25 мг, или в диапазоне от 10 мг до 25 мг, или в диапазоне от 15 мг до 25 мг, или в диапазоне от 20 мг до 25 мг,

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое находится в диапазоне от 1 мг до 50 мг, или в диапазоне от 1 мг до 25 мг, или в диапазоне от 5 мг до 50 мг, или в диапазоне от 5 мг до 25 мг, или в диапазоне от 10 до 50 мг, или в диапазоне от 10 до 25 мг, или в диапазоне от 1 до 15 мг, или в диапазоне от 5 мг до 15 мг, или в диапазоне от 10 мг до 15 мг, или где однократная доза фармацевтической композиции содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410,

415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, или 1000 мг или более антитела

или где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в количестве, которое составляет менее 3000 мг, менее 2500 мг, менее 2000 мг, менее 1500 мг, менее 1000 мг, менее 900 мг, менее 500 мг, менее 300 мг, менее 200 мг, менее 100 мг, менее 90 мг, менее 75 мг, менее 50 мг, менее 25 мг или менее 10 мг, но составляет более 1 мг, более 2 мг, более 3 мг, более 4 мг или более 5 мг.

86. Способ по любому из пп. 83-85, где однократная доза фармацевтической композиции содержит антитело в концентрации в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл, 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.

87. Способ по любому из пп. 83-86, отличающийся тем, что однократная доза фармацевтической композиции содержит около 75 мг антитела.

88. Способ по любому из пп. 83-87, отличающийся тем, что однократная доза фармацевтической композиции содержит около 90 мг антитела.

89. Способ по любому из пп. 83-88, отличающийся тем, что однократная доза фармацевтической композиции содержит до 300 мг антитела.

88. Способ по любому из пп. 83-89, отличающийся тем, что однократная доза фармацевтической композиции содержит до 900 мг антитела.

91. Способ по любому из пп. 83-90, отличающийся тем, что однократная доза фармацевтической композиции содержит до 3000 мг антитела.

92. Способ по любому из пп. 83-91, отличающийся тем, что способ включает введение однократной дозы путем подкожной инъекции, необязательно при этом однократная доза содержит или состоит из 6 мг антитела или 18 мг антитела.

93. Способ по любому из пп. 83-92, который включает введение однократной дозы путем внутривенной инъекции.

94. Способ по любому из пп. 83-93, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду, необязательно воду по Фармакопее США.

95. Способ по любому из пп. 83-94, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит гистидин, необязательно в концентрации в диапазоне от 10 мМ до 40 мМ, такой как 20 мМ, в фармацевтической композиции.

96. Способ по любому из пп. 83-95, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит дисахарид, такой как сахароза, необязательно в количестве 5%, 6%, 7%, 8% или 9%, предпочтительно около 7% (мас./об.).

97. Способ по любому из пп. 83-96, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество или триблок-сополимер, необязательно полисорбат или полоксамер-188, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), причем, необязательно, полисорбат или полоксамер-188 присутствует в диапазоне от 0,01 до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02% (мас./об.).

98. Способ по любому из пп. 83-97, отличающийся тем, что 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.

99. Способ по п. 98, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

(i) антитело в концентрации 150 мг/мл;

(ii) воду по Фармакопее США;

(iii) 20 мМ гистидина;

(iv) 7% сахарозы; и

(v) 0,02% PS80,

где фармацевтическая композиция имеет pH 6.

100. Способ по любому из пп. 83-99, отличающийся тем, что субъект является взрослым.

101. Способ по п. 100, отличающийся тем, что субъект находится в диапазоне от 18 до 65 лет.

102. Способ по любому из пп. 83-101, отличающийся тем, что субъект весит от 40 до 125 кг и/или субъект имеет индекс массы тела (ИМТ) от 18 до 35 кг/м^2.

103. Способ по любому из пп. 83-102, отличающийся тем, что субъект имеет хроническую инфекцию HBV; например, определяемую положительным сывороточным HBsAg, ДНК HBV и/или HBeAg в 2 случаях, причем 2 случая являются по меньшей мере 6-месячными интервалами.

104. Способ по любому из пп. 83-103, отличающийся тем, что у субъекта отсутствует цирроз печени.

105. Способ по п. 104, отличающийся тем, что отсутствие цирроза печени определяется:

оценкой с помощью фиброскана (например, в течение 6 месяцев до введения однократной дозы фармацевтической композиции); или

биопсией печени (например, в течение 12 месяцев до введения однократной дозы фармацевтической композиции),

где предпочтительно отсутствие цирроза определяется отсутствием фиброза F3 по Метавиру или отсутствием цирроза F4.

106. Способ по любому из пп. 83-105, отличающийся тем, что субъект получил ингибитор обратной транскриптазы (NRTI), необязательно в течение 120 дней, дополнительно необязательно в течение 60 дней, до введения однократной дозы.

107. Способ по п. 106, отличающийся тем, что NRTI содержит один или более из: тенофовира; тенофовира дизопроксила (например, тенофовира диспроксилфумарата); тенофовира алафенамида; энтекавира; ламивудина; адефовира; и адефовира дипивоксила.

108. Способ по любому из пп. 83-107, отличающийся тем, что субъект имеет концентрацию ДНК HBV в сыворотке менее 100 МЕ/мл не более чем за 28 дней до введения однократной дозы.

109. Способ по любому из пп. 83-108, отличающийся тем, что субъект имеет концентрацию HBsAg в сыворотке менее 3000 МЕ/мл до введения однократной дозы и необязательно менее 1000 МЕ/мл до введения однократной дозы.

110. Способ по любому из пп. 83-109, отличающийся тем, что субъект имеет концентрацию HBsAg в сыворотке более или равную 3000 МЕ/мл не более чем за 28 дней до введения однократной дозы и, необязательно, более или равную 1000 МЕ/мл не более чем за 28 дней до введения однократной дозы.

111. Способ по любому из пп. 83-110, отличающийся тем, что субъект был HB e-антиген (HBeAg) -отрицательным не более чем за 28 дней до введения однократной дозы.

112. Способ по любому из пп. 83-111, отличающийся тем, что у субъекта отсутствовали антитела к HB не более чем за 28 дней до введения однократной дозы.

113. Способ по любому из пп. 83-112, отличающийся тем, что субъект перед введением однократной дозы:

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

(ii) имеет аланинаминотрансферазу (АЛТ) меньше, чем 2 × верхний предел нормы (ULN).

114. Способ по любому из пп. 83-113, отличающийся тем, что через 56 дней после введения однократной дозы у субъекта наблюдается более чем 2-кратное снижение

HBsAg в сыворотке (например, концентрация HBsAg в сыворотке, например, как определено с помощью анализа Abbott ARCHITECT) по сравнению с HBsAg в сыворотке субъекта за от 0 до 28 дней до введения однократной дозы.

115. Способ по любому из пп. 83-114, отличающийся тем, что после введения разовой дозы (например, через 56 дней после введения разовой дозы) субъект:

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

(ii) имеет адаптивный иммунный ответ против HBV.

116. Способ по любому из пп. 83-115, отличающийся тем, что субъект является мужчиной.

117. Способ по любому из пп. 83-115, отличающийся тем, что субъект является женщиной.

118. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59 в концентрации от 100 до 200 мг/мл, такой как 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,

и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

119. Фармацевтическая композиция по п. 118, которая содержит до 6 мг, до 18 мг, до 75 мг, до 90 мг, до 300 мг, до 900 мг или до 3000 мг антитела.

120. Фармацевтическая композиция по п. 118 или 119, которая содержит около 75 мг антитела.

121. Фармацевтическая композиция по п. 118 или 119, которая содержит около 90 мг антитела.

122. Фармацевтическая композиция по п. 118 или 119, которая содержит около 300 мг антитела.

123. Фармацевтическая композиция по п. 118 или 119, которая содержит около 900 мг антитела.

124. Фармацевтическая композиция по п. 118 или 119, которая содержит около 3000 мг антитела.

125. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 118-124, которая содержит воду, необязательно воду по Фармакопее США.

126. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 118-125, которая содержит гистидин, необязательно в концентрации от 10 до 40 мМ, такой как 20 мМ.

127. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 118-126, которая содержит дисахарид, такой как сахароза, необязательно в количестве 5%, 6%, 7%, 8% или 9%, предпочтительно около 7% (мас./об.).

128. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 118-127, которая содержит поверхностно-активное вещество, необязательно полисорбат, предпочтительно полисорбат 80 (PS80), где, необязательно, полисорбат присутствует в диапазоне от 0,01% до 0,05% (мас./об.), предпочтительно 0,02% (мас./об.).

129. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 118-128, которая 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.

130. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 118-129, которая содержит:

(i) антитело в концентрации 150 мг/мл;

(ii) воду по Фармакопее США;

(iii) 20 мМ гистидина;

(iv) 7% сахарозы; и

(v) 0,02% PS80,

где фармацевтическая композиция имеет pH 6.

131. Способ по любому из пп. 83-117, отличающийся тем, что после введения однократной дозы HBsAg в сыворотке у субъекта снижено по сравнению с исходным уровнем на 1,0 $\log^{10}$ МЕ/мл, 1,5 $\log^{10}$ МЕ/мл или более, причем, необязательно, снижение сохраняется в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более дней после введения однократной дозы.

132. Способ по любому из пп. 83-117 и 131, отличающийся тем, что после введения однократной дозы HBsAg субъекта в сыворотке снижено по сравнению с исходным уровнем в течение по меньшей мере 8, по меньшей мере 15, по меньшей мере 22 или по меньшей мере 29 дней.

133. Способ диагностики in vitro инфекции гепатита B и/или инфекции гепатита D, включающий:

(i) приведение в контакт образца, полученного от субъекта, с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-59; и

(ii) обнаружение комплекса, содержащего антиген и антитело или содержащего антиген и антигенсвязывающий фрагмент.

134. Способ по п. 133, где образец включает кровь, полученную от субъекта.

135. Способ обнаружения наличия или отсутствия эпитопа в правильной конформации в вакцине против гепатита B и/или гепатита D, включающий:

(i) приведение вакцины в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-59; и

(ii) определение того, образовался ли комплекс, содержащий антиген и антитело, или содержащий антиген и антигенсвязывающий фрагмент.

136. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59, которые:

(i) имеют усиленное связывание с FcγRIIA человека, FcγRIIIA человека или с обоими, по сравнению с эталонным полипептидом, который включает фрагмент Fc, который не содержит G236A/A330L/I332E, где FcγRIIA человека необязательно представляет собой H131 или R131, и/или FcγRIIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158;

(ii) имеют сниженное связывание с FcγRIIB человека по сравнению с эталонным полипептидом, который включает фрагмент Fc, который не содержит G236A/A330L/I332E;

(iii) не связываются с FcγRIIB человека;

(iv) имеют сниженное связывание с C1q человека по сравнению с эталонным полипептидом, который включает Fc-фрагмент, который не содержит G236A/A330L/I332E;

(v) не связываются с C1q человека; (vi) активируют FcγRIIA, FcγRIIIA человека или и то, и другое в большей степени, чем эталонный полипептид, который содержит фрагмент Fc, который не содержит G236A/A330L/I332E, где FcγRIIA человека необязательно представляет собой H131 или R131, и/или FcγRIIIA человека необязательно представляет собой F158 или V158;

(vii) не активируют FcγRIIB человека;

(viii) активируют естественную киллерную (NK) клетку человека в присутствии HBsAg в большей степени, чем эталонный полипептид, который включает фрагмент Fc, который не содержит G236A/A330L/I332E, причем эталонный полипептид необязательно представляет собой антитело, которое связывается с HB Ag, необязательно HBsAg;

(ix) способны связываться с вариантом HBsAg, содержащим HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H , HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A или любой их комбинацией; и/или (x) имеют улучшенное связывание с вариантом HBsAg, содержащим HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N,

HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A или любой их комбинацией по сравнению с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с HBsAg и включают фрагмент Fc, не содержащий G236A/A330L/I332E.

137. Способ лечения хронической инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

введение субъекту агента, снижающего антигенную нагрузку HBV; и

введение субъекту антитела к HBV по любому из пп. 1-59.

138. Способ лечения хронической инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

введение субъекту ингибитора экспрессии гена HBV; и

введение субъекту антитела против HBV по любому из пп. 1-59.

139. Способ по пп. 137 или 138, где агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, при этом смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов 1579-1597 SEQ ID NO:116.

140. Способ по любому из пп. 137-139, отличающийся тем, что агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем смысловая цепь содержит нуклеотиды 1579-1597 SEQ ID NO:116.

141. Способ по любому из пп. 137-140, отличающийся тем, что по меньшей мере одна цепь агента РНКи содержит 3'-липкий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида.

142. Способ по любому из пп. 137-140, отличающийся тем, что по меньшей мере одна цепь агента РНКи содержит 3'-липкий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

143. Способ по любому из пп. 137-142, где двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 15-30 нуклеотидных пар.

144. Способ по любому из пп. 137-142, отличающийся тем, что двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 17-23 нуклеотидных пар.

145. Способ по любому из пп. 137-142, отличающийся тем, что двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 17-25 нуклеотидных пар.

146. Способ по любому из пп. 137-142, отличающийся тем, что двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 23-27 нуклеотидных пар.

147. Способ по любому из пп. 137-142, отличающийся тем, что двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 19-21 нуклеотидных пар.

148. Способ по любому из пп. 137-142, отличающийся тем, что двухцепочечная область агента РНКи имеет длину 21-23 нуклеотидных пар.

149. Способ по любому из пп. 137-142, отличающийся тем, что каждая цепь агента РНКи содержит 15-30 нуклеотидов.

150. Способ по любому из пп. 137-142, отличающийся тем, что каждая цепь агента РНКи содержит 19-30 нуклеотидов.

151. Способ по любому из пп. 137-150, где агент РНКи представляет собой миРНК.

152. Способ по п. 151, где миРНК ингибирует экспрессию транскрипта HBV, который кодирует белок HBsAg, белок HBcAg и белок HBx или белок ДНК-полимеразы HBV.

153. Способ по п. 151 или п. 152, отличающийся тем, что миРНК связывается по меньшей мере с 15 смежными нуклеотидами мишени, кодируемыми: геном P, нуклеотидами 2309-3182 и 1-1625 NC_003977.2; геном S (кодирующим белки L, M и S), нуклеотидами 2850-3182 и 1-837 NC_003977.2; HBx, нуклеотидами 1376-1840 NC_003977.2; или геном C, нуклеотидами 1816-2454 NC_003977.2.

154. Способ по п. 151 или п. 152, отличающийся тем, что антисмысловая цепь миРНК содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:119).

155. Способ по п. 151 или 152, отличающийся тем, что антисмысловая цепь миРНК содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:119).

156. Способ по п. 151 или 152, отличающийся тем, что антисмысловая цепь миРНК содержит нуклеотидную последовательность 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:119).

157. Способ по п. 151 или 152, отличающийся тем, что антисмысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:119).

158. Способ по любому из пп. 154-157, отличающийся тем, что смысловая цепь миРНК содержит нуклеотидную последовательность 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:118).

159. Способ по любому из пп. 154-157, отличающийся тем, что смысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:118).

160. Способ по п. 151 или 152, отличающийся тем, что антисмысловая цепь миРНК содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'-UAAAUUGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:121).

161. Способ по п. 151 или 152, отличающийся тем, что антисмысловая цепь миРНК содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов нуклеотидной последовательности 5'- UAAAAUUGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:121).

162. Способ по п. 151 или 152, отличающийся тем, что антисмысловая цепь миРНК содержит нуклеотидную последовательность 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:121).

163. Способ по п. 151 или 152, отличающийся тем, что антисмысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:121).

164. Способ по любому из пп. 154-157, отличающийся тем, что смысловая цепь миРНК содержит нуклеотидную последовательность 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:120).

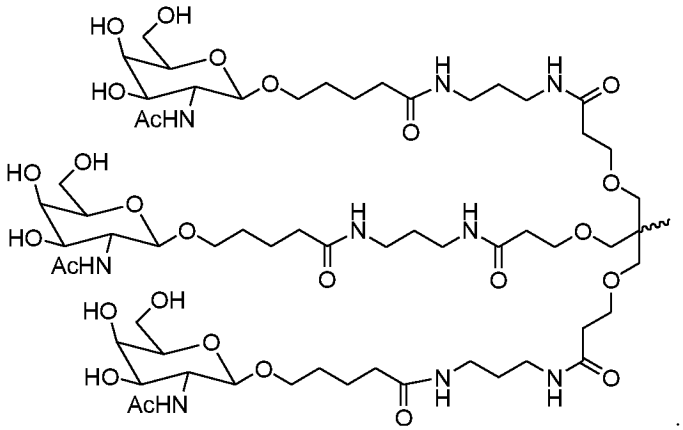
165. Способ, композиция для использования или применение по любому из пп. 154-157, где смысловая цепь миРНК состоит из нуклеотидной последовательности 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:120).

166. Способ по любому из пп. 151-165, где по существу все нуклеотиды указанной смысловой цепи и по существу все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды, и

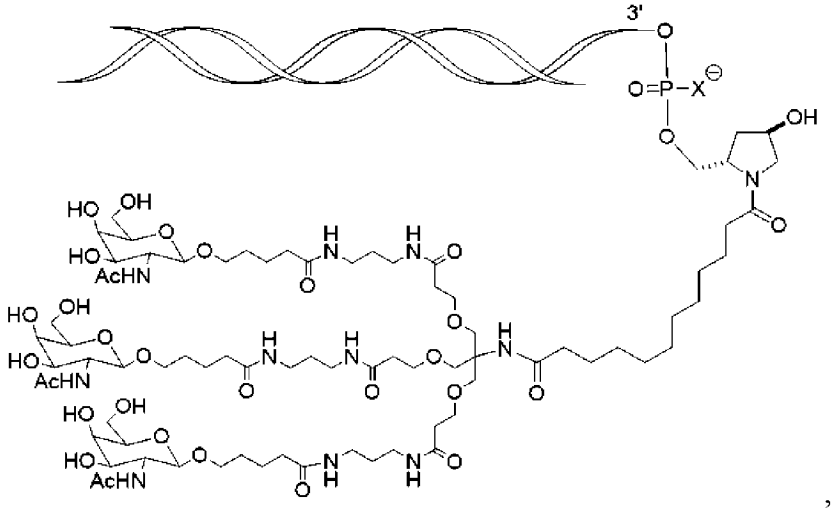
где указанная смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце.

167. Способ по п. 166, где лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный линкер, двухвалентный разветвленный линкер или трехвалентный разветвленный линкер.

168. Способ по п. 166 или 167, отличающийся тем, что лиганд представляет собой



169. Способ по п. 168, отличающийся тем, что миРНК конъюгирована с лигандом, как показано в следующей структуре:



где X представляет собой O или S.

170. Способ по любому из пп. 151-169, где по меньшей мере один нуклеотид миРНК представляет собой модифицированный нуклеотид, включающий дезоксинуклеотид, 3'-концевой дезокситиминовый (dT) нуклеотид, 2'-O-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезокси-модифицированный нуклеотид, блокированный нуклеотид, разблокированный нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, ограниченный этиловый нуклеотид, безосновный нуклеотид, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-O-аллил-модифицированный нуклеотид, 2'-C-алкил-модифицированный нуклеотид, 2'-гидроксил-модифицированный нуклеотид, 2'-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-O-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид, фосфоамидат, нуклеотид, включающий неприродное основание, нуклеотид, модифицированный тетрагидропираном, нуклеотид, модифицированный 1,5-ангидрогекситолом, нуклеотид, модифицированный циклогексенилом, нуклеотид, включающий тиофосфатную группу, нуклеотид, включающий метилфосфонатную группу, нуклеотид включающий 5'-фосфат,

аденозин-гликолевую нуклеиновую кислоту или нуклеотид, включающий миметик 5'-фосфата.

171. Способ по любому из пп. 151-169, отличающийся тем, что миРНК включает модификацию фосфатного каркаса, модификацию 2'-рибозы, модификацию 5' - трифосфата или модификацию конъюгацией GalNAc.

172. Способ по п. 171, отличающийся тем, что модификация фосфатного каркаса включает тиофосфатную связь.

173. Способ по п. 171 или п. 172, отличающийся тем, что модификация 2'-рибозы включает фтор- или -О-метильную замену.

174. Способ по любому из пп. 151-159 и 166-173, где миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:122), и антисмысловую цепь, содержащую 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:123),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

175. Способ по любому из пп. 151-159 и 166-173, отличающийся тем, что миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96 -3' (SEQ ID NO:124), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu - 3' (SEQ ID NO:125).

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

(Agn) представляет собой аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA);

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

176. Способ, композиция для использования или применение по любому из пп. 151-153 и 160-173, где миРНК имеет смысловую цепь, содержащую 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfuuuaL96 -3' (SEQ ID NO:126), и антисмысловую цепь, содержащую 5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc -3' (SEQ ID NO:127),

где a, c, g и u представляют собой 2'-O-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-O-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-O-метилуридин-3'-фосфат, соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-фторуридин-3'-фосфат, соответственно;

s представляет собой тиофосфатную связь; и

L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол.

177. Способ по любому из пп. 137-176, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека и субъекту вводят терапевтически эффективное количество агента РНКи или миРНК; и при этом эффективное количество агента РНКи или миРНК составляет от около 1 мг/кг до около 8 мг/кг.

178. Способ по любому из пп. 137-177, отличающийся тем, что агент РНКи или миРНК вводят субъекту два раза в сутки, один раз в сутки, каждые два дня, каждые три дня, два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые четыре недели или один раз в месяц.

179. Способ по любому из пп. 137-177, отличающийся тем, что агент РНКи или миРНК вводят субъекту каждые четыре недели.

180. Способ по любому из пп. 151-179, отличающийся тем, что вводят две миРНК, каждая из которых направлена на ген HBV, и первая миРНК имеет антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120 или SEQ ID NO:126; и вторая миРНК содержит миРНК, имеющую смысловую цепь, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в нуклеотидах 2850-3182 SEQ ID NO:116.

181. Способ по любому из пп. 151-179, отличающийся тем, что вводят две миРНК, направленные на ген HBV, причем две миРНК содержат: миРНК, направленную на ген X HBV, и миРНК, направленную на ген S HBV.

182. Способ по любому из пп. 151-179, отличающийся тем, что вводят две миРНК, каждая из которых направлена на ген HBV, и первая миРНК имеет антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:123 или SEQ ID NO:125; и вторая миРНК имеет антисмысловую цепь, которая содержит SEQ ID NO:121 или SEQ ID NO:127.

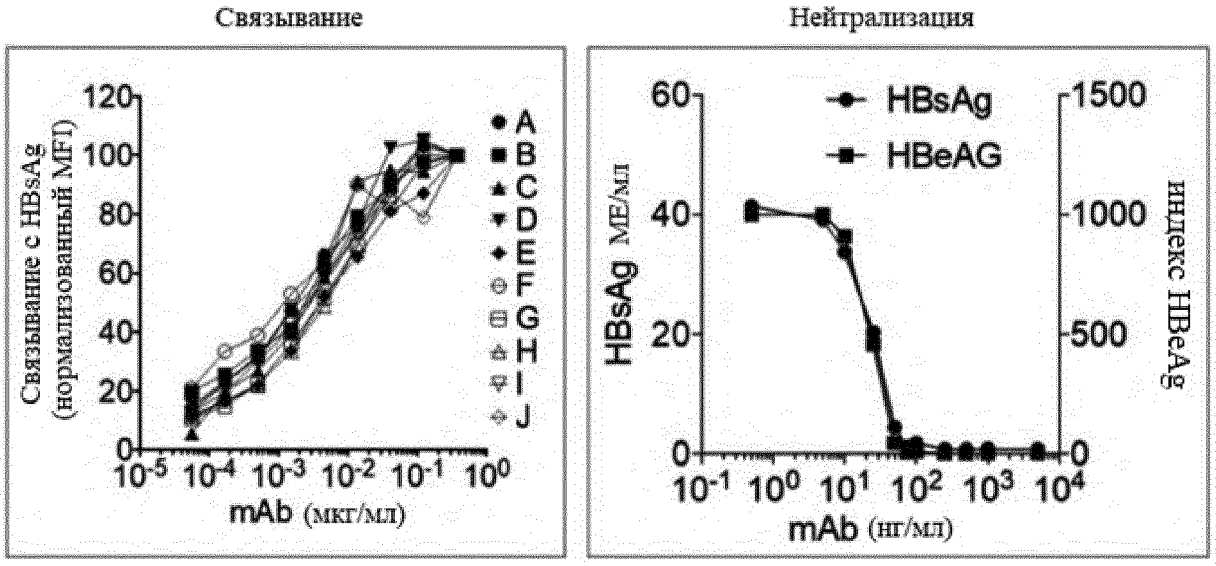
183. Способ по п. 181, отличающийся тем, что первая миРНК имеет смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:122 или SEQ ID NO:124; и вторая миРНК имеет смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO:120 или SEQ ID NO:126.

184. Способ по любому из пп. 179-183, отличающийся тем, что две миРНК вводят одновременно.

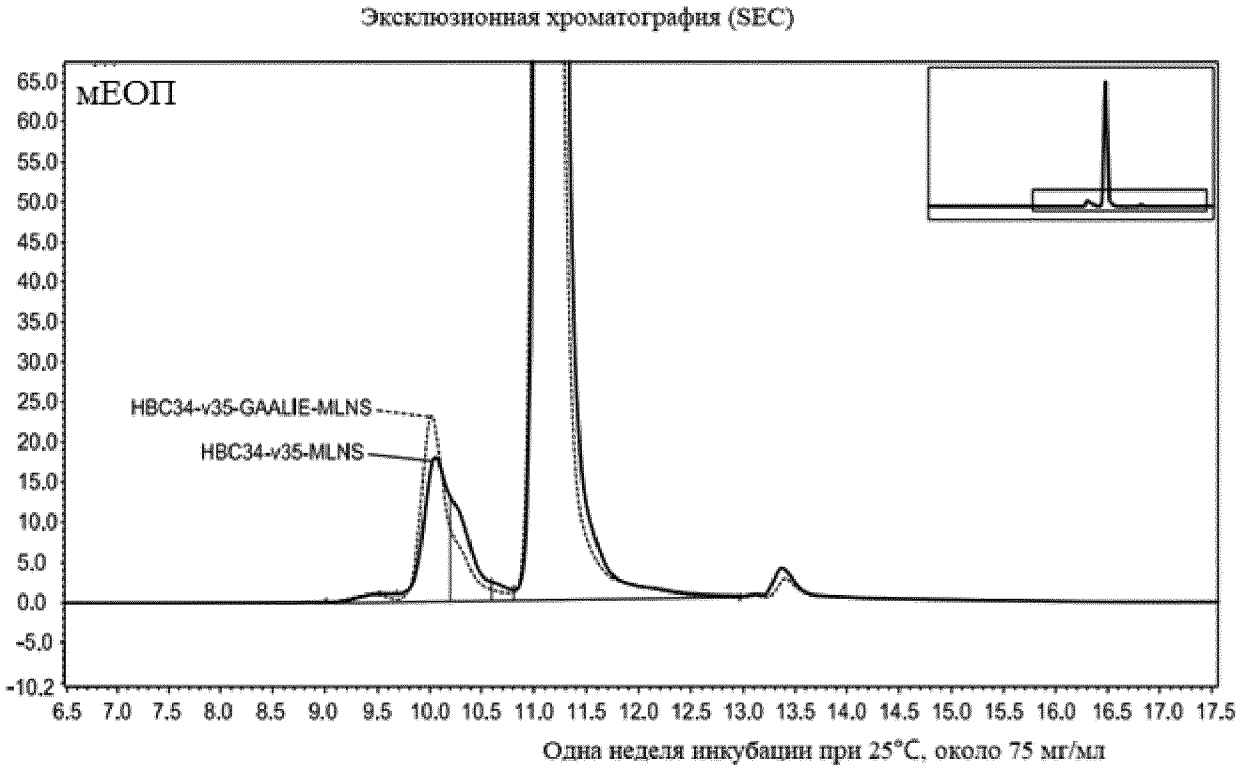
185. Способ по любому из пп. 137-184, дополнительно включающий введение субъекту нуклеотидного(ых) аналога(ов), или отличающийся тем, что субъекту также вводят нуклеотидный(ые) аналог(и).

186. Способ, композиция для использования или применение по п. 185, отличающиеся тем, что нуклеотидный (нуклеозидный) аналог IDE представляет собой тенофовир дизопроксилфумарат (TDF), тенофовир алафенамид (TAF), ламивудин, адефовир дипивоксил, энтекавир (ETV), телбивудин, AGX-1009, эмтрицитабин (FTC), клевудин, ритонавир, дипивоксил, лобукавир, фамвир, N-ацетил-цистеин (NAC), PC1323, терадигм-HBV, тимозин-альфа и ганцикловир, бесифовир (ANA-380/LB-80380) или тенофир-алиады (CMX/X157).

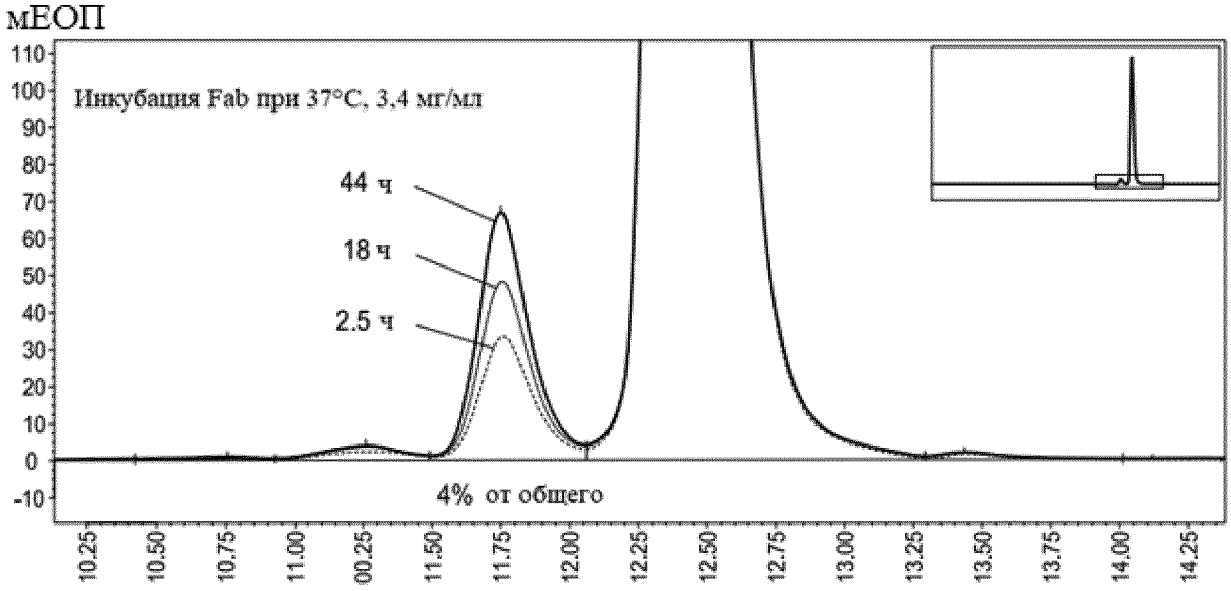
СКОНСТРУИРОВАННЫЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ГЕПАТИТА В И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ



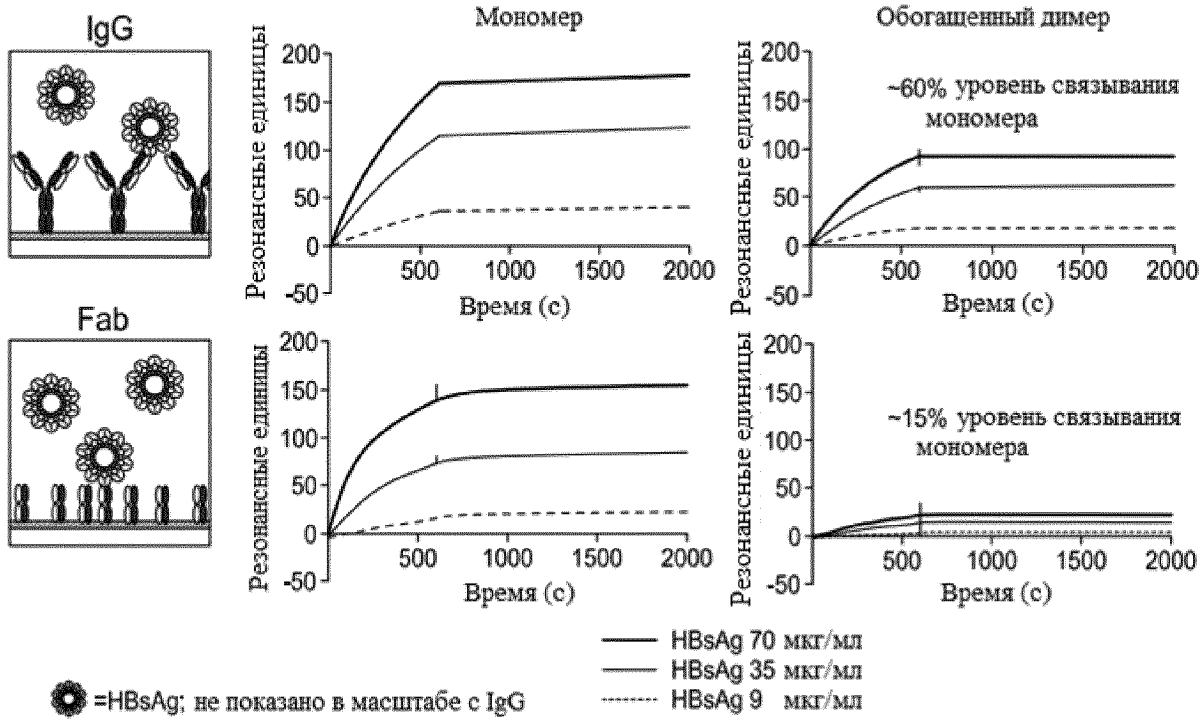
Фиг. 1



Фиг. 2

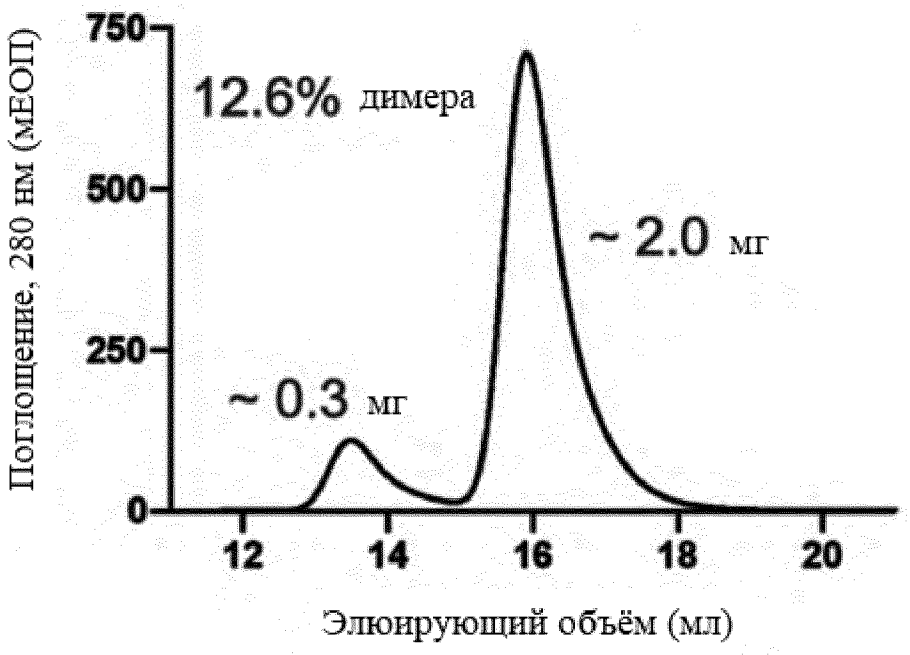

мЕОП
Инкубация Fab при 37°C, 3,4 мг/мл
44 ч
18 ч
2.5 ч
4% от общего
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
10.25
10.50
10.75
11.00
00.25
11.50
11.75
12.00
12.25
12.50
12.75
13.00
13.25
13.50
13.75
14.00
14.25

Фиг. 3

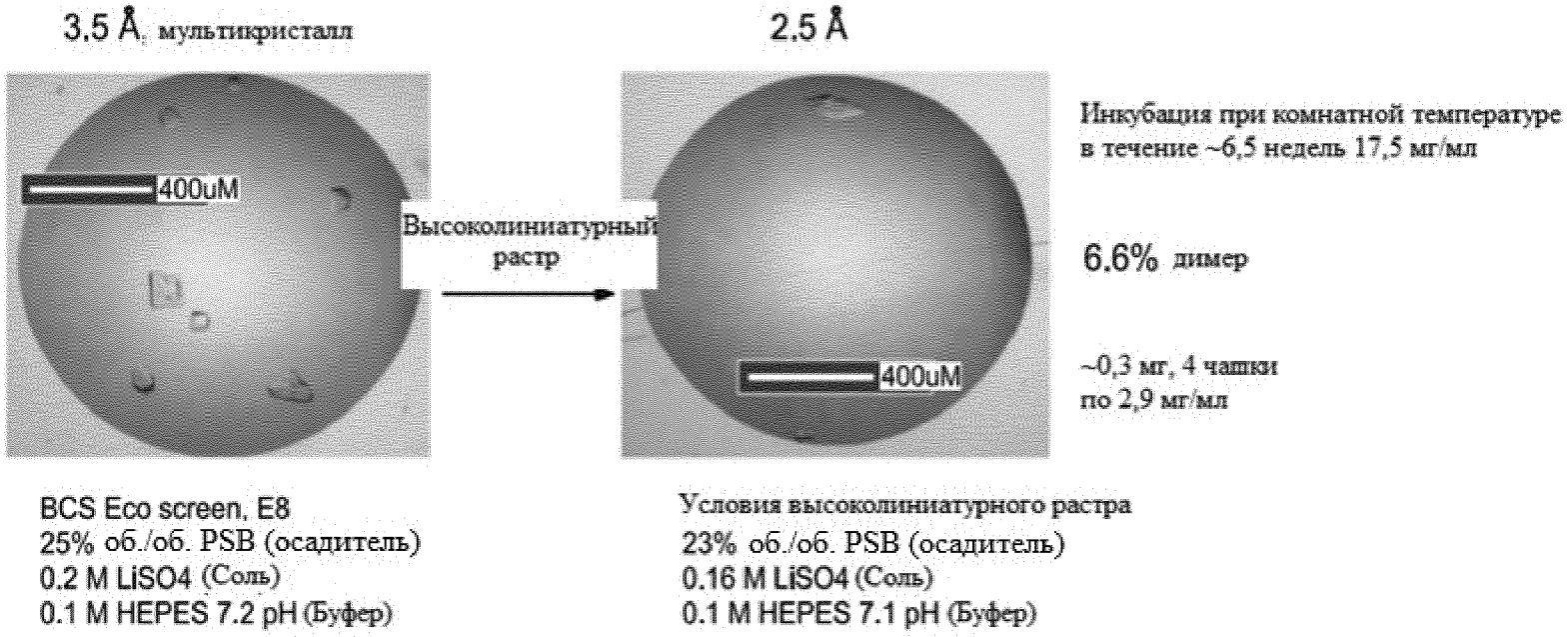

IgG
Fab
Мономер
Обогащенный димер
Резонансные единицы
Время (с)
~60% уровень связывания мономера
~15% уровень связывания мономера
HBsAg 70 мкг/мл
HBsAg 35 мкг/мл
HBsAg 9 мкг/мл
=HBsAg; не показано в масштабе с IgG

Фиг. 4

Инкубация по 40 °C в течение 7 дней при 14 нг/мл

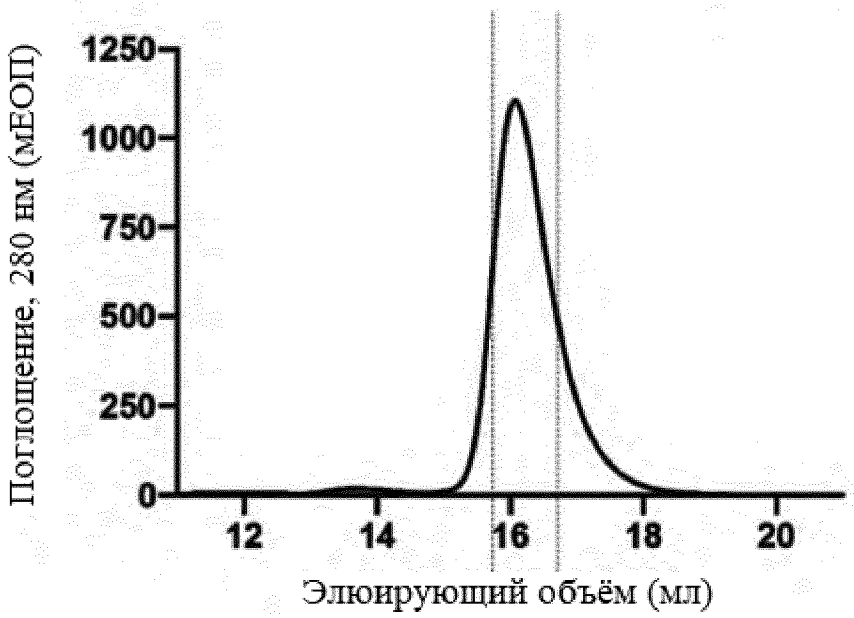


Фиг. 5А

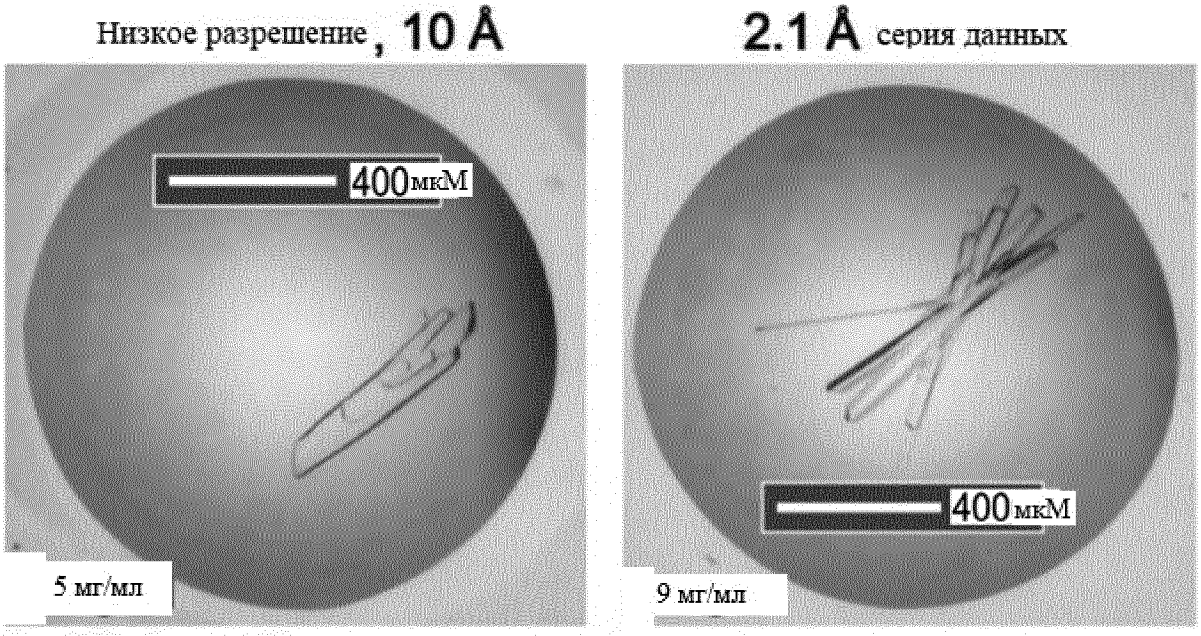

3.5 Å, мультикристалл
2.5 Å
400uM
Высоколиниатурный растр
400uM
Инкубация при комнатной температуре в течение ~6,5 недель 17,5 мг/мл
6.6% димер
~0,3 мг, 4 чашки по 2,9 мг/мл
BCS Eco screen, E8
25% об./об. PSB (осадитель)
0.2 M LiSO4 (Соль)
0.1 M HEPES 7.2 pH (Буфер)
Условия высоколиниатурного растра
23% об./об. PSB (осадитель)
0.16 M LiSO4 (Соль)
0.1 M HEPES 7.1 pH (Буфер)

Фиг. 5B

пик мономера HBC34 rFab

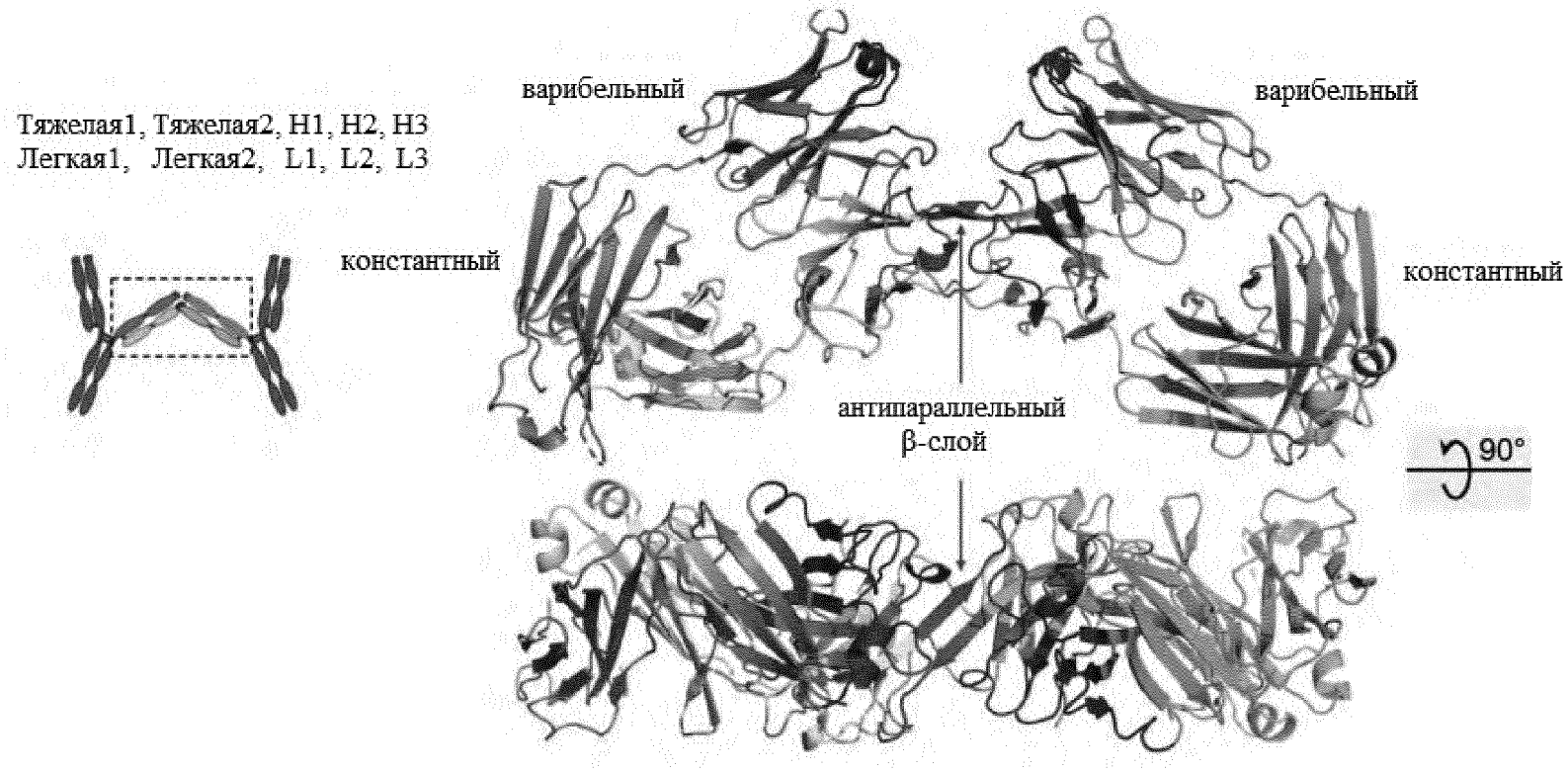


Фиг. 6А



Условия кристаллизации:
0,2 М аммония иодида, 20% мас./об. PEG3350

Фиг. 6В

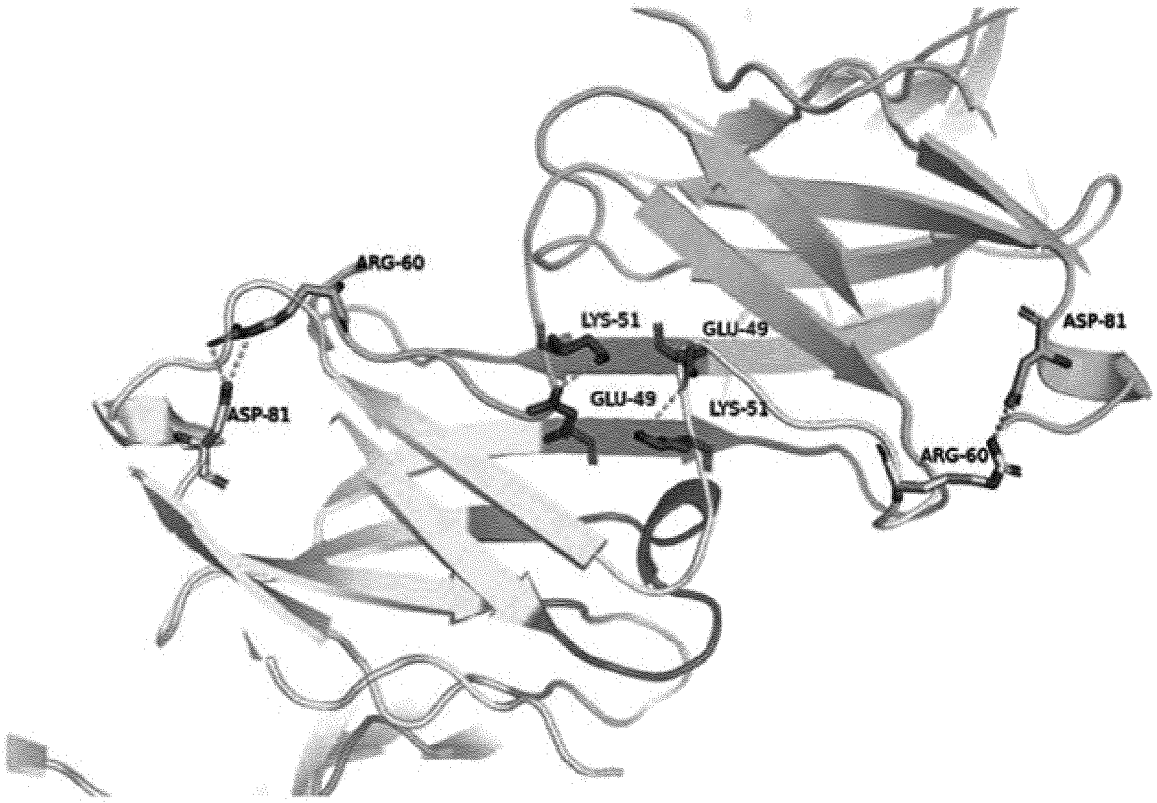

Тяжелая1, Тяжелая2, H1, H2, H3
Легкая1, Легкая2, L1, L2, L3
варибельный
варибельный
константный
константный
антипараллельный
β-слой
90°

Фиг. 7

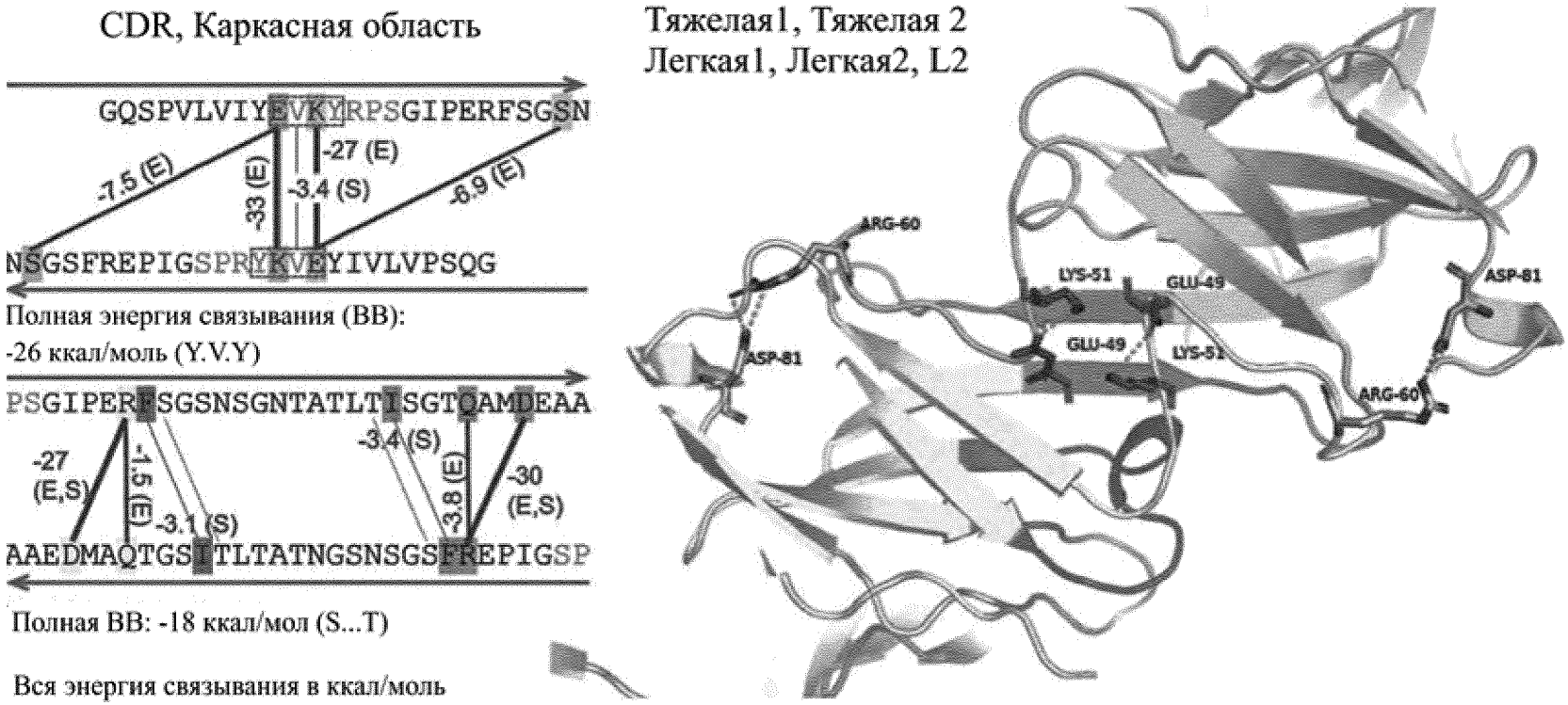
Тяжелая1, Тяжелая2
Легкая1, Легкая2, L2

C- ...Lys-Val-Glu...-N
N- ...Glu-Val-Lys...-C

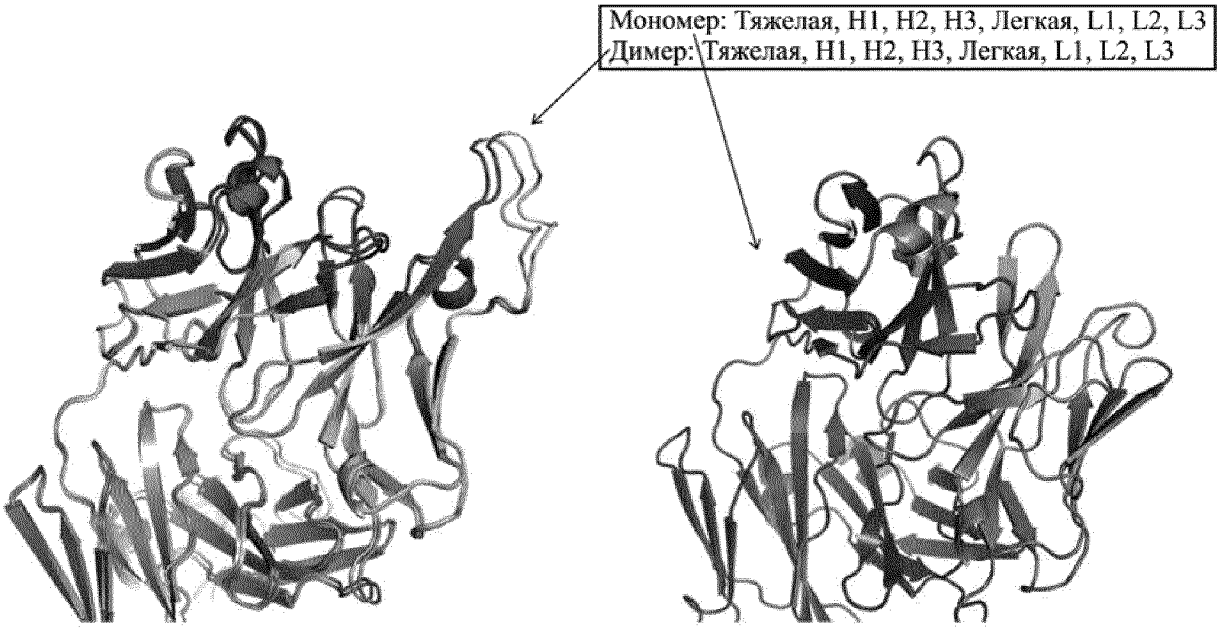
-- = солевой мостик
-- = гидрофобное взаимодействие



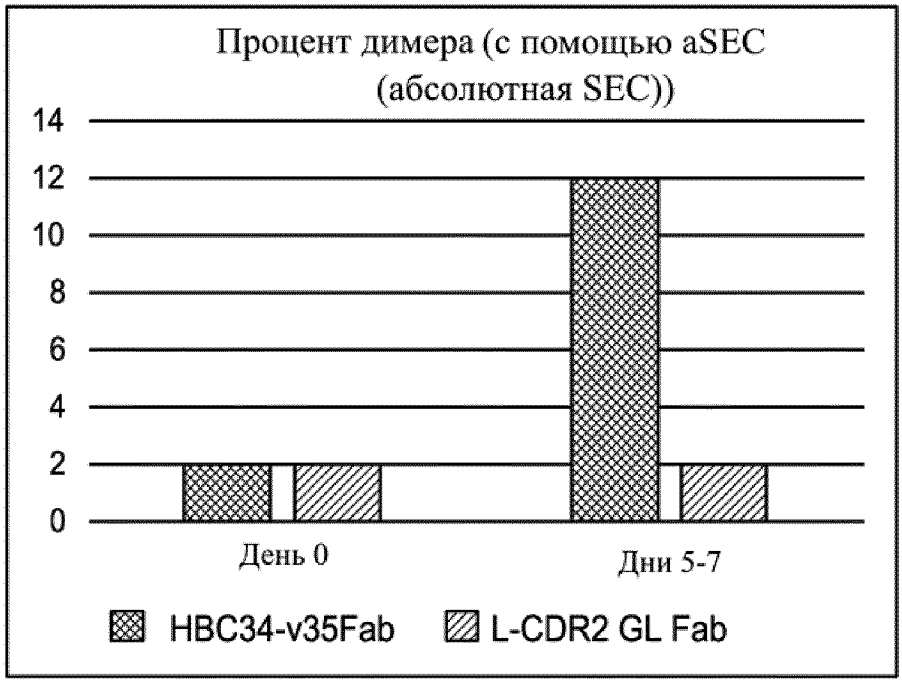
Фиг. 8


CDR, Каркасная область
Тяжелая1, Тяжелая 2
Легкая1, Легкая2, L2
GQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSN
-7.5 (E)
-33 (E)
-27 (E)
-3.4 (S)
-6.9 (E)
NSGSFREPIGSPRYKVEYIVLVPSQG
Полная энергия связывания (BB):
-26 ккал/моль (Y.V.Y)
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAA
-27
(E,S)
-1.5 (E)
-3.1 (S)
-3.4 (S)
-3.8 (E)
-30
(E,S)
AAEDMAQTGSITLTATNGSNSGSFREPIGSP
Полная BB: -18 ккал/мол (S...T)
Вся энергия связывания в ккал/моль
ARG-60
ASP-81
LYS-51
GLU-49
GLU-49
LYS-51
ASP-81
ARG-60

Фиг. 9

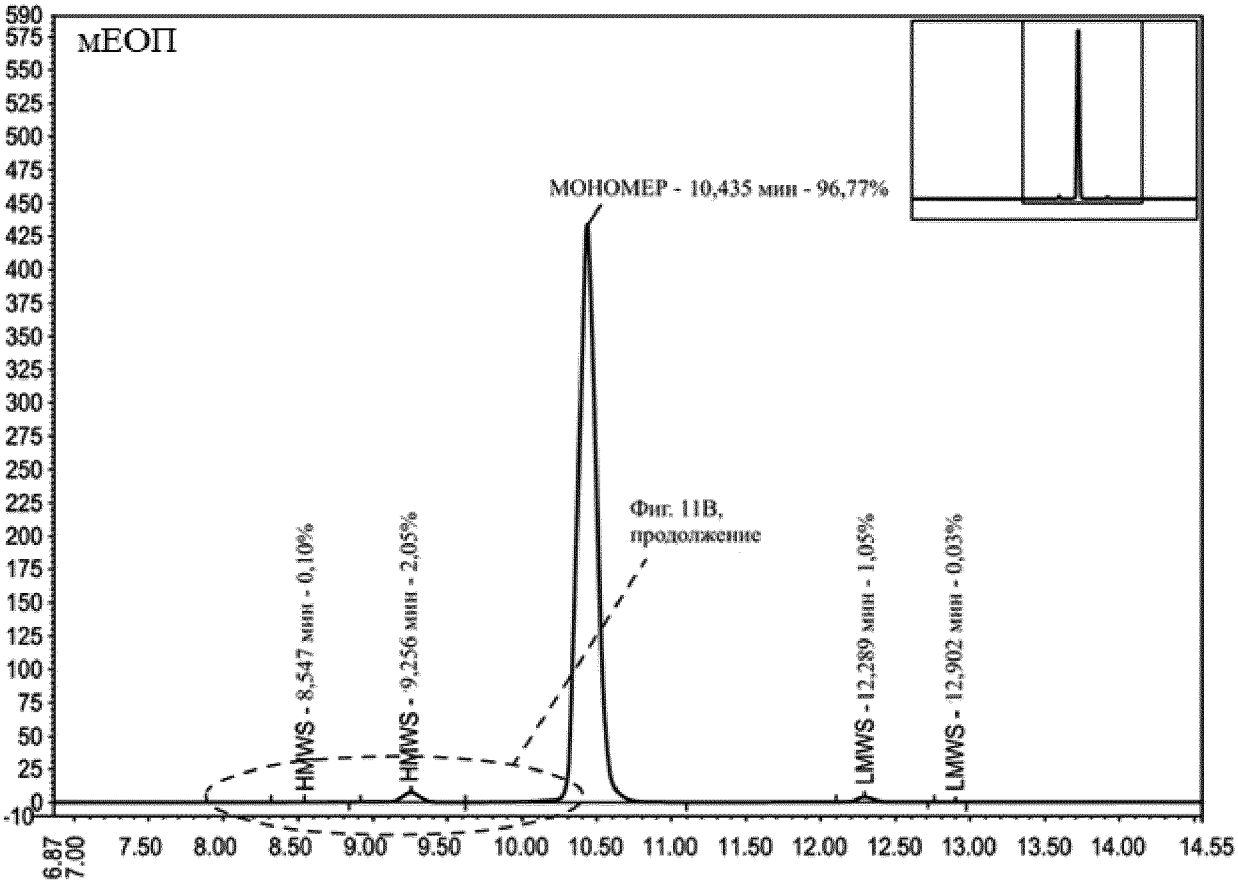

Мономер: Тяжелая, H1, H2, H3, Легкая, L1, L2, L3
Димер: Тяжелая, H1, H2, H3, Легкая, L1, L2, L3

Фиг. 10

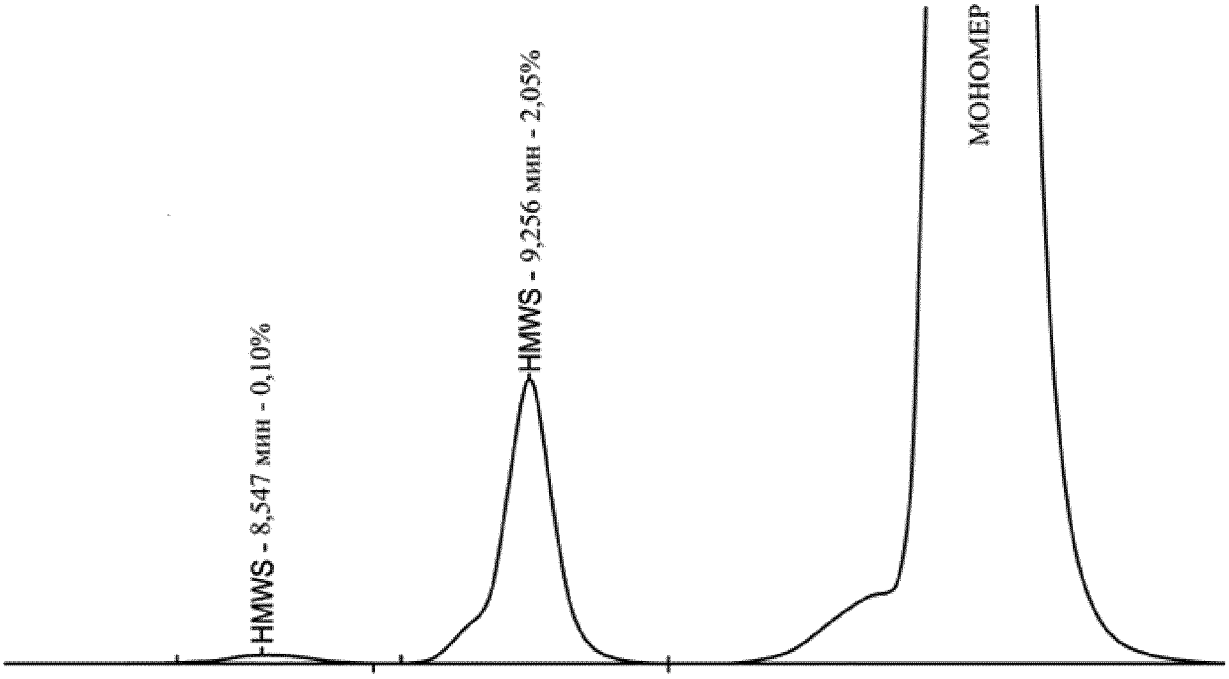


Fab	Температура	Концентрация	Длительность
HBC34-v35	40°C	14 мг/мл	7 дней
L-CDR2 GL	40°C	26 мг/мл	5 дней

Фиг. 11A

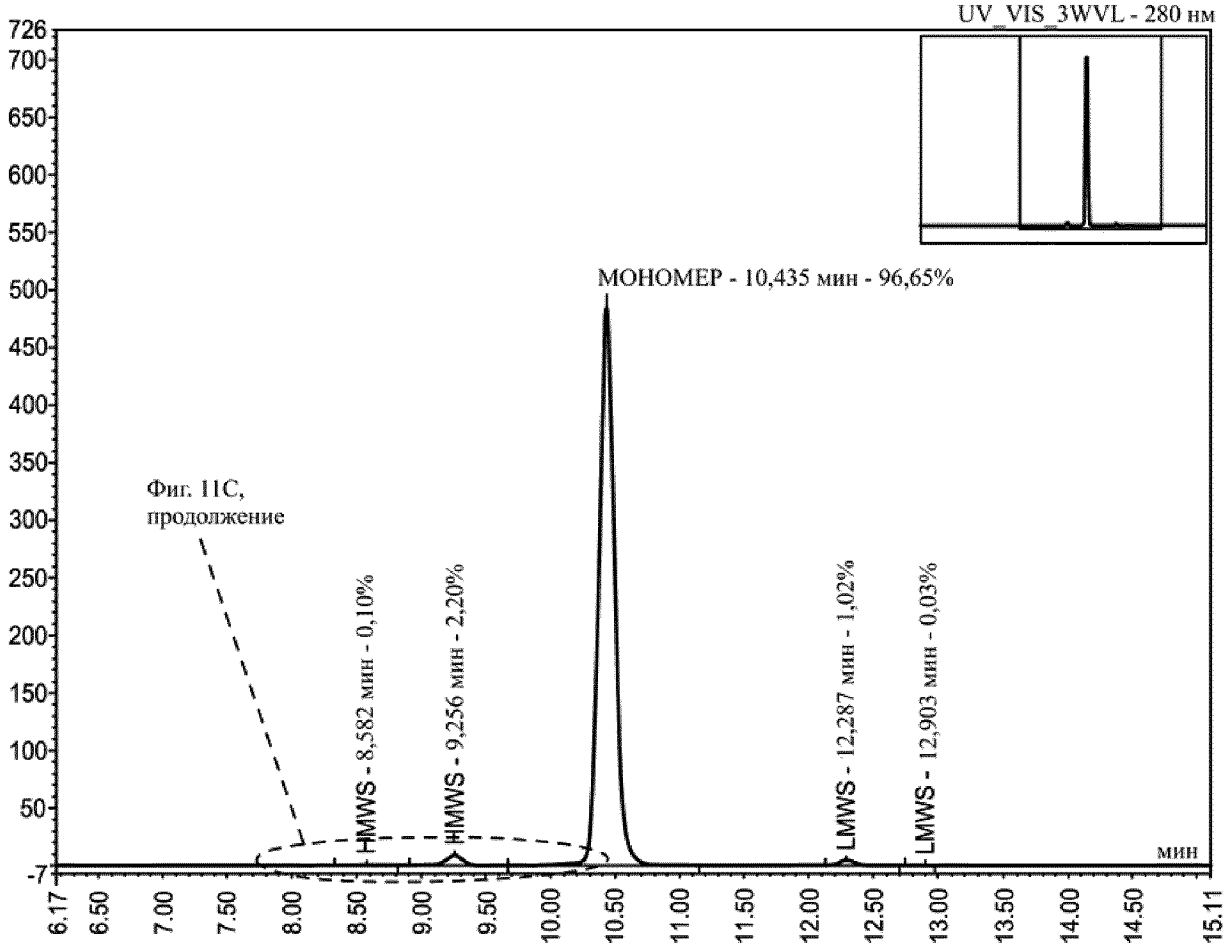

мЕОП
МОНОМЕР - 10,435 мин - 96,77%
HMWS - 8,547 мин - 0,10%
HMWS - 9,256 мин - 2,05%
Фиг. 11B,
продолжение
LMWS - 12,289 мин - 1,05%
LMWS - 12,902 мин - 0,03%
590
575
550
525
500
475
450
425
400
375
350
325
300
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
-10
6.87
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.50
10.00
10.50
11.00
11.50
12.00
12.50
13.00
13.50
14.00
14.55

Фиг. 11B

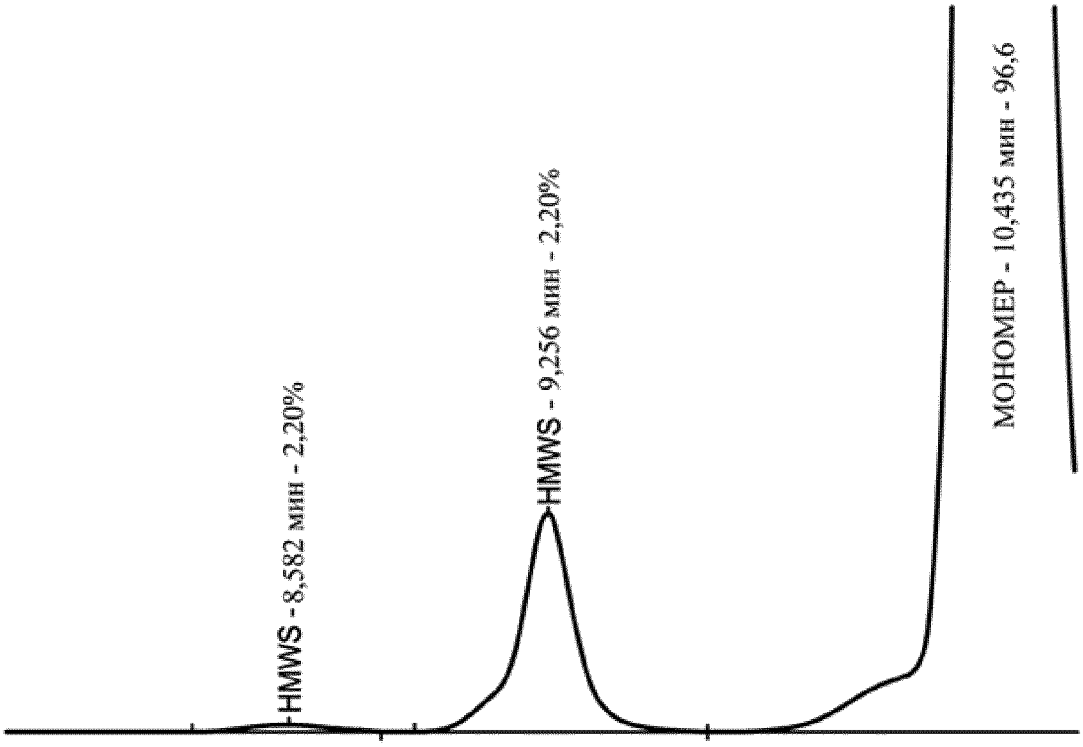


№ пика	Название пика	Время удерживания мин	Количество	Отн. площадь, %	Площадь мЕОП*мин	Высота мЕОП
1	HMWS	8.547	н.д. (нет данных)	0.10	0.0596	0.24
2	HMWS	9.256	н.д.	2.05	1.2289	7.59
3	МОНОМЕР	10.435	н.д.	96.77	57.9201	428.68
4	LMWS	12.289	н.д.	1.05	0.6278	4.11
5	LMWS	12.902	н.д.	0.03	0.0168	0.15
Максимум			0.0000	96.77	57.9201	428.68
Минимум			0.0000	0.03	0.0168	0.15
Сумма			0.0000	100.00	59.8531	440.77

Фиг. 11В, продолжение


UV_VIS_3WVL - 280 нм
МОНОМЕР - 10,435 мин - 96,65%
Фиг. 11C,
продолжение
HMWS - 8,582 мин - 0,10%
HMWS - 9,256 мин - 2,20%
LMWS - 12,287 мин - 1,02%
LMWS - 12,903 мин - 0,03%
мин
726
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
-7
6.17
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.50
10.00
10.50
11.00
11.50
12.00
12.50
13.00
13.50
14.00
14.50
15.11

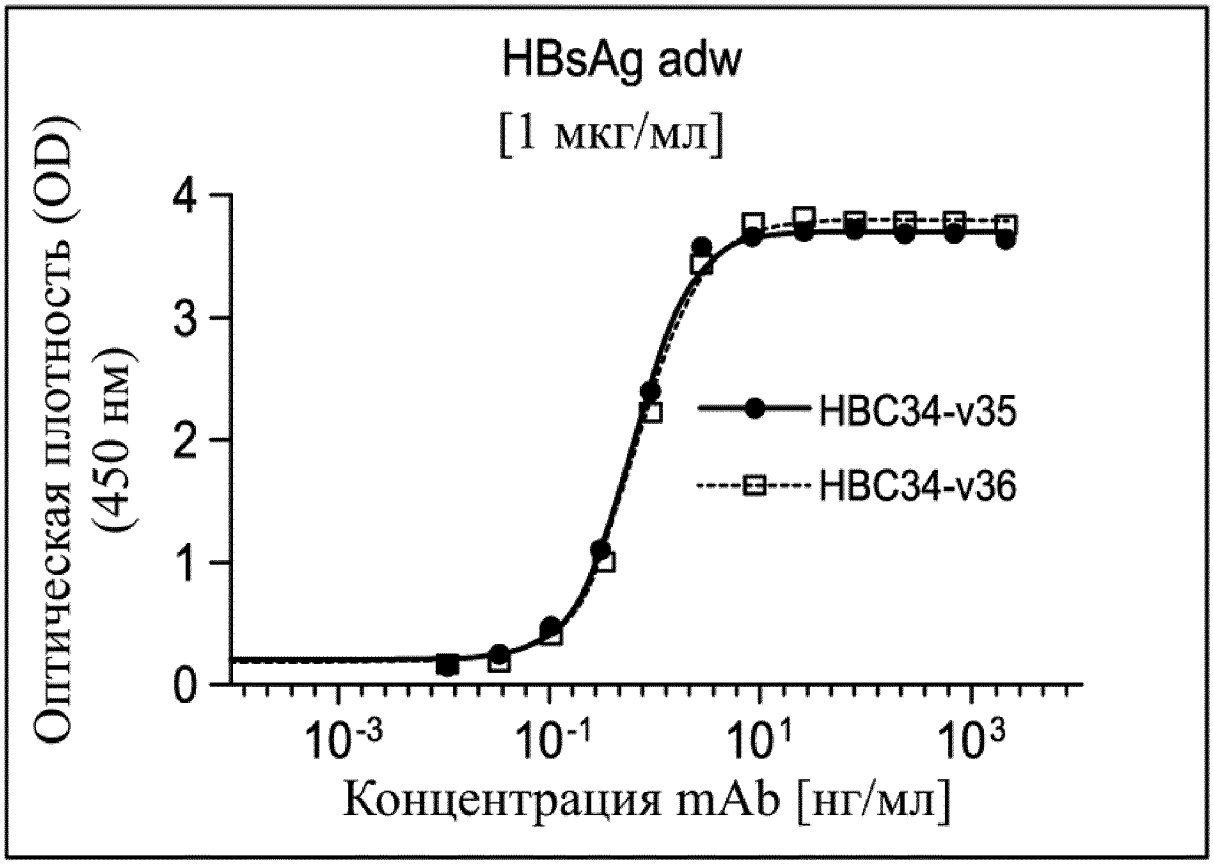
Фиг. 11C



№ пика	Название пика	Время удерживания мин	Количество	Отн. площадь, %	Площадь мЕОП*мин	Высота мЕОП
1	HMWS	8.582	н.д.	0.10	0.0669	0.28
2	HMWS	9.256	н.д.	2.20	1.5096	8.90
3	МОНОМЕР	10.435	н.д.	96.65	66.2118	484.46
4	LMWS	12.289	н.д.	1.02	0.6982	4.61
5	LMWS	12.903	н.д.	0.03	0.0196	0.17
Максимум			0.0000	96.65	66.2118	484.46
Минимум			0.0000	0.03	0.0196	0.17
Сумма			0.0000	100.00	68.5063	498.42

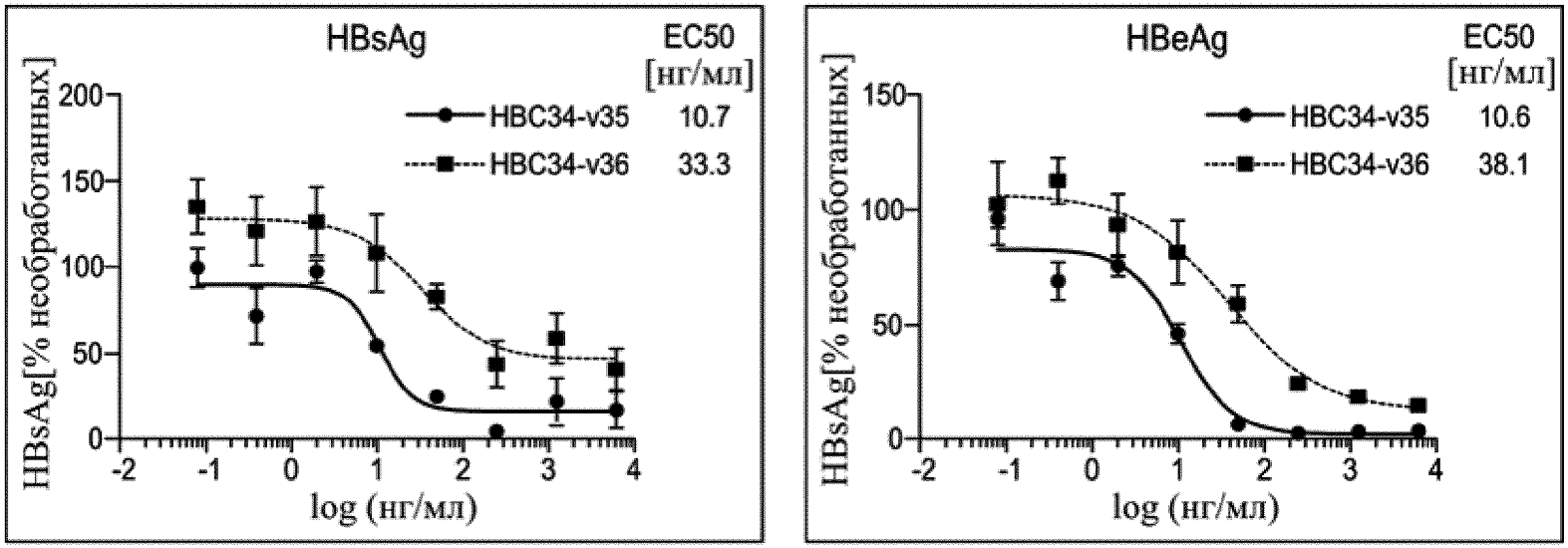
Фиг. 11С, продолжение

Связывание

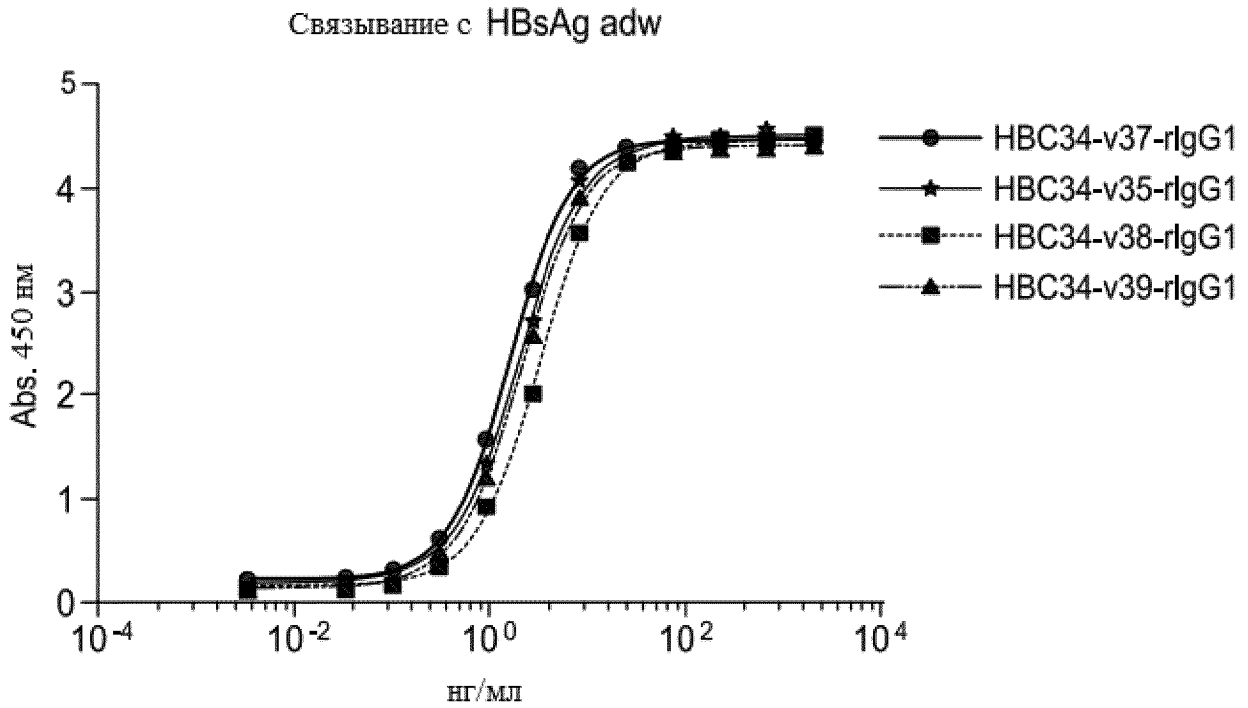


Фиг. 12

Нейтрализация

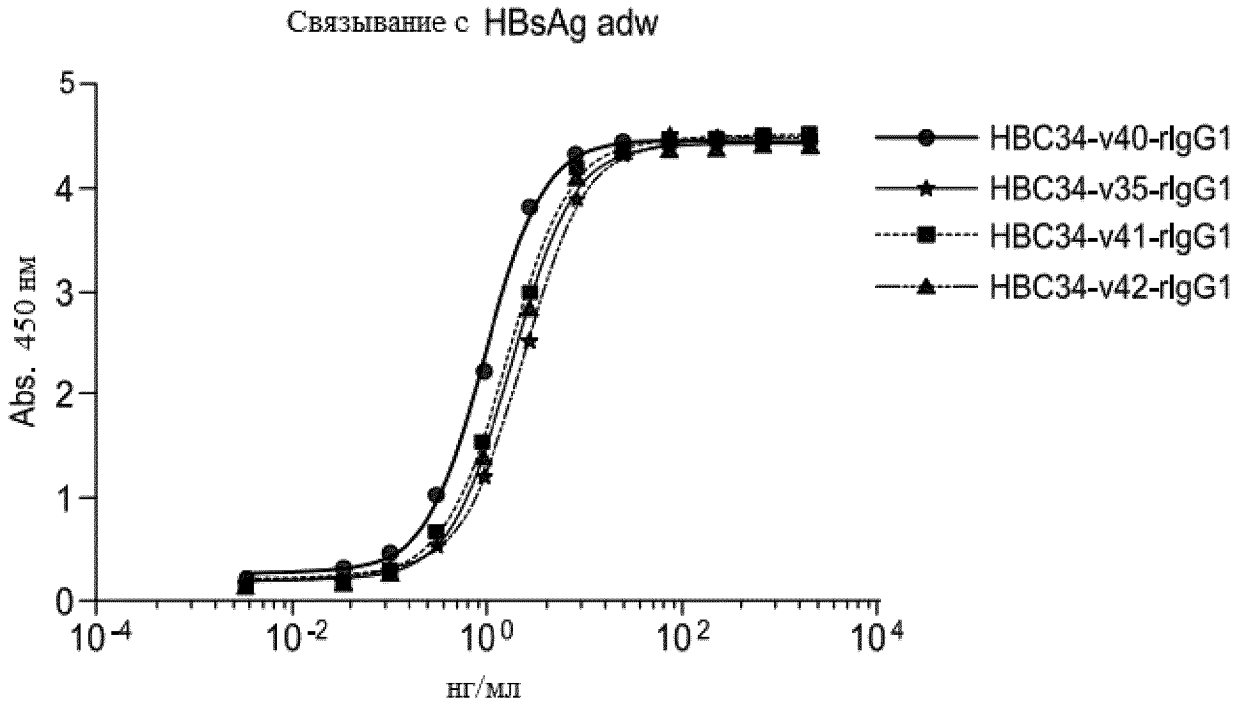


Фиг. 13



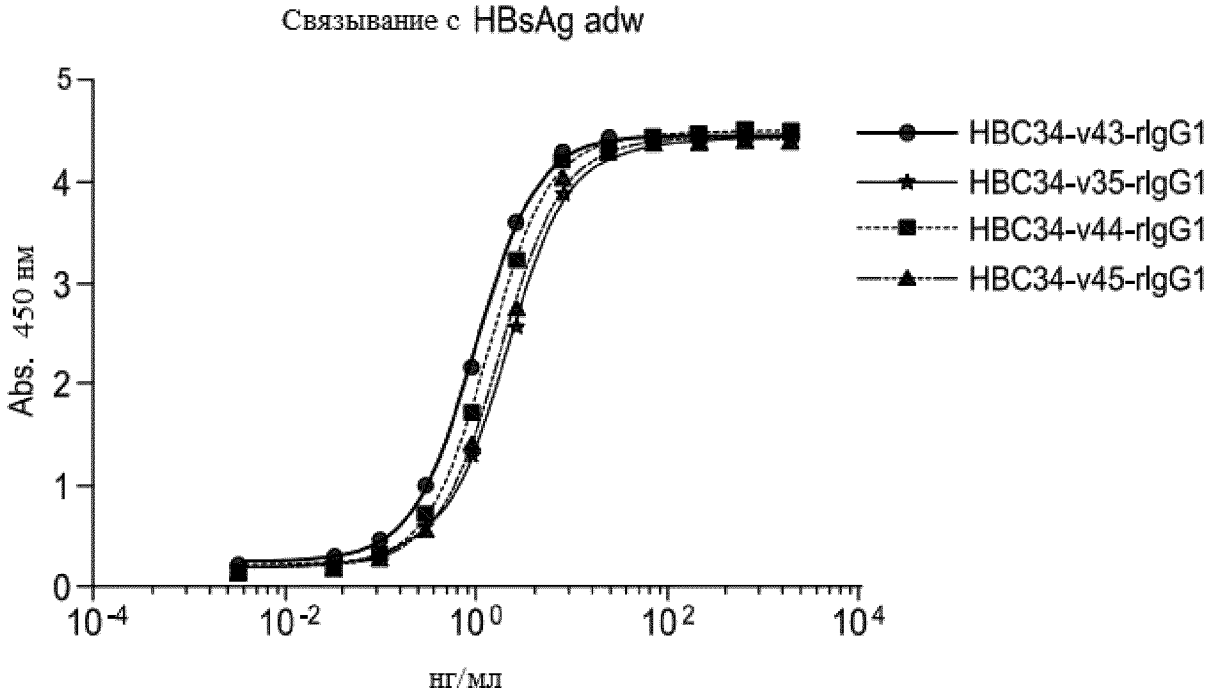
	EC50
HBC34-v37-rIgG1	1.607
HBC34-v38-rIgG1	3.213
HBC34-v39-rIgG1	2.112
HBC34-v35-rIgG1	2.015

Фиг. 14А



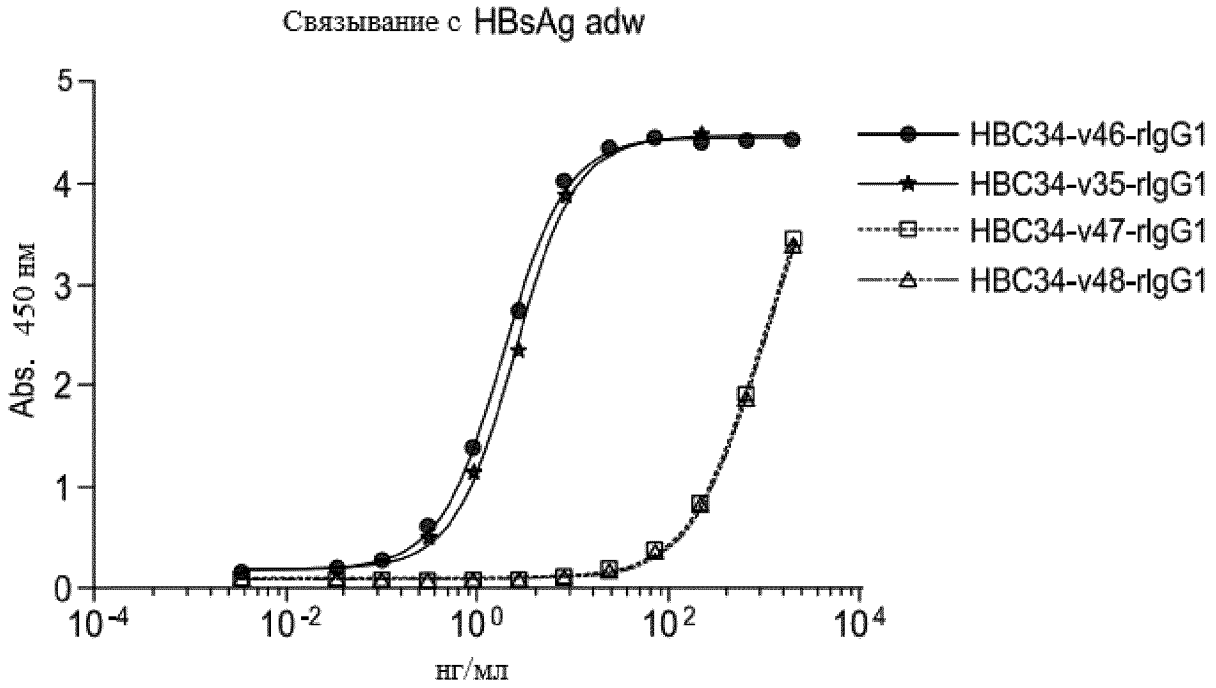
	EC50
HBC34-v40-rIgG1	0.9483
HBC34-v41-rIgG1	1.654
HBC34-v42-rIgG1	1.797
HBC34-v35-rIgG1	2.345

Фиг. 14B



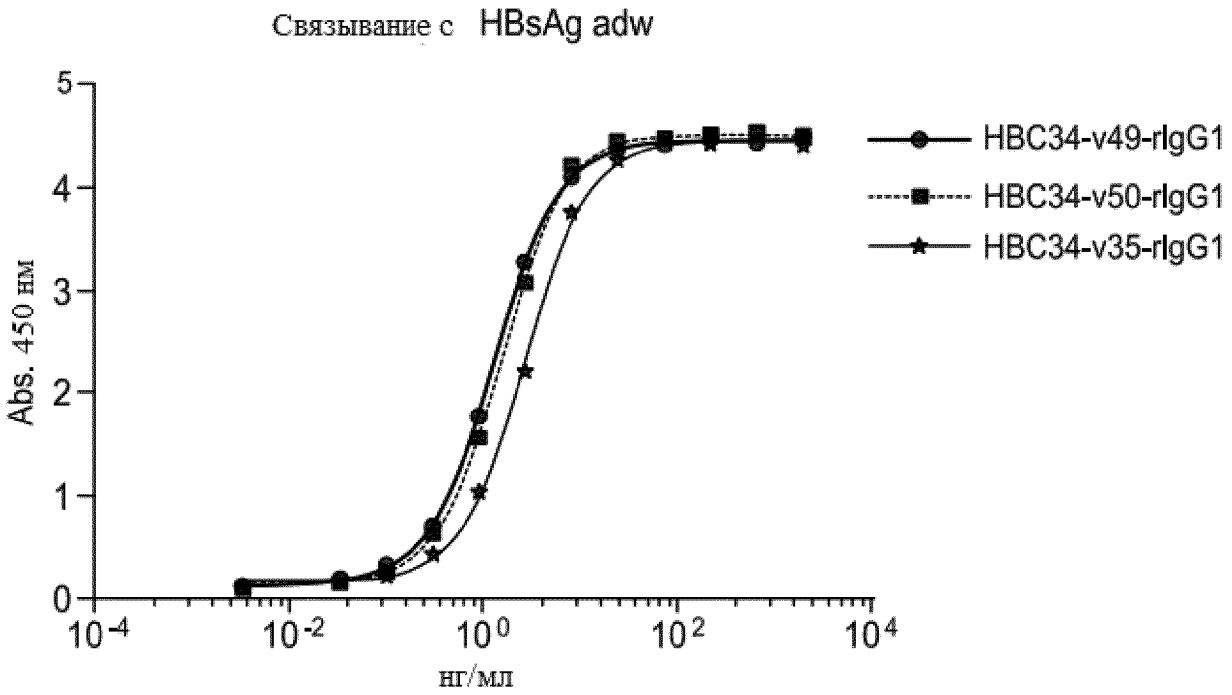
	EC50
HBC34-v43-rIgG1	1.007
HBC34-v44-rIgG1	1.402
HBC34-v45-rIgG1	1.849
HBC34-v35-rIgG1	2.151

Фиг. 14C



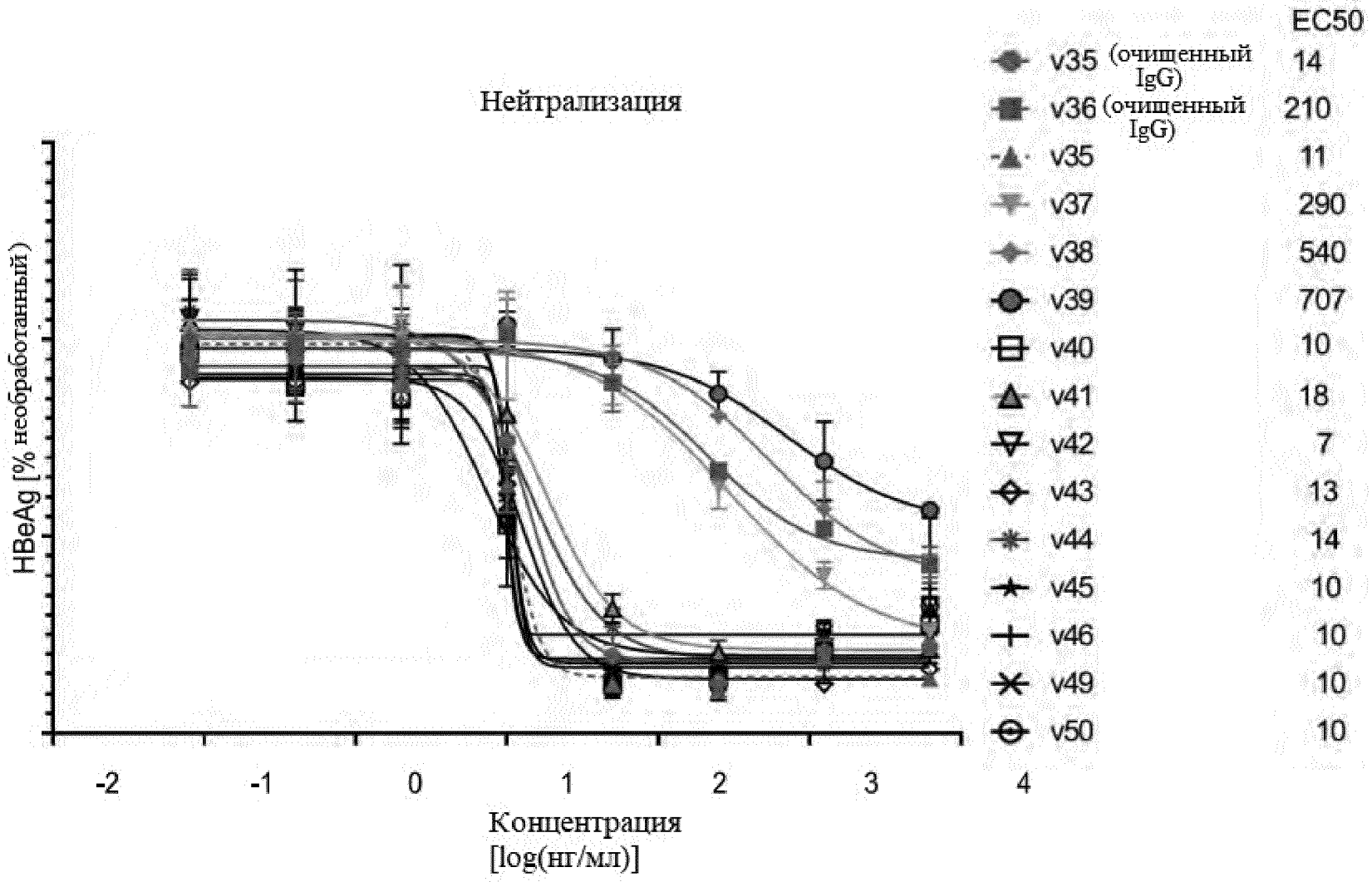
	EC50
HBC34-v46-rIgG1	1.901
HBC34-v47-rIgG1	837.5
HBC34-v48-rIgG1	858.6
HBC34-v35-rIgG1	2.487

Фиг. 14D

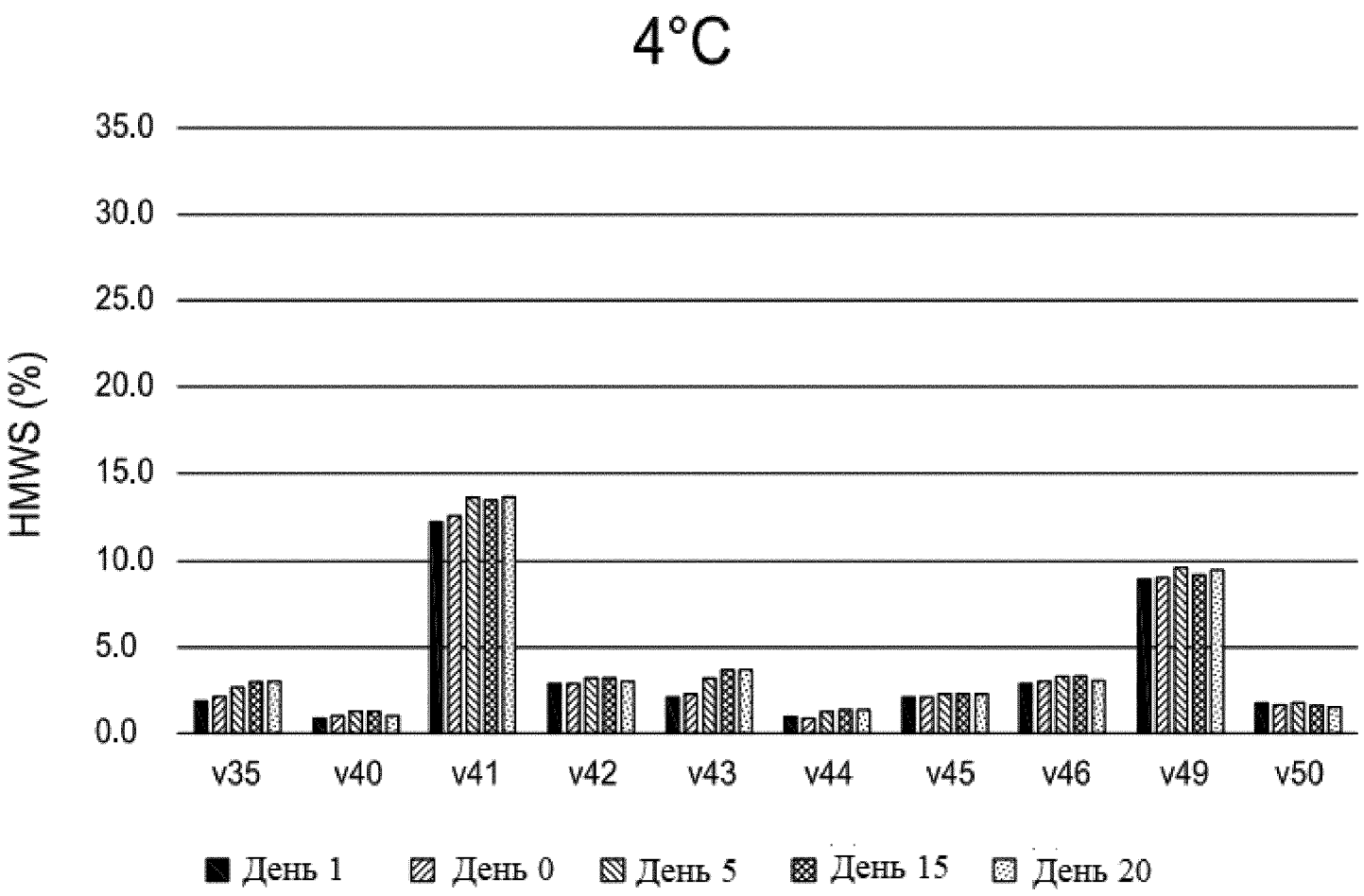


	EC50
HBC34-v49-rIgG1	1.317
HBC34-v50-rIgG1	1.560
HBC34-v35-rIgG1	2.737

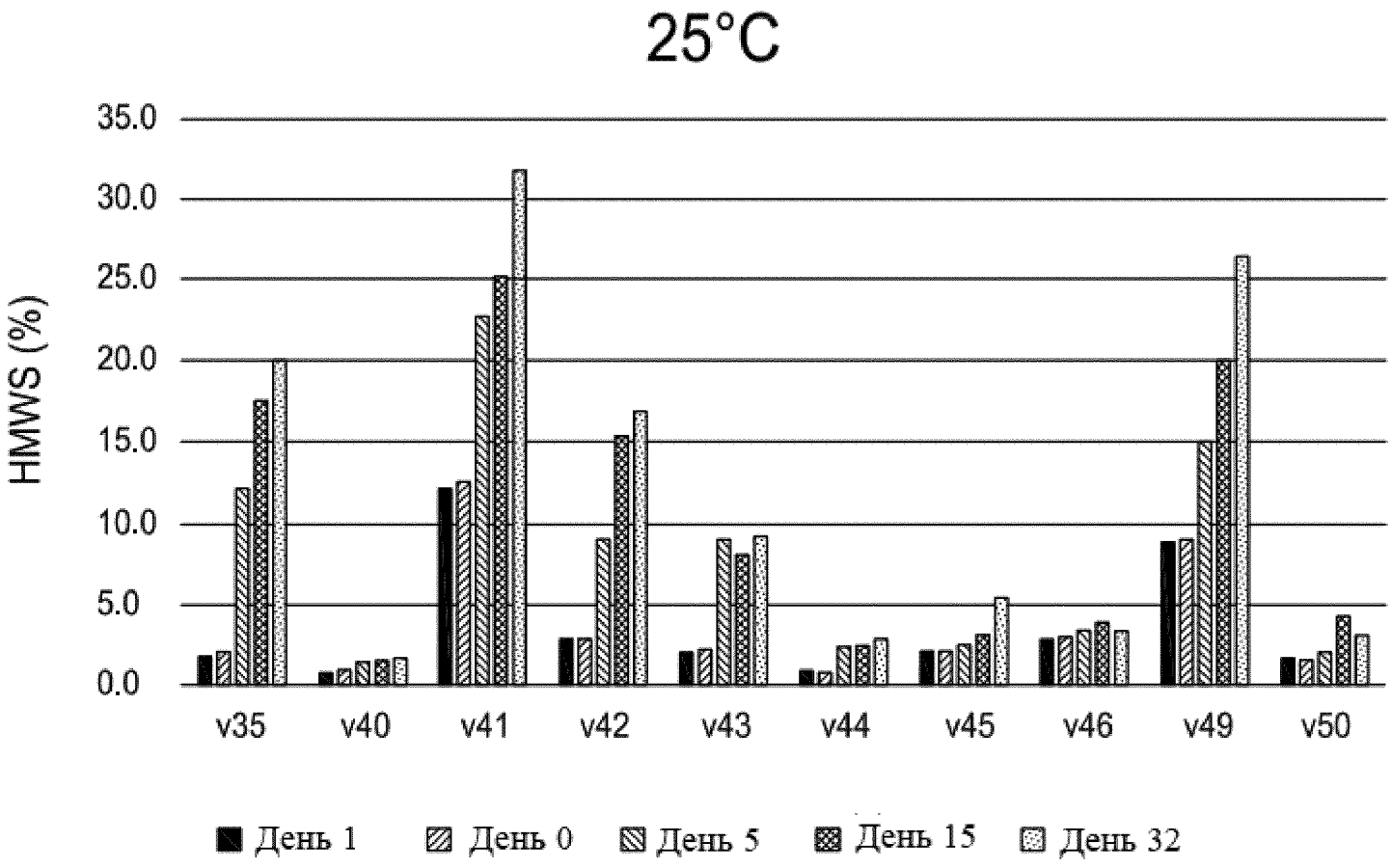
Фиг. 14E


Нейтрализация
HBeAg [% необработанный]
-2
-1
0
1
2
3
4
Концентрация
[log(нг/мл)]
EC50
v35 (очищенный IgG) 14
v36 (очищенный IgG) 210
v35 11
v37 290
v38 540
v39 707
v40 10
v41 18
v42 7
v43 13
v44 14
v45 10
v46 10
v49 10
v50 10

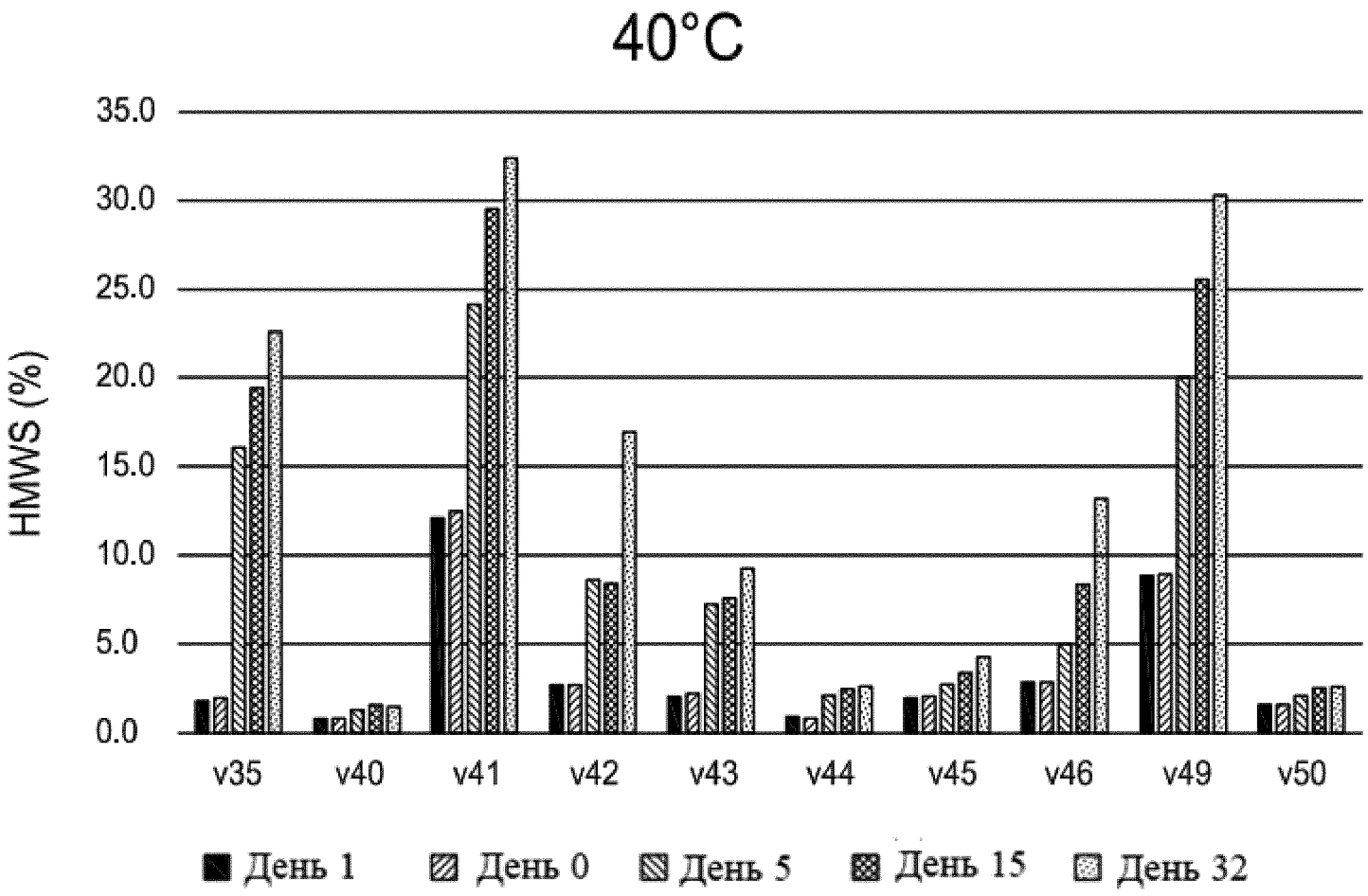
Фиг. 15


4°C
HMWS (%)
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
v35
v40
v41
v42
v43
v44
v45
v46
v49
v50
День 1
День 0
День 5
День 15
День 20

Фиг. 16A


25°C
HMWS (%)
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
v35
v40
v41
v42
v43
v44
v45
v46
v49
v50
День 1
День 0
День 5
День 15
День 32

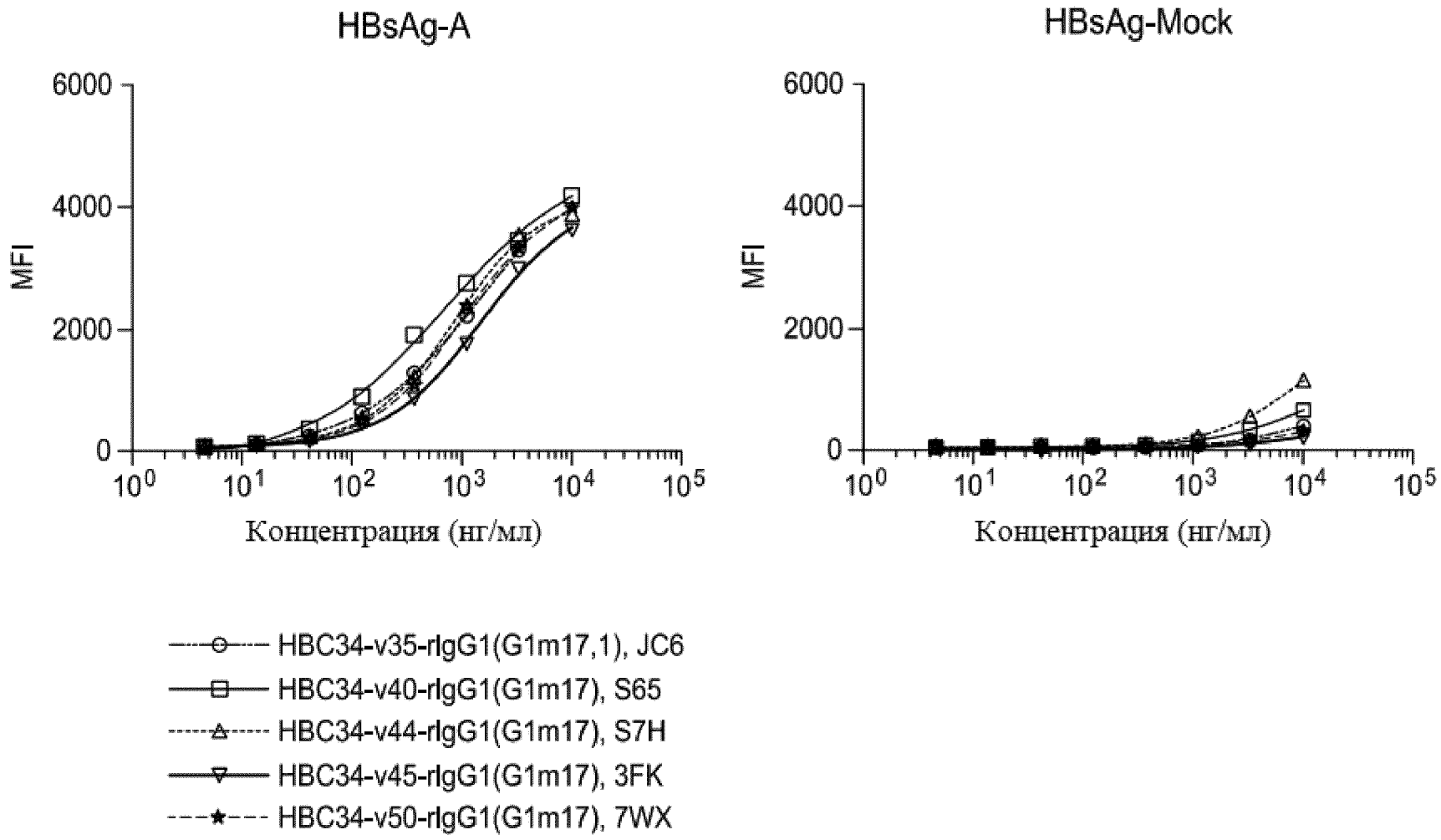
Фиг. 16B


40°C
HMWS (%)
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
v35
v40
v41
v42
v43
v44
v45
v46
v49
v50
День 1
День 0
День 5
День 15
День 32

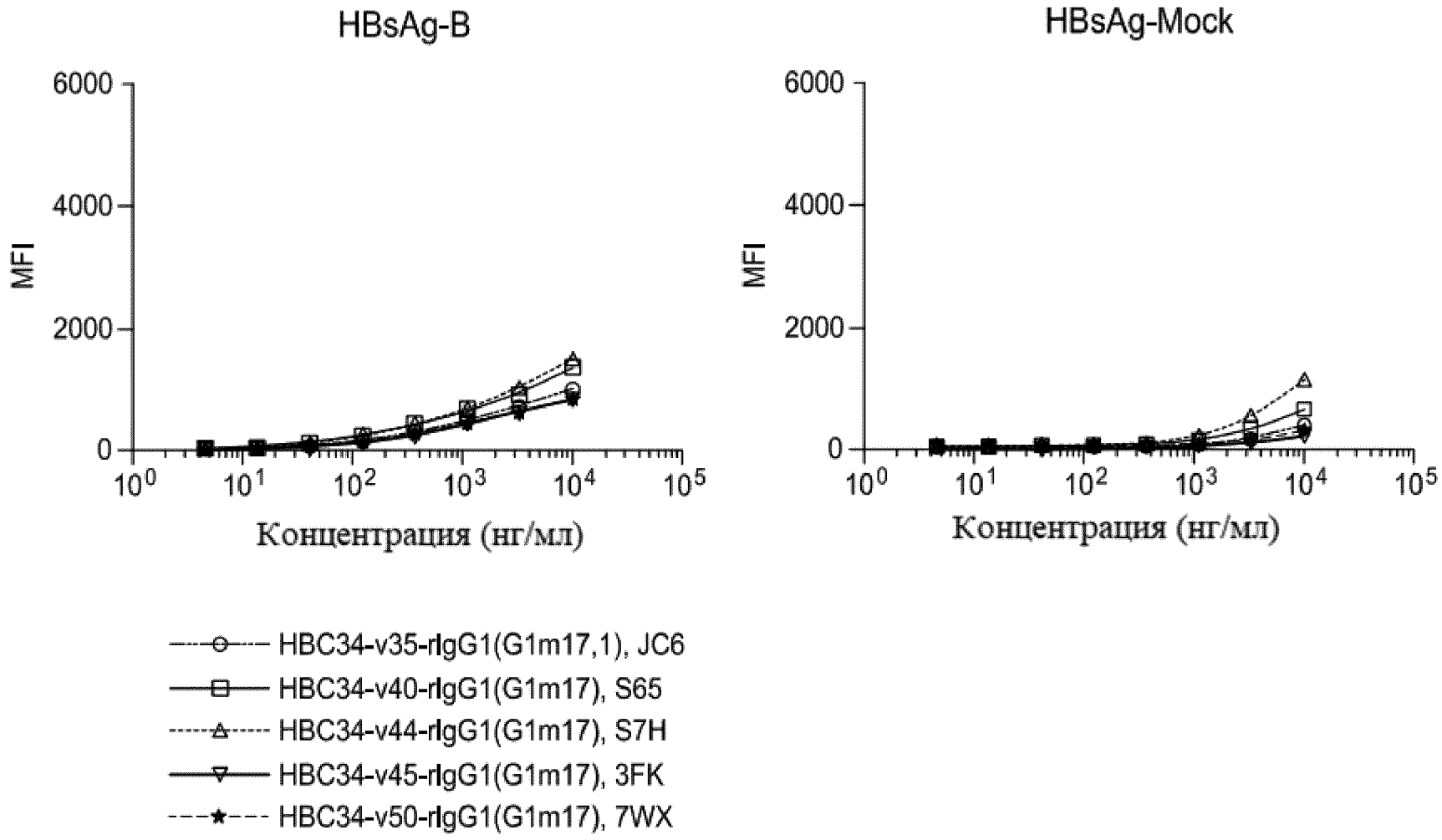
Фиг. 16C

	V35 (WT)	V40	V41	V42	V43	V44	V45	V46	V49	V50
HMWS(%) 40C_день32	22.7	1.6	32.4	17.1	9.3	2.7	4.4	23.4	30.4	2.7

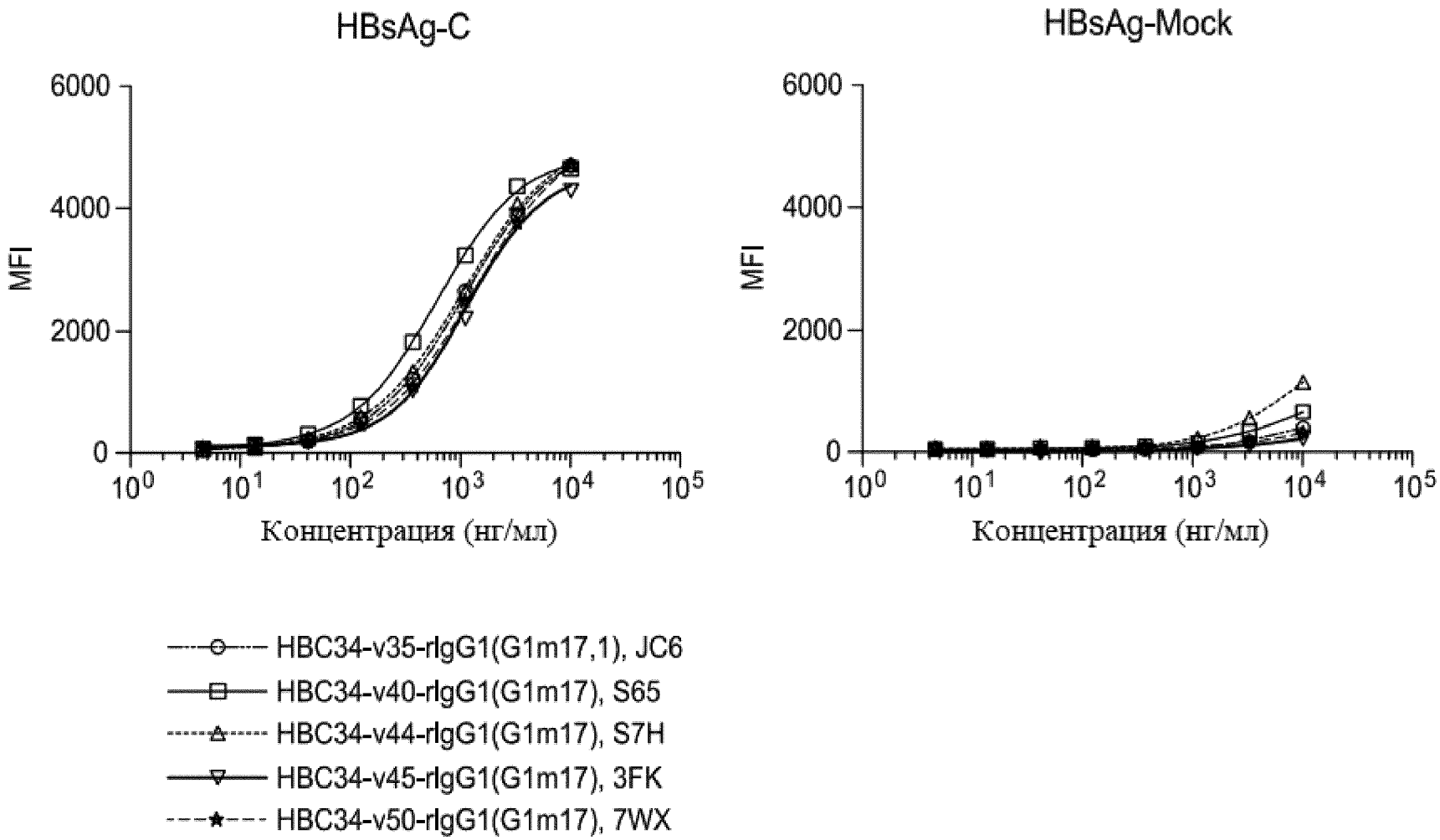
Фиг. 16D


HBsAg-A
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

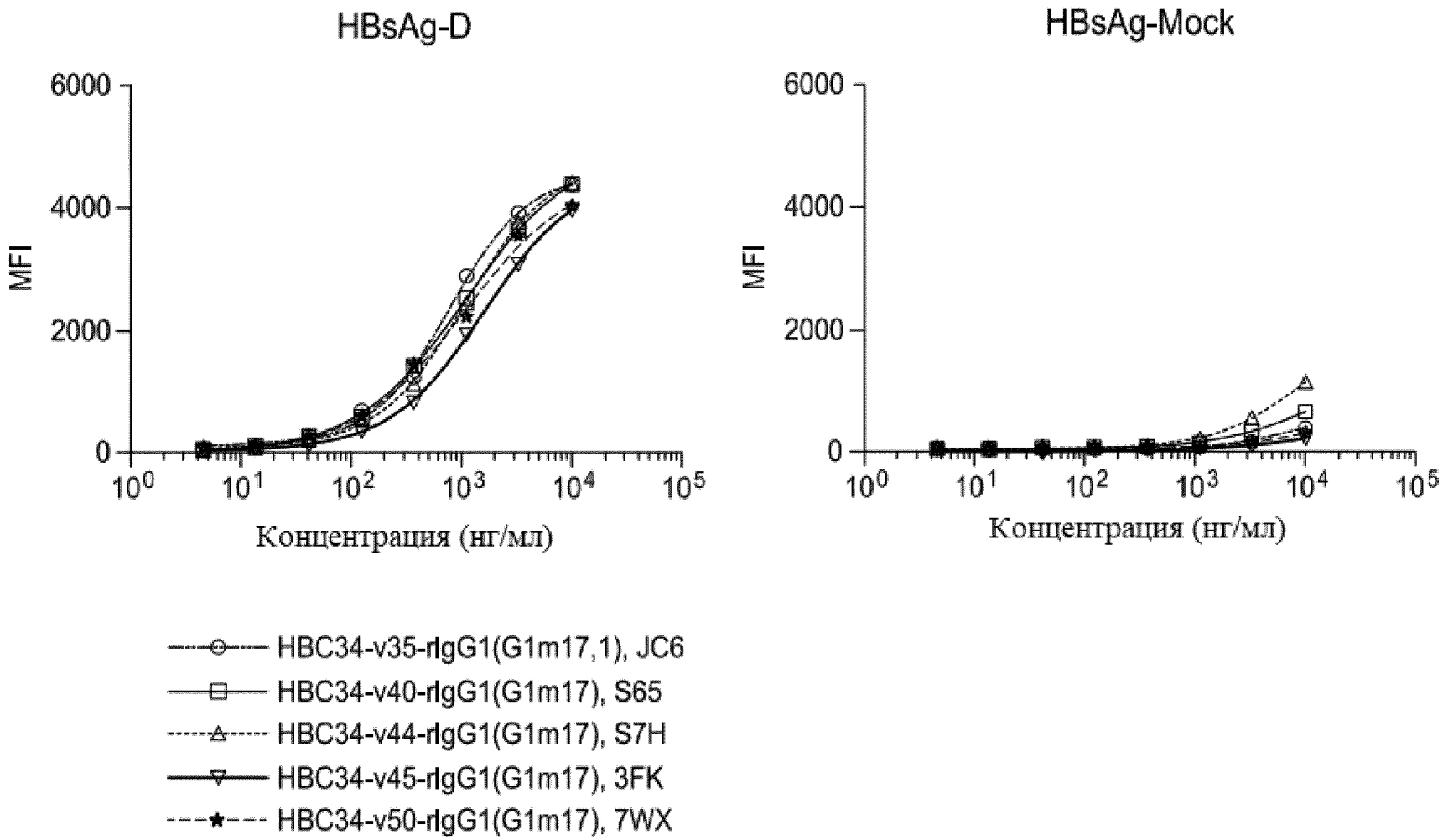
Фиг. 17A


HBsAg-B
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

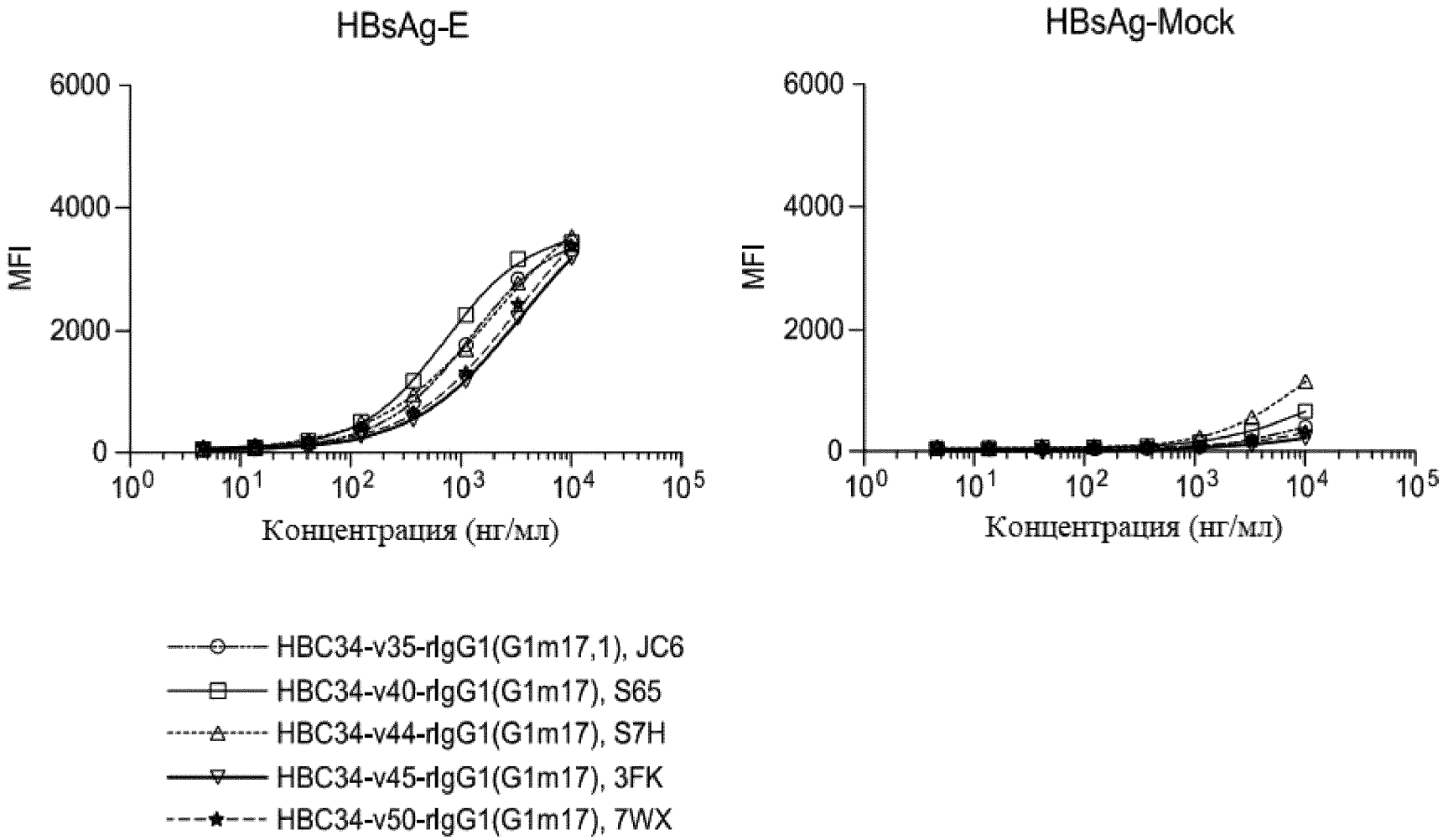
Фиг. 17B


HBsAg-C
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

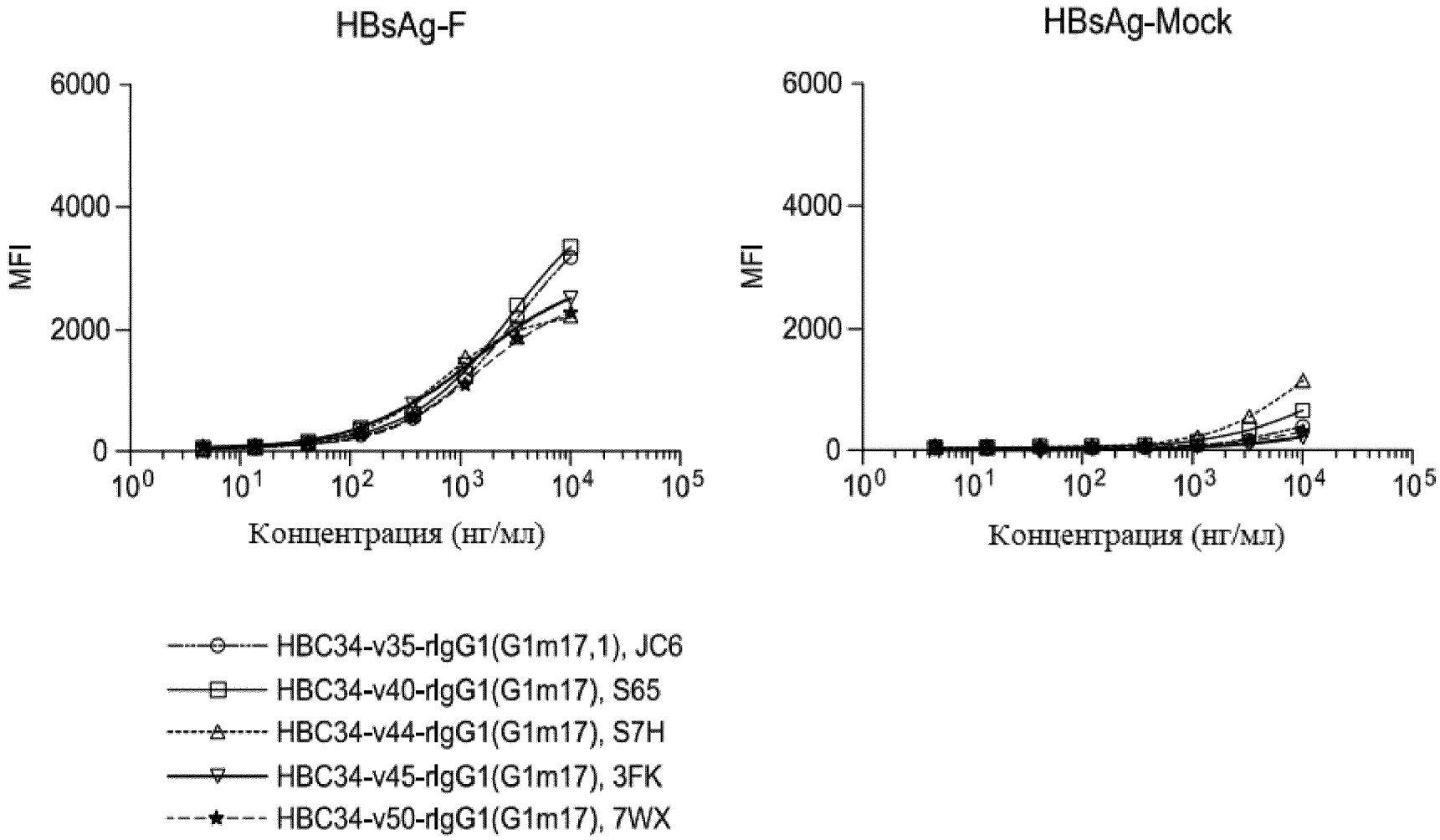
Фиг. 17C


HBsAg-D
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

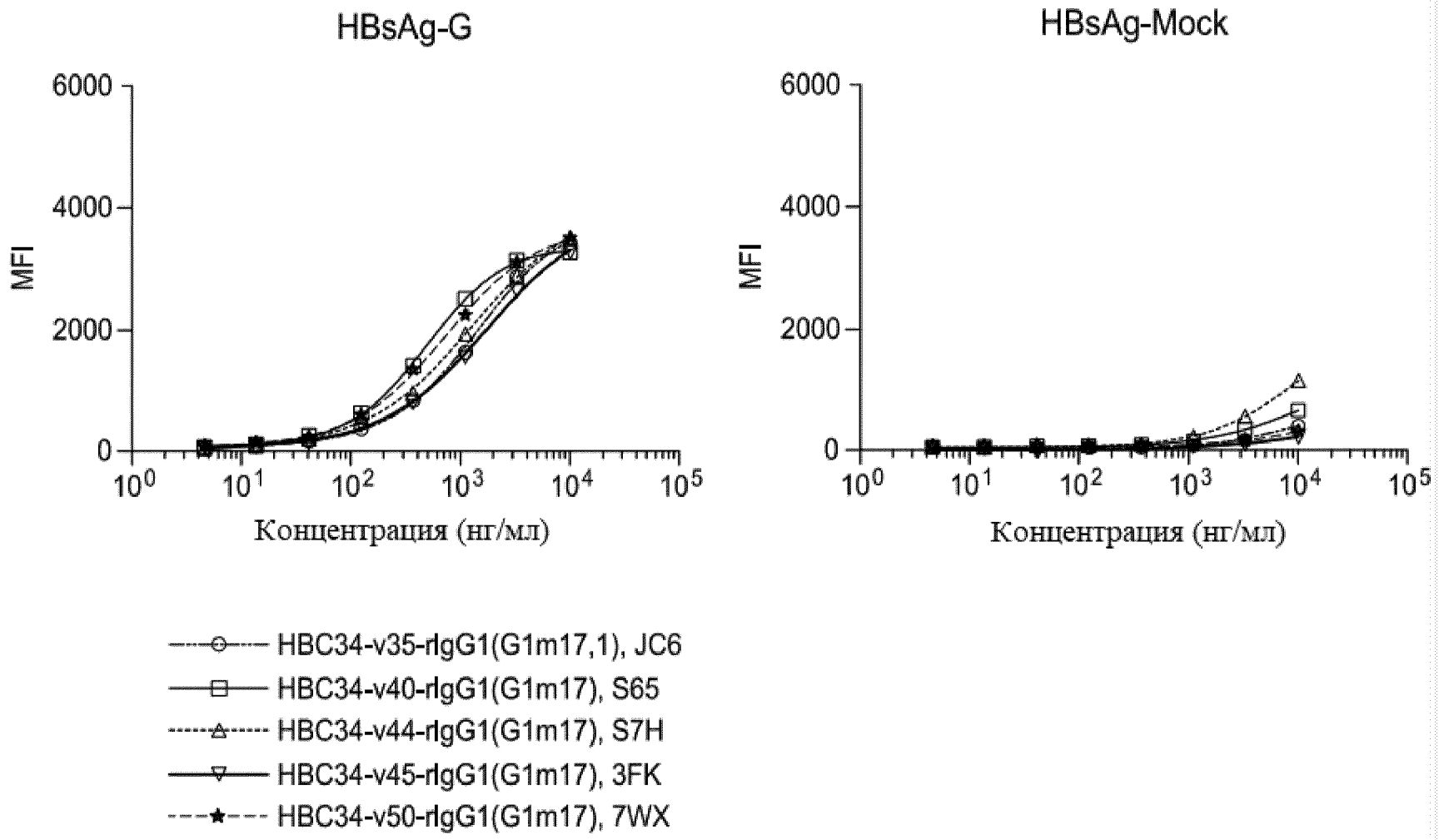
Фиг. 17D


HBsAg-E
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

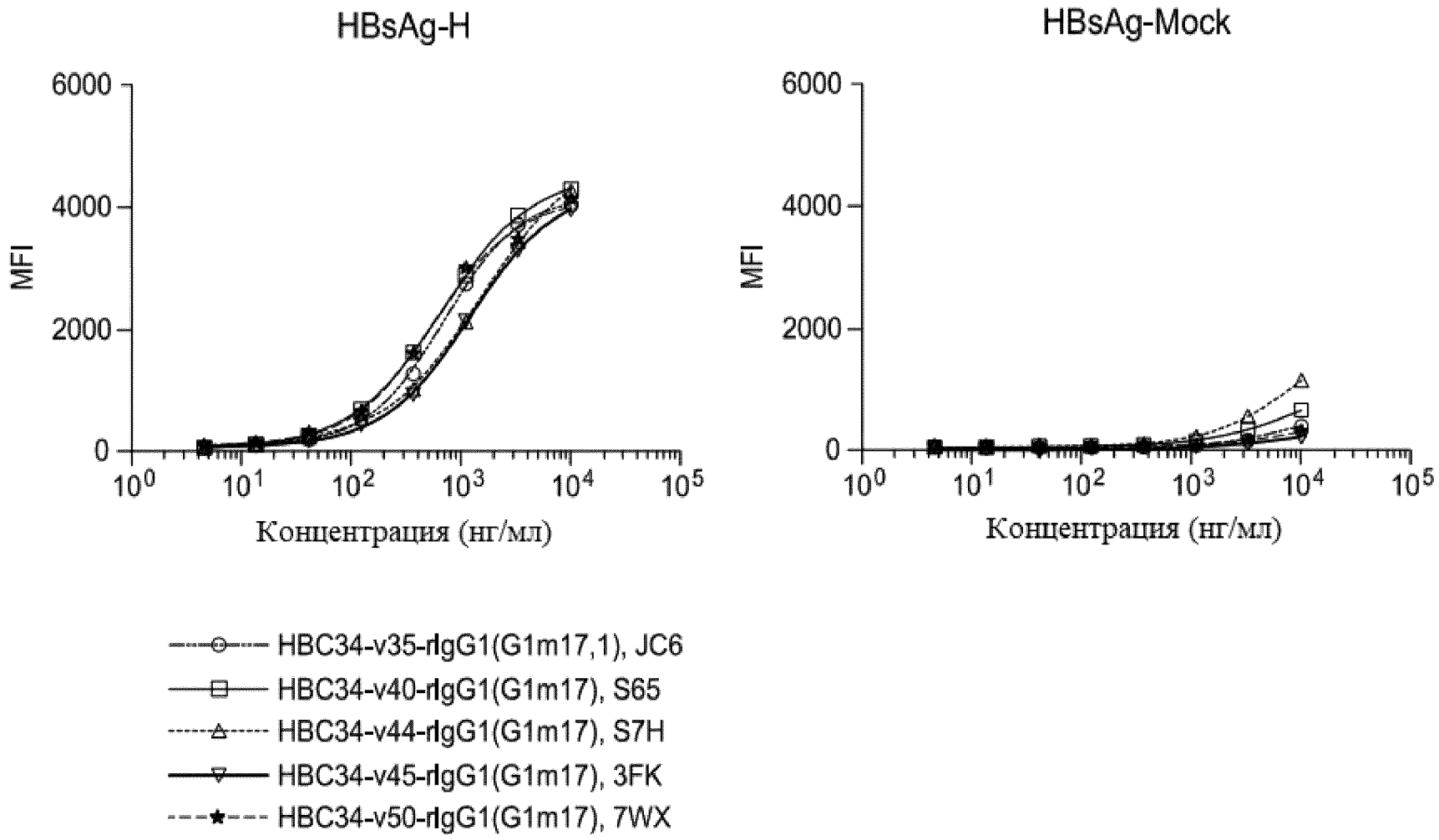
Фиг. 17E


HBsAg-F
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

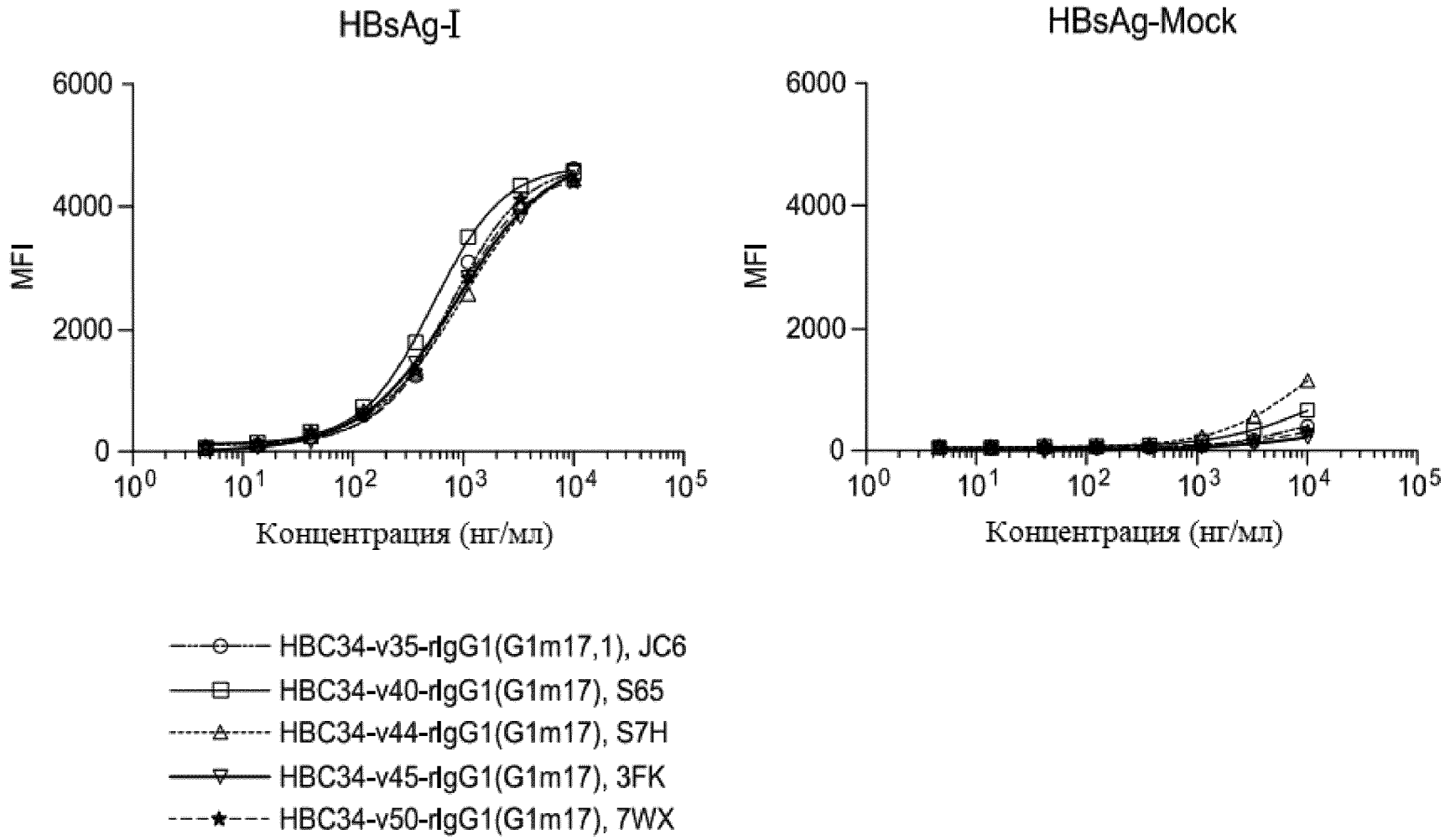
Фиг. 17F


HBsAg-G
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

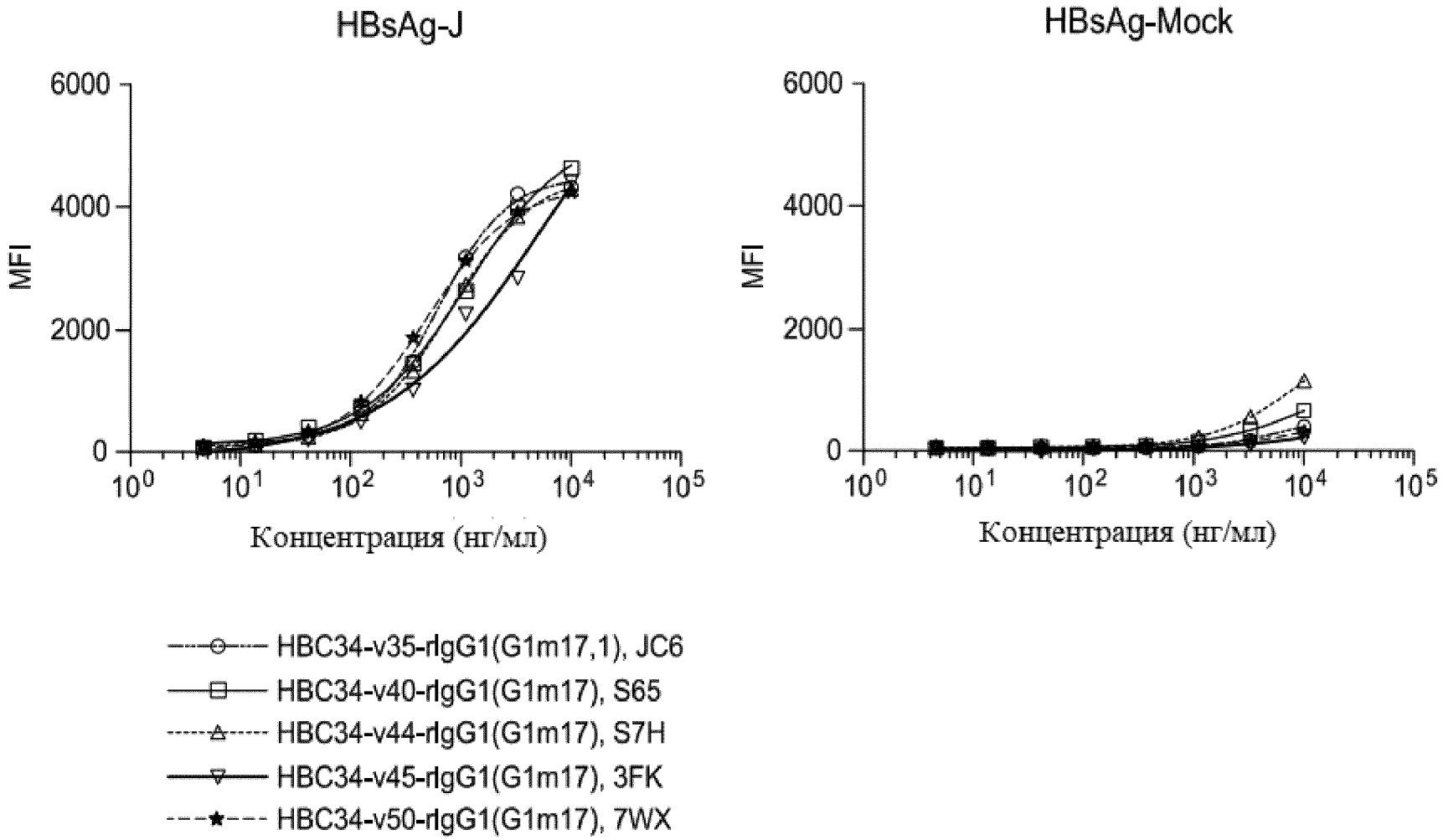
Фиг. 17G


HBsAg-H
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

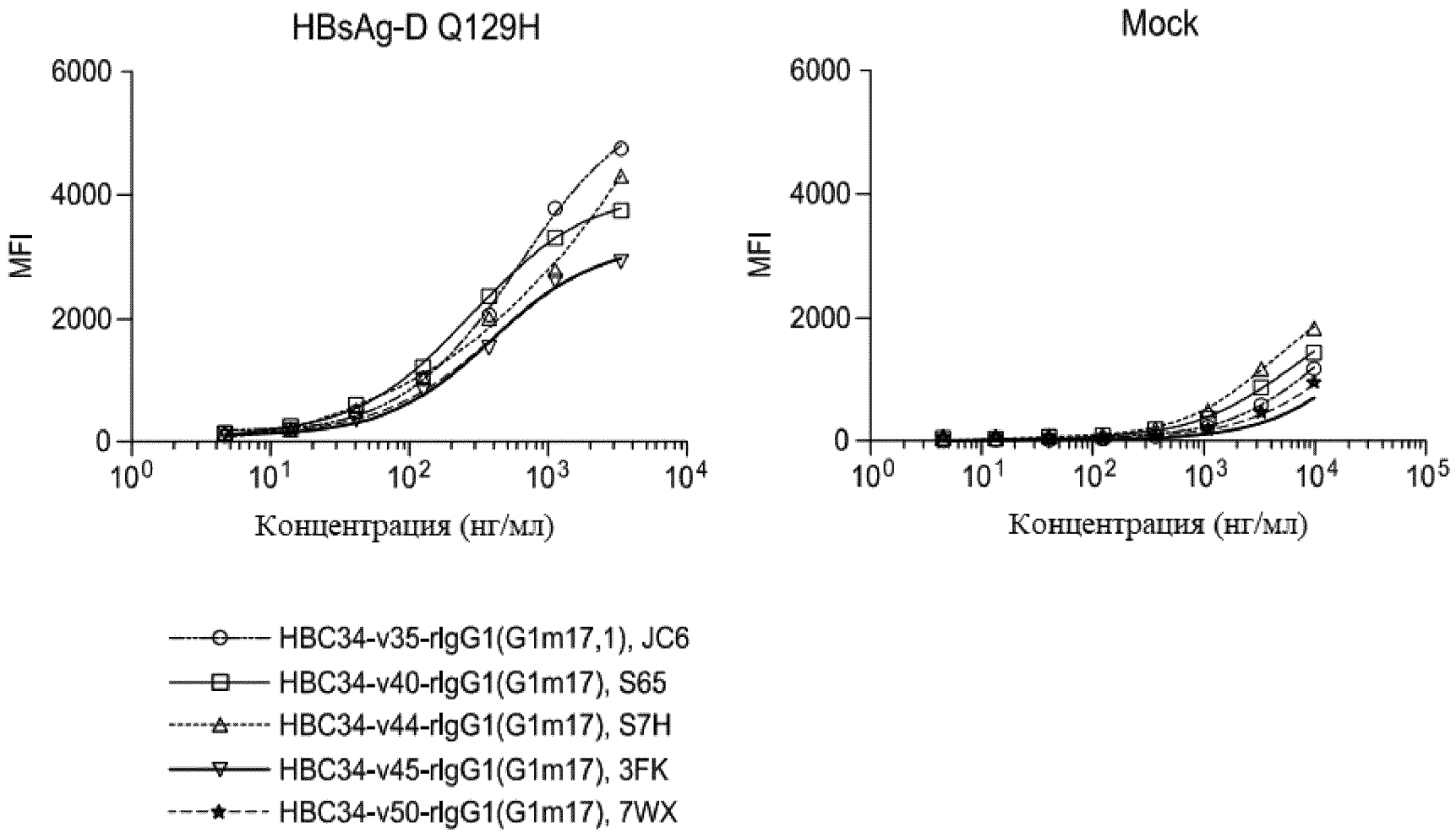
Фиг. 17H


HBsAg-I
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

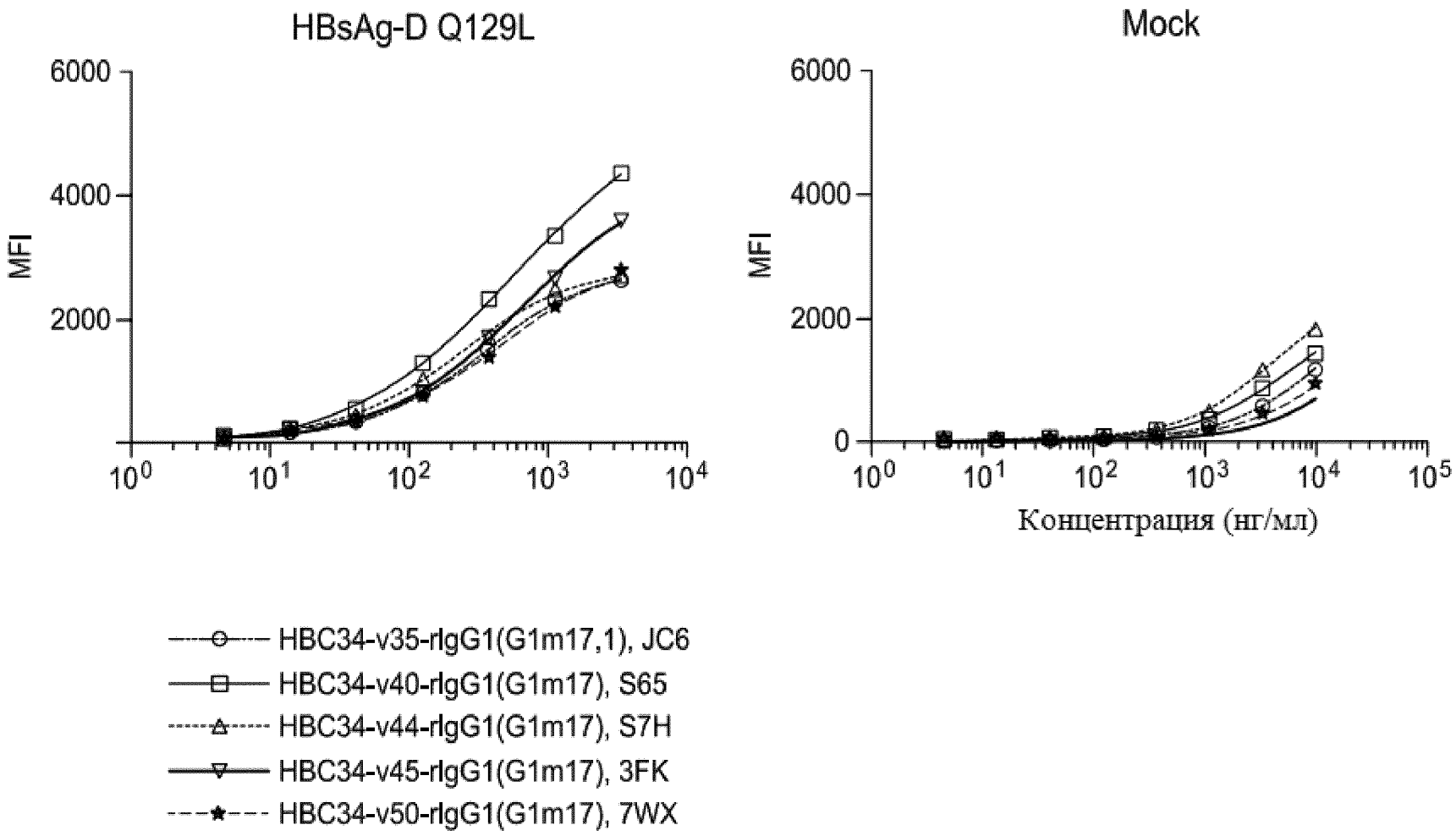
Фиг. 17I


HBsAg-J
HBsAg-Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

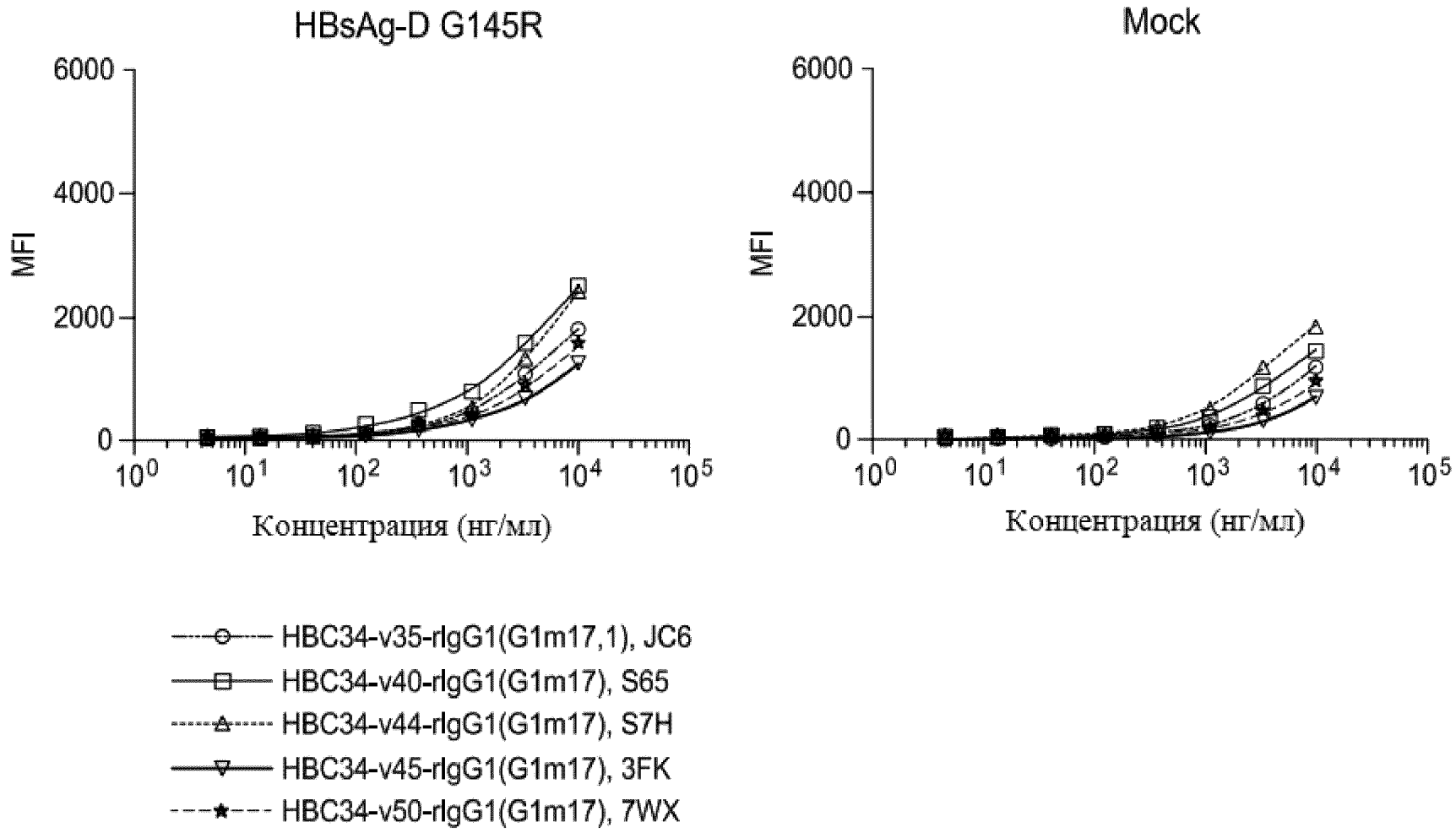
Фиг. 17J


HBsAg-D Q129H
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

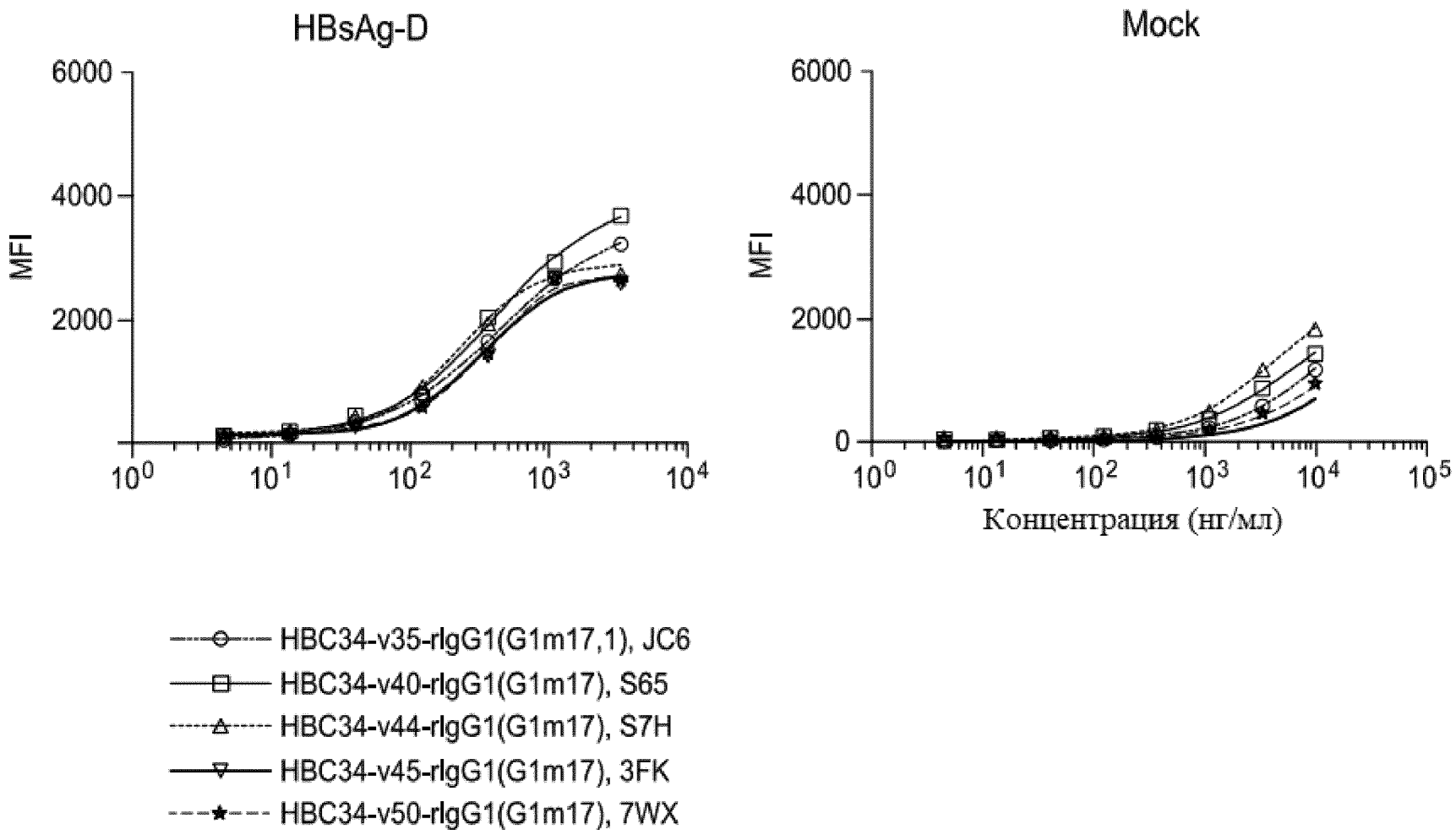
Фиг. 18A


HBsAg-D Q129L
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

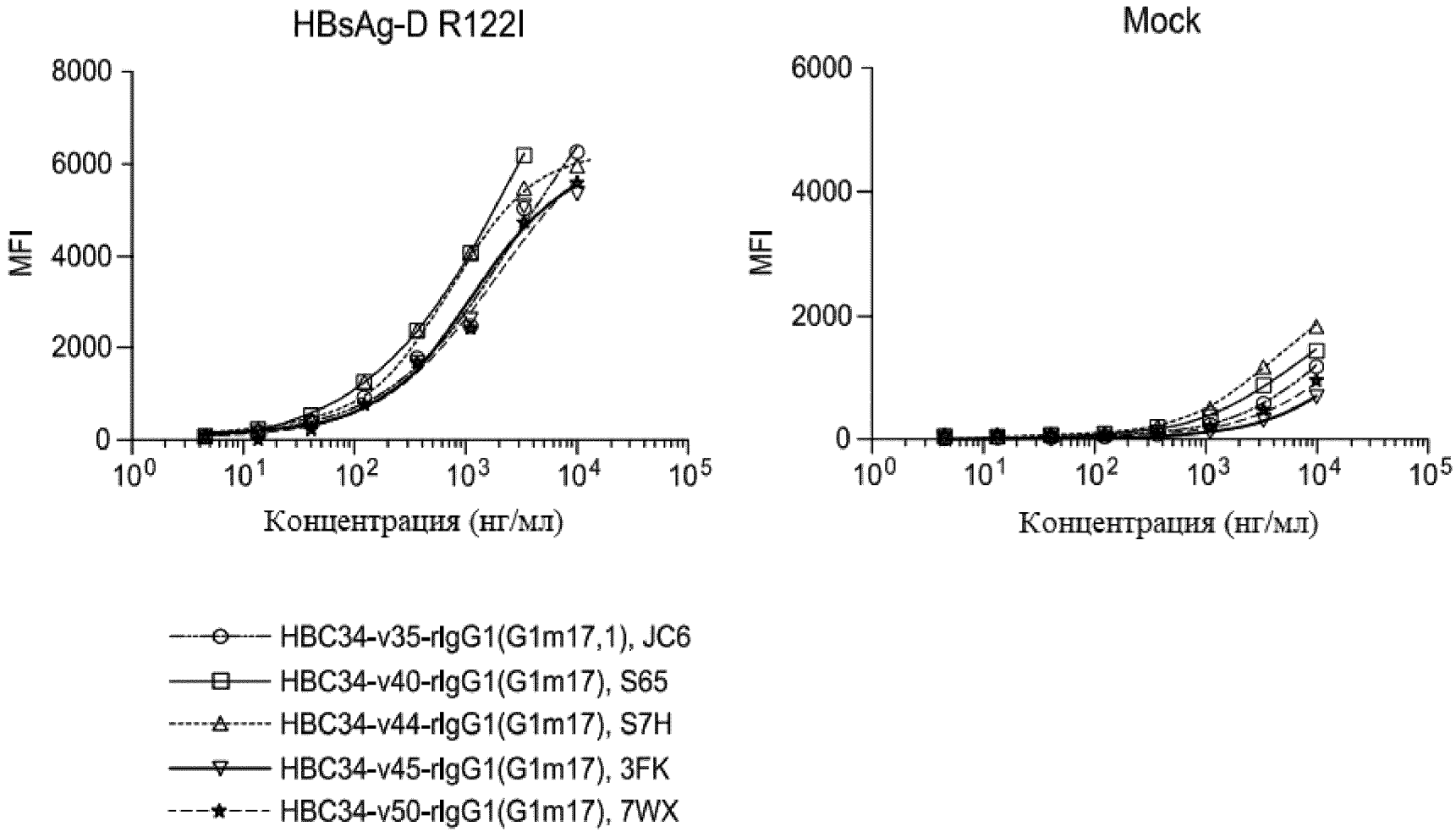
Фиг. 18B


HBsAg-D G145R
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

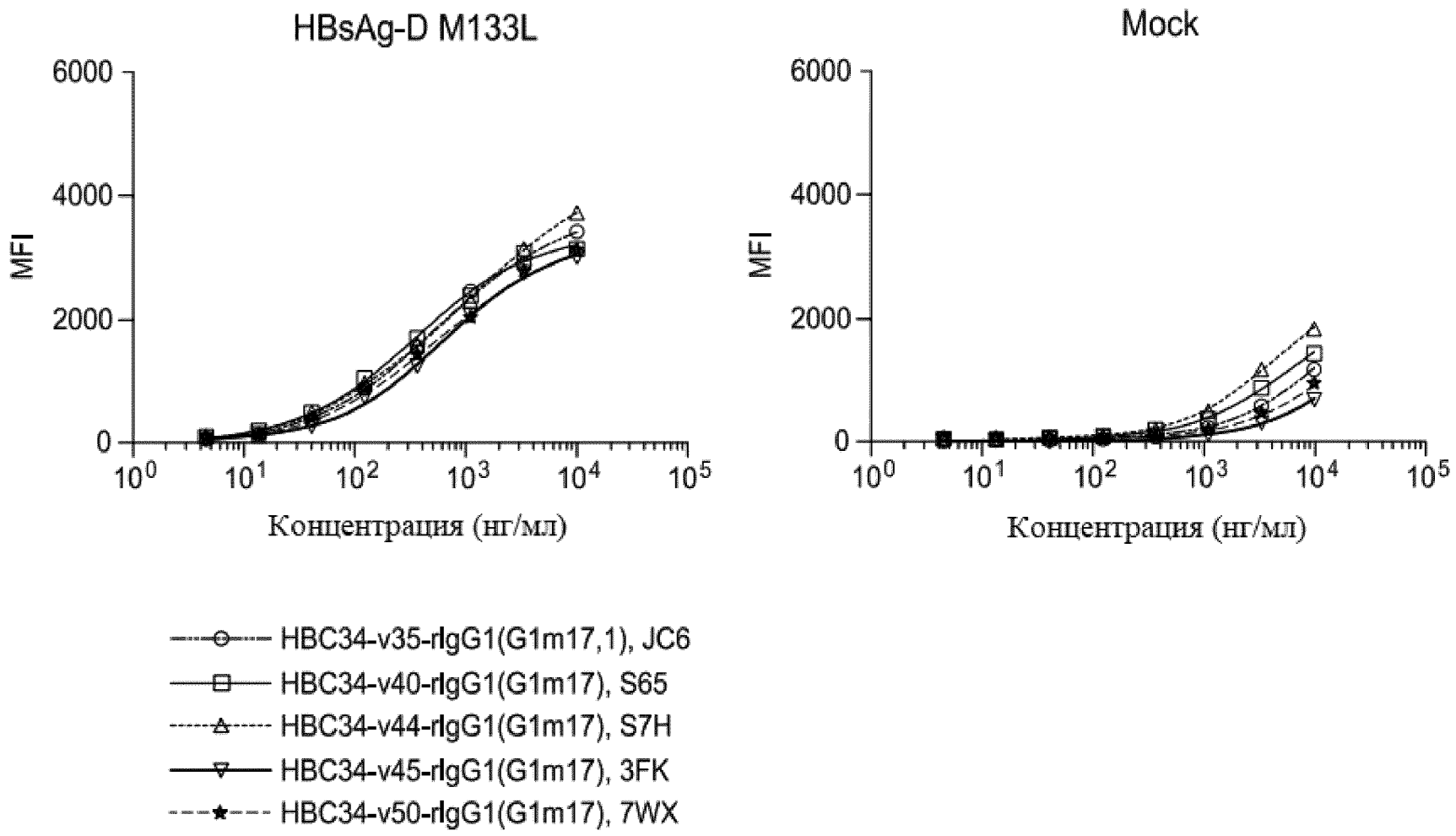
Фиг. 18C


HBsAg-D
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

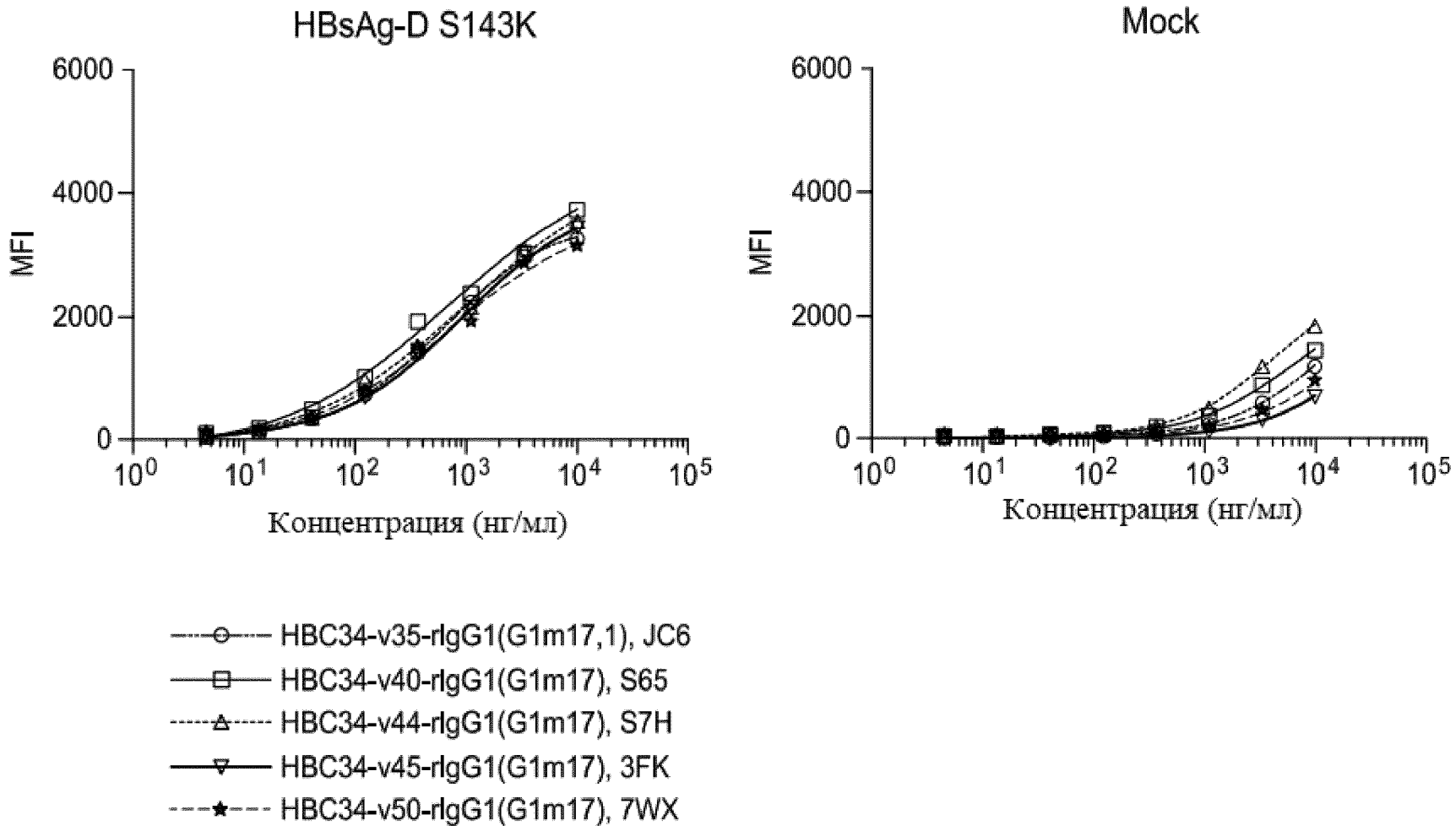
Фиг. 18D


HBsAg-D R122I
Mock
MFI
8000
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

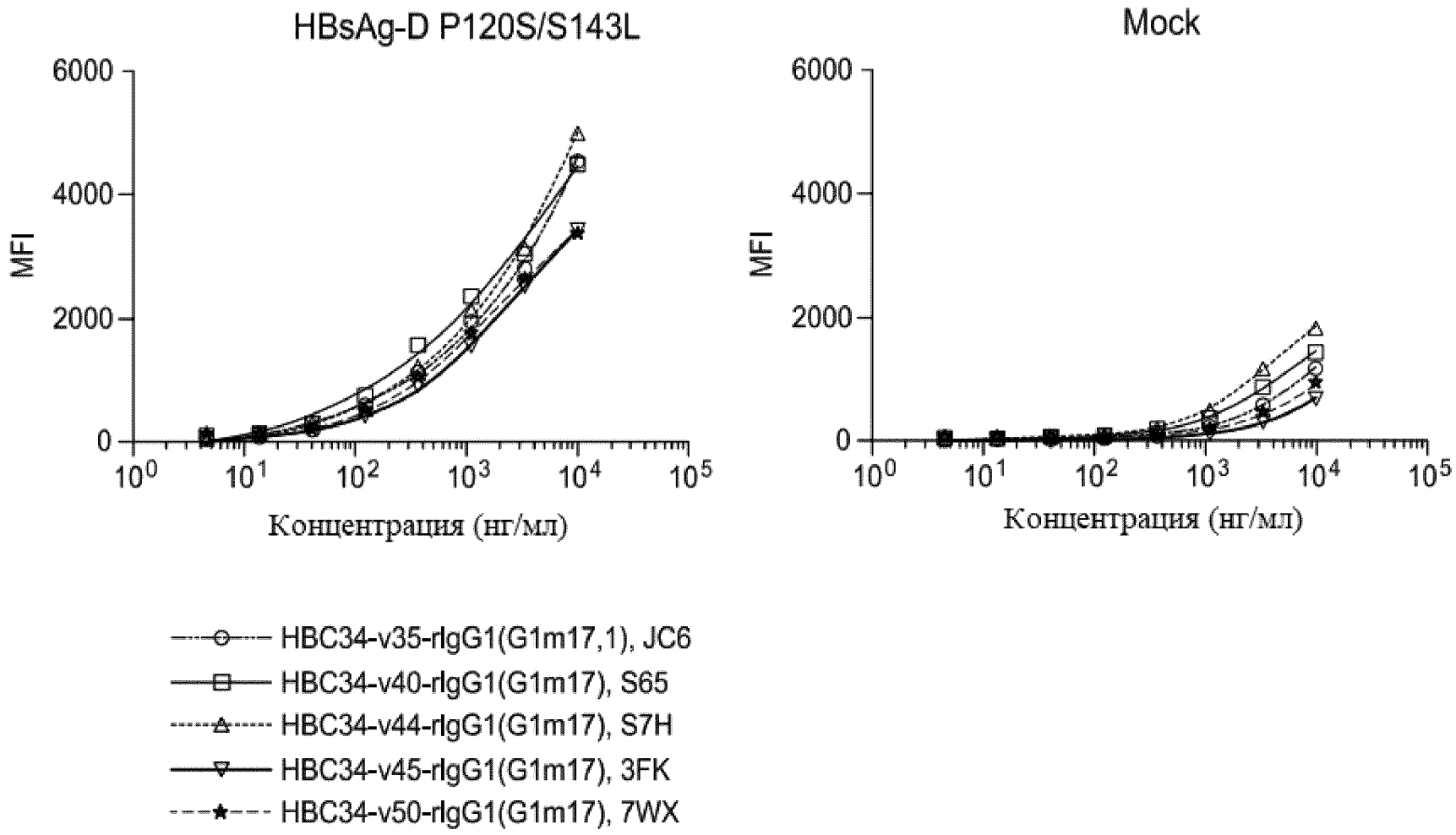
Фиг. 18E


HBsAg-D M133L
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

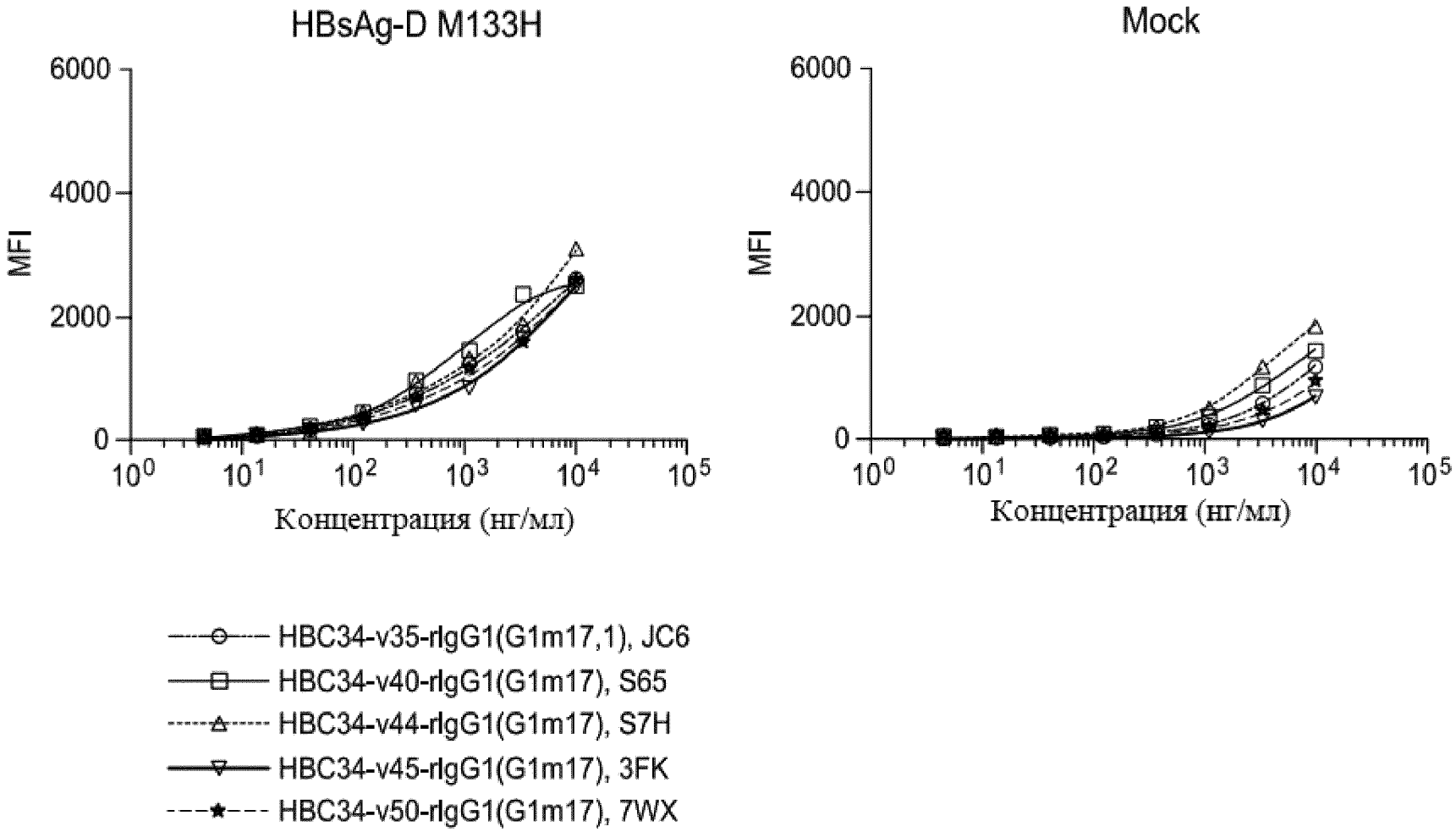
Фиг. 18F


HBsAg-D S143K
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

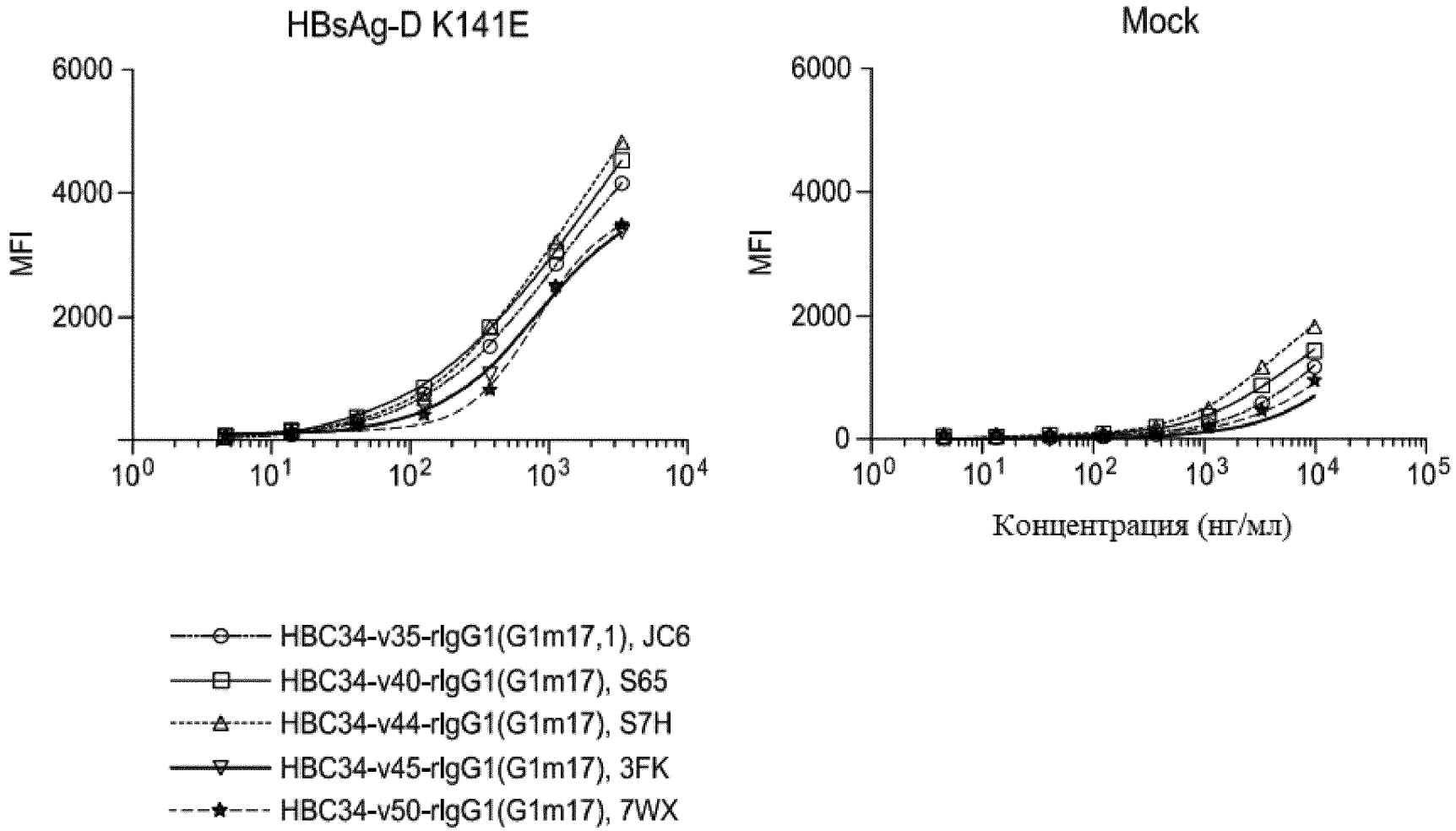
Фиг. 18G


HBsAg-D P120S/S143L
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

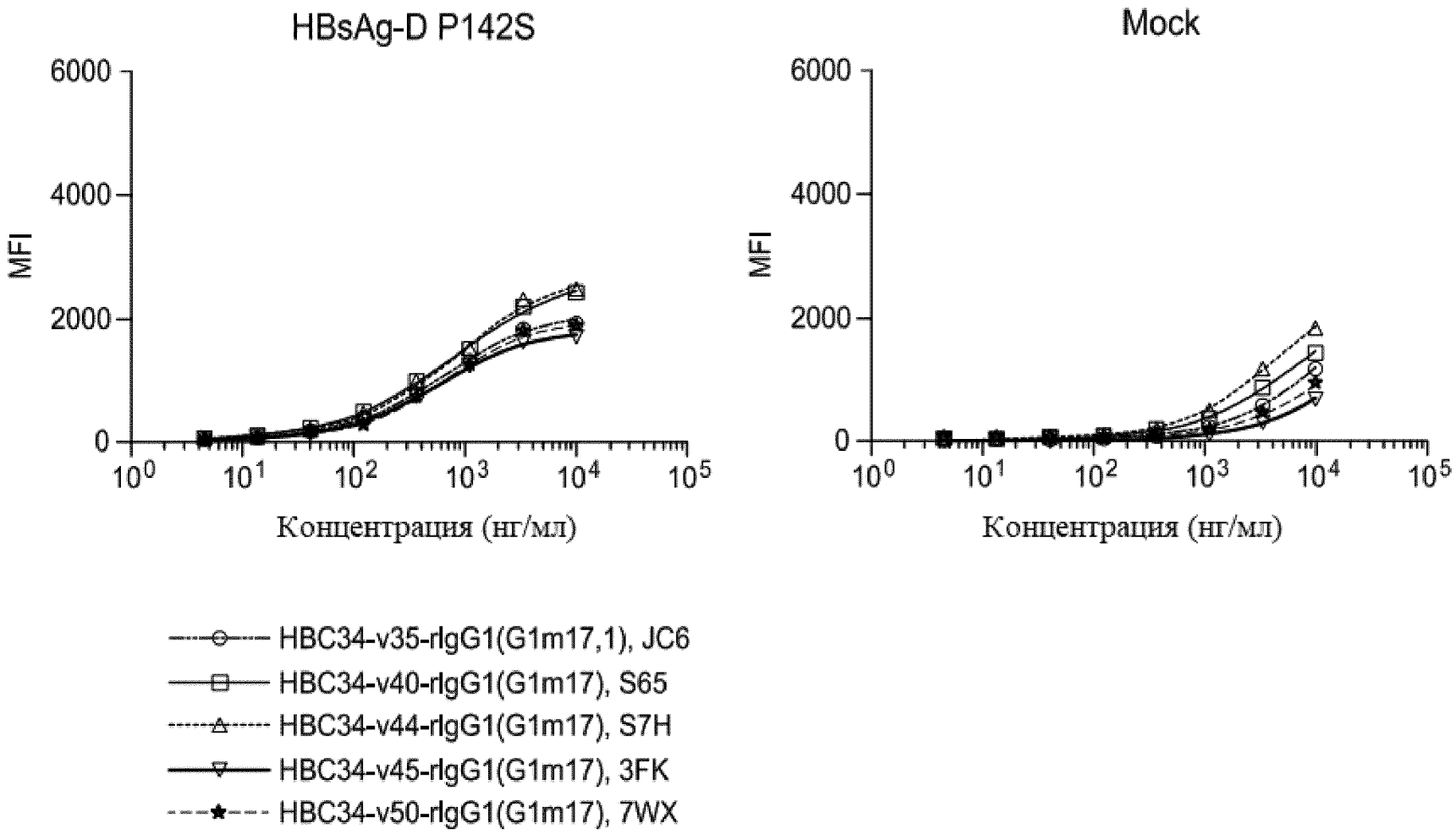
Фиг. 18H


HBsAg-D M133H
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

Фиг. 18I


HBsAg-D K141E
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

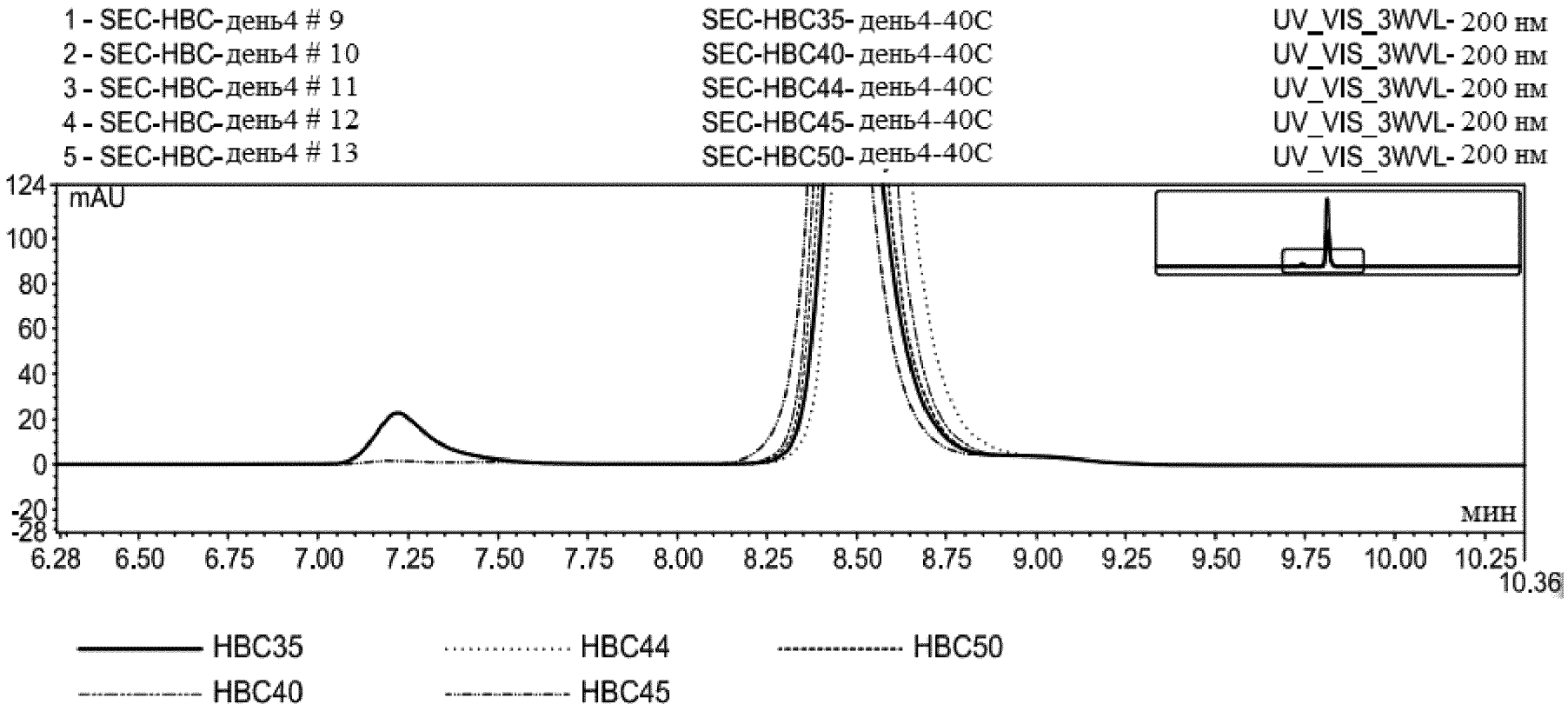
Фиг. 18J


HBsAg-D P142S
Mock
MFI
6000
4000
2000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Концентрация (нг/мл)
HBC34-v35-rIgG1(G1m17,1), JC6
HBC34-v40-rIgG1(G1m17), S65
HBC34-v44-rIgG1(G1m17), S7H
HBC34-v45-rIgG1(G1m17), 3FK
HBC34-v50-rIgG1(G1m17), 7WX

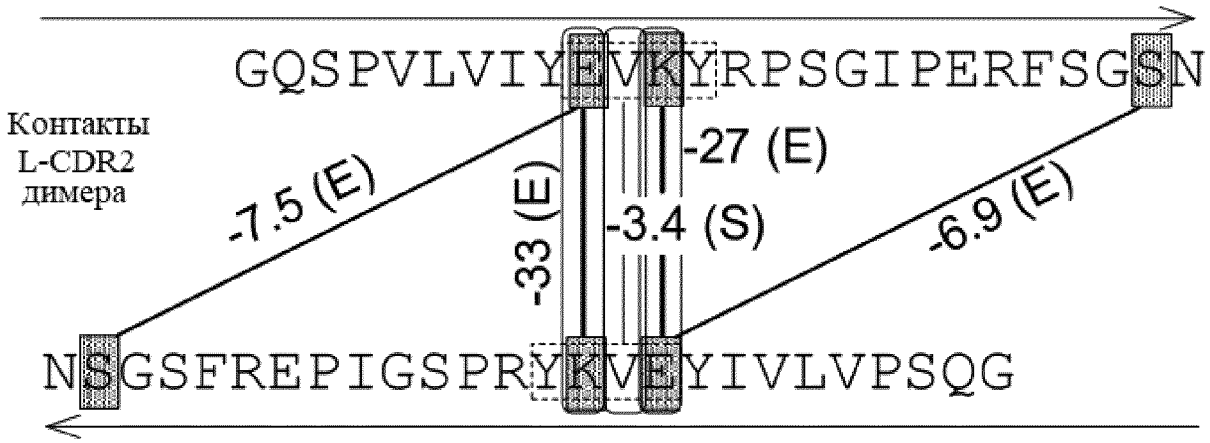
Фиг. 18K

название mAb	титр 5 мл трансфекции (мг/мл)	титр 100 мл трансфекции (мг/мл)	средний титр в 100 мл масштабе (мг/л)
HBC34-v35-rIgG1 (G1m17,1)	89.4	149.0, 172.3, 212.0 (N=3)	177.8
HBC34-v40-rIgG1 (G1m17,1)	237.261	535.5, 583.0, 669.4 (N=3)	596.0
HBC34-v44-rIgG1 (G1m17,1)	157.8	588.2, 563.0 (N=2)	575.6
HBC34-v45-rIgG1 (G1m17,1)	140.9	269.2, 256.0 (N=2)	262.6
HBC34-v50rIgG1 (G1m17,1)	163.7	363.8, 371.0 (N=2)	367.4

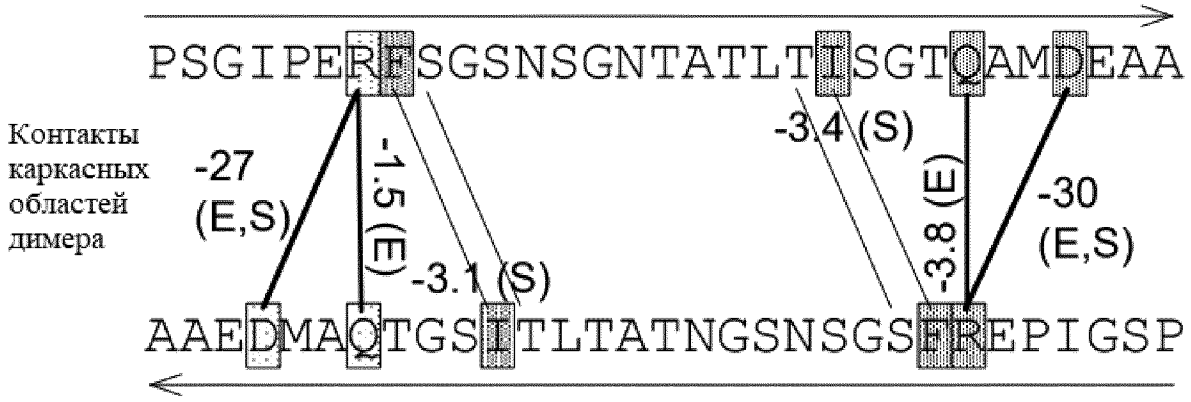
Фиг. 19


1 - SEC-HBC-день4 # 9
2 - SEC-HBC-день4 # 10
3 - SEC-HBC-день4 # 11
4 - SEC-HBC-день4 # 12
5 - SEC-HBC-день4 # 13
SEC-HBC35- день4-40C
SEC-HBC40- день4-40C
SEC-HBC44- день4-40C
SEC-HBC45- день4-40C
SEC-HBC50- день4-40C
UV_VIS_3WVL- 200 нм
UV_VIS_3WVL- 200 нм
UV_VIS_3WVL- 200 нм
UV_VIS_3WVL- 200 нм
UV_VIS_3WVL- 200 нм
mAU
124
100
80
60
40
20
0
-20
-28
мин
6.28
6.50
6.75
7.00
7.25
7.50
7.75
8.00
8.25
8.50
8.75
9.00
9.25
9.50
9.75
10.00
10.25
10.36
HBC35
HBC44
HBC50
HBC40
HBC45

Фиг. 20



Фиг. 21A

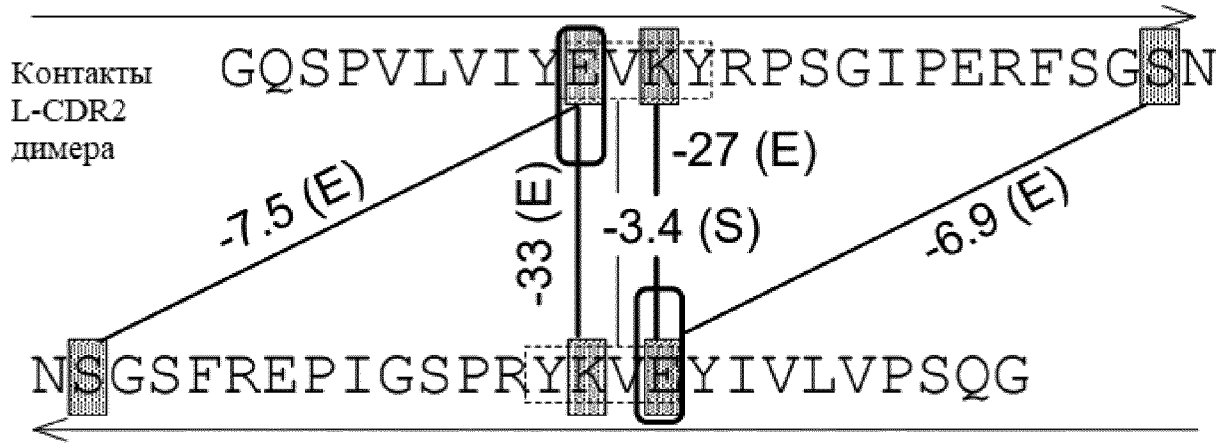


Фиг. 21B

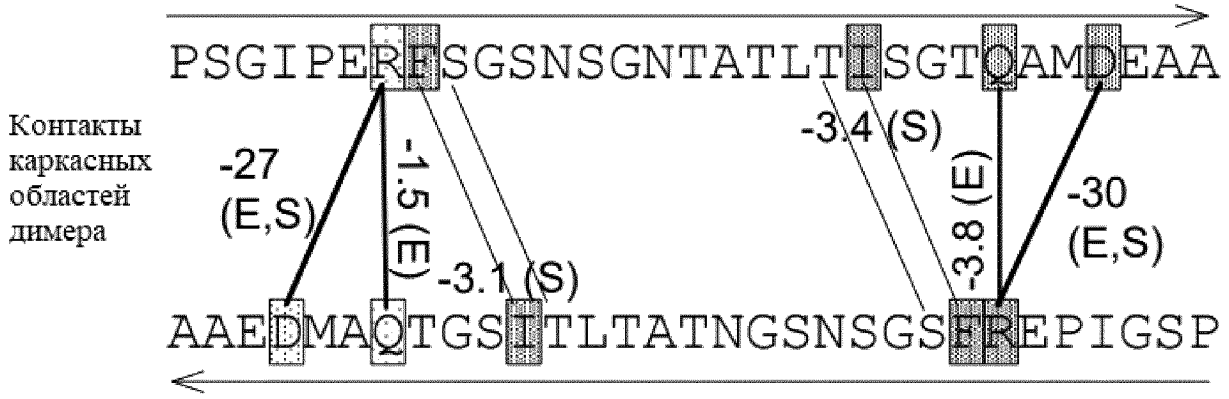
```
     40         50         60         70         80
v35  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34
V36  GQSPVLVIYQ DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - GL L2
V37  GQSPVLVIYE DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + Q49E
V38  GQSPVLVIYQ VSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + D50V
V39  GQSPVLVIYQ DKKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + S51K
V40  GQSPVLVIYQ DSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + K52Y
V41  GQSPVLVIYQ VSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + D50V + K52Y
V42  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE RFSGANSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S + S64A
V43  GQSPVLVIYQ VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + E49Q
V44  GQSPVLVIYA VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + E49A
V45  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE NFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60N
V46  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE AFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60A
V47  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE NFSGANSGNT ATLTASGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S + S64A + R60N + I74A
V48  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE NFSGANSGNT ATLTASGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60N + S64A + + I74A
V49  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S
V50  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE KFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60K
```

E49Q, **V50D**, K51S
GL B L-CDR2

Фиг. 21C



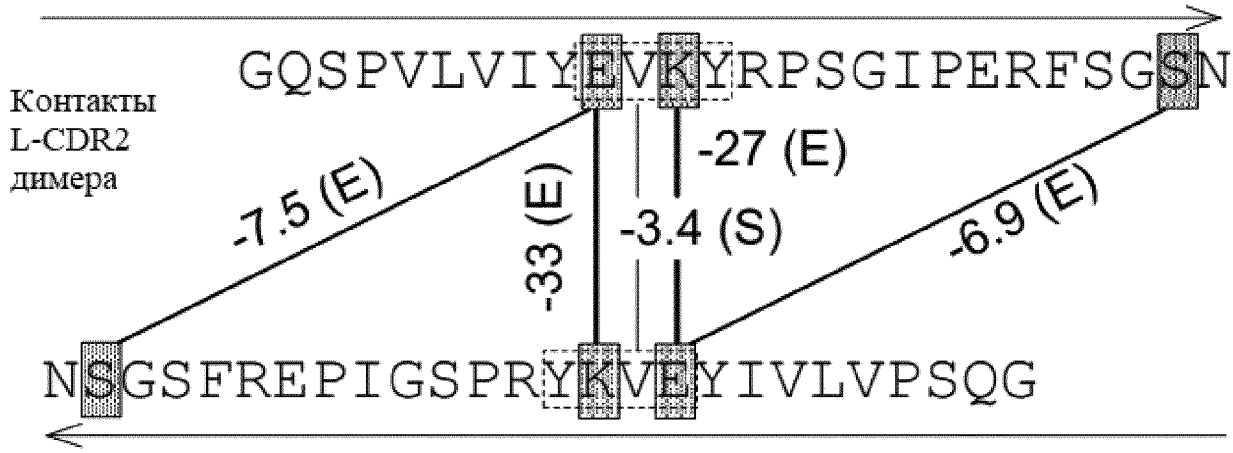
Фиг. 22A



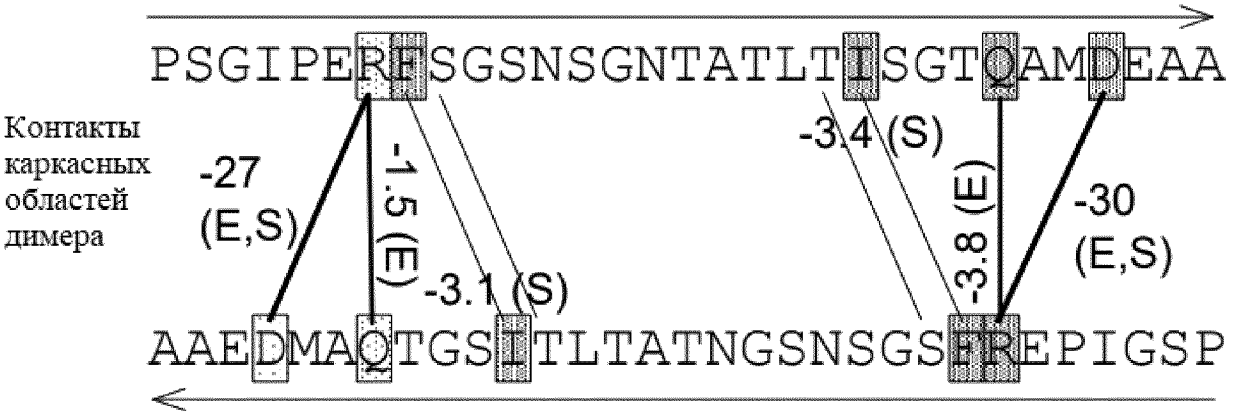
Фиг. 22B

```
     40         50         60         70         80
v35  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34
V36  GQSPVLVIYQ DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - GL L2
V37  GQSPVLVIYE DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + Q49E
V38  GQSPVLVIYQ VSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + D50V
V39  GQSPVLVIYQ DKKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + S51K
V40  GQSPVLVIYQ DSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + K52Y
V41  GQSPVLVIYQ VSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + D50V + K52Y
V42  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE RFSGANSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S + S64A
V43  GQSPVLVIYQ VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + E49Q
V44  GQSPVLVIYA VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + E49A ← E49A в L-CDR2
V45  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE NFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60N
V46  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE AFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60A
V47  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE NFSGANSGNT ATLTASGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S + S64A + R60N + I74A
V48  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE NFSGANSGNT ATLTASGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60N + S64A + + I74A
V49  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S
V50  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE KFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60K
```

Фиг. 22C



Фиг. 23A



Фиг. 23B

```
     40         50         60         70         80
v35  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34
V36  GQSPVLVIYQ DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - GL L2
V37  GQSPVLVIYE DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + Q49E
V38  GQSPVLVIYQ VSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + D50V
V39  GQSPVLVIYQ DKKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + S51K
V40  GQSPVLVIYQ DSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + K52Y
V41  GQSPVLVIYQ VSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - v36 + D50V + K52Y
V42  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE RFSGANSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S + S64A
V43  GQSPVLVIYQ VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + E49Q
V44  GQSPVLVIYA VKYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + E49A
V45  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE NFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60N
V46  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE AFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60A
V47  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE NFSGANSGNT ATLTASGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S + S64A + R60N + I74A
V48  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE NFSGANSGNT ATLTASGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60N + S64A + + I74A
V49  GQSPVLVIYE VSYRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + K51S
V50  GQSPVLVIYE VKYRPSGIPE KFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEAAYFC - HBC34 + R60K
```

Мутантный R60 в каркасной области

Фиг. 23C