



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107921285 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680029323.0

(22)申请日 2016.03.25

(30)优先权数据

62/137,881 2015.03.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/024348 2016.03.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/154593 EN 2016.09.29

(71)申请人 IGM生物科学股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·F·卡罗尔 R·巴利加 D·吴

B·A·基特

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 余颖 陶启长

(51)Int.Cl.

A61P 31/20(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书8页 说明书57页 附图7页

(54)发明名称

多价乙型肝炎病毒抗原结合分子及其应用

(57)摘要

本文公开了一种多聚化乙型肝炎病毒(HBV)蛋白结合分子,例如二价IgA或五聚化或六聚化IgM结合分子,其包括至少两个二价结合单元,或其变体或片段,各包括至少两个抗体重链恒定区或其片段,其中各重链恒定区或其片段与HBV抗原结合结构域相关联。本文还公开了包括多聚化结合分子的组合物,编码多聚化结合分子的多核苷酸,以及制造和使用多聚化结合分子的方法。

1. 一种多聚化结合分子,其包含至少两个二价结合单元,或其变体或片段;  
其中,各结合单元包含至少两个抗体重链恒定区或其片段,其各自与抗原结合结构域相关联;  
其中,至少一个抗原结合结构域特异性地结合乙型肝炎病毒 (HBV) 抗原,所述乙型肝炎病毒表达在感染性病毒颗粒表面,表达在感染HBV的细胞表面,或其组合,并且  
其中,所述结合分子比含有特异性地结合所述HBV抗原的抗原结合结构域的参照单二价结合单元更有效。
2. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述参照单二价结合单元是IgG抗体。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的结合分子,其是含有两个二价IgA结合单元或其片段和J链或其片段或变体的二聚化结合分子,其中各结合单元含有两个IgA重链恒定区或其片段,其各自与抗原结合结构域相关联。
4. 如权利要求3所述的结合分子,其还包含分泌型组分,或其片段或变体。
5. 如权利要求3或权利要求4所述的结合分子,其中所述IgA重链恒定区或其片段各自包含Ca2结构域或Ca3-tp结构域。
6. 如权利要求5所述的结合分子,其中一个或多个IgA重链恒定区或其片段还包含Ca1结构域。
7. 如权利要求3至6中任一项所述的结合分子,其中所述IgA重链恒定区是人IgA恒定区。
8. 如权利要求3至7中任一项所述的结合分子,其中各结合单元包含两个IgA重链,各自含有位于IgA恒定区或其片段的氨基末端的VH,以及两个免疫球蛋白轻链,各自含有位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。
9. 如权利要求1或2所述的结合分子,其是五聚化或六聚化结合分子,分别包含五个或六个二价IgM结合单元或其片段,其中各结合单元包含两个IgM重链恒定区或其片段,各自与抗原结合结构域相关联。
10. 如权利要求9所述的结合分子,其中所述IgM重链恒定区或其片段各包含C $\mu$ 3结构域和C $\mu$ 4-tp结构域。
11. 如权利要求9或权利要求10所述的结合分子,其中一个或多个IgM重链恒定区或其片段还包含C $\mu$ 2结构域、C $\mu$ 1结构域,或其任何组合。
12. 如权利要求9至11中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子是五聚化的,并且还包含J链,或其片段,或其变体。
13. 如权利要求3或权利要求12所述的结合分子,其中J链或其片段包含氨基酸序列SEQ ID NO:54或其功能性片段。
14. 如权利要求3、权利要求12、或权利要求13所述的结合分子,其中所述J链或其片段是经修饰的J链,其还含有异源多肽,其中所述异源多肽直接或间接地融合至所述J链或其片段。
15. 如权利要求14所述的结合分子,其中所述异源多肽通过肽接头与J链或其片段融合。
16. 如权利要求15所述的结合分子,其中所述肽接头含有至少5个氨基酸,但是不超过25个氨基酸。

17. 如权利要求16所述的结合分子,其中所述肽接头由GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 72) 组成。

18. 如权利要求14至17任一项所述的结合分子,其中所述异源多肽融合至J链或其片段的N末端、J链或其片段的C末端、或J链或其片段的N末端和C末端。

19. 如权利要求15至18中任一项所述的结合分子,其中所述异源多肽含有结合结构域。

20. 如权利要求19所述的结合分子,其中所述异源多肽的结合结构域是抗体或其抗原结合片段。

21. 如权利要求20所述的结合分子,其中所述抗原结合片段包含Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv (scFv) 片段、二硫连接的Fv (sdFv) 片段、或其任意组合。

22. 如权利要求21所述的结合分子,其中所述抗原结合片段是scFv片段。

23. 如权利要求19至22中任一项所述的结合分子,其中所述异源多肽能够特异性地结合CD3 $\epsilon$ 。

24. 如权利要求23所述的结合分子,其中所述经修饰的J链含有氨基酸序列SEQ ID NO: 68 (V15J) 或SEQ ID NO: 71 (J15V)。

25. 如权利要求24所述的结合分子,其中所述经修饰的J链还包含信号肽。

26. 如权利要求25所述的结合分子,其中所述经修饰的J链含有氨基酸序列SEQ ID NO: 67 (V15J) 或SEQ ID NO: 70 (J15V)。

27. 如权利要求9至12中任一项所述的结合分子,其中所述IgM重链恒定区是人IgM恒定区。

28. 如权利要求3至27中任一项所述的结合分子,其中各结合单元包含两个重链,其各自含有位于恒定区或其片段的氨基末端的VH,以及两个免疫球蛋白轻链,其各自含有位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。

29. 如权利要求3至28中任一项所述的结合分子,其中至少一个结合单元含有两个抗原结合结构域,其特异性地结合乙型肝炎病毒 (HBV) 抗原,所述乙型肝炎病毒表达在感染性病毒颗粒表面,表达在感染HBV的细胞表面,或其组合,并且其中所述至少一个结合单元内的两个重链是相同的。

30. 如权利要求29所述的结合分子,其中所述至少一个结合单元内的两个轻链是相同的。

31. 如权利要求29或权利要求30所述的结合分子,其中所述两个轻链恒定区是人 $\lambda$ 恒定区或人 $\kappa$ 恒定区。

32. 如权利要求29至31任一项所述的结合分子,其含有至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或十二个抗原结合结构域,其特异性地结合乙型肝炎病毒 (HBV) 抗原,所述乙型肝炎病毒表达在感染性病毒颗粒表面,表达在感染HBV的细胞表面,或其组合。

33. 如权利要求32所述的结合分子,其中,至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、或至少十二个抗原结合结构域是相同的。

34. 如权利要求1至33中任一项所述的结合分子,其中HBV抗原以高于HBV抗原在非感染

性亚病毒颗粒上的表达密度表达在感染性病毒颗粒表面、在感染HBV的细胞表面、或其组合。

35. 如权利要求1至34中任一项所述的结合分子,其中HBV抗原是乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、前核心抗原、核心抗原、X抗原、或其任意组合。

36. 如权利要求35所述的结合分子,其中所述HBV抗原是HBsAg,并且其中HBsAg由下述组成:S区(S);前S2区和S区;前S1区、前S2区和S区;或其片段。

37. 如权利要求36所述的结合分子,其中HBsAg含有前S1,前S2,和S区,或其片段。

38. 如权利要求1至37中任一项所述的结合分子,含有VH和VL氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区或具有一个或两个单氨基酸取代的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区,以及LCDR1、LCDR2、和LCDR3区或具有一个或两个单氨基酸取代的LCDR1、LCDR2、和LCDR3区,所述VH和VL氨基酸序列分别是SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76。

39. 如权利要求1至37中任一项所述的结合分子,其含有VH氨基酸序列SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区或包含一个或两个单氨基酸取代的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区。

40. 如权利要求1至37中任一项所述的结合分子,其中至少一个抗原结合结构域含有抗体重链可变区(VH)和抗体轻链可变区(VL),其中VH和VL分别含有与下述序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76。

41. 如权利要求1至37中任一项所述的结合分子,其中至少一个抗原结合结构域含有抗

体VH,其中VH含有与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列。

42. 如权利要求1至41中任一项所述的结合分子,其包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:58的IgM重链和含有氨基酸序列SEQ ID NO:59的轻链。

43. 如权利要求1至41中任一项所述的结合分子,其包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:63的IgM重链和含有氨基酸序列SEQ ID NO:59的轻链。

44. 如权利要求1至42中任一项所述的结合分子,其中所述分子比含有所述HBV结合抗原抗原结构域的对照单一结合单元,在抑制HBV增殖、增强HBV清除、控制HBV感染性和/或控制HBV生长中更有效。

45. 一个分离的IgM抗体或其片段,其含有J链,或其功能性片段或变体,和五个结合单元,各自含有两条重链和两条轻链,其中各重链或其片段含有人 $\mu$ 恒定区或其片段,和重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:62,并且其中各轻链含有人 $\kappa$ 恒定区和轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:6;其中抗体或其片段能够组装成五聚化IgM抗体,其能够特异性地结合HBV表面抗原的前S1区。

46. 如权利要求45所述的IgM抗体或其片段,其中所述重链含有氨基酸序列SEQ ID NO.:63,并且其中所述轻链含有氨基酸序列SEQ ID NO.:59。

47. 如权利要求45或权利要求46所述的IgM抗体或其片段,其中J链含有氨基酸序列SEQ ID NO:54或其功能性片段。

48. 如权利要求45至47中任一项所述的IgM抗体或其片段,其中所述J链或其片段是还含有异源多肽的经修饰的J链,其中所述异源多肽直接或间接地融合至所述J链。

49. 如权利要求48所述的IgM抗体或其片段,其中所述异源多肽通过肽接头融合至所述J链或其片段。

50. 如权利要求49所述的IgM抗体或其片段,其中所述肽接头含有至少5个氨基酸,但不多于25个氨基酸。

51. 如权利要求50所述的IgM抗体或其片段,其中所述肽接头由GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:72) 组成。

52. 如权利要求49至51中任一项所述的IgM抗体或其片段,其中所述异源多肽融合至J链或其片段的N末端,J链或其片段的C末端,或J链或其片段的N末端和C末端。

53. 如权利要求48至52中任一项所述的IgM抗体或其片段,其中所述异源多肽含有结合结构域。

54. 如权利要求53所述的IgM抗体或其片段,其中所述异源多肽的结合结构域是抗体或其抗原结合片段。

55. 如权利要求54所述的IgM抗体或其片段,其中所述抗原结合片段含有Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv(scFv)片段、二硫连接的Fv(sdFv)片段、或其任意组合。

56. 如权利要求55所述的IgM抗体或其片段,其中所述抗原结合片段是scFv片段。

57. 如权利要求53至56中任一项所述的IgM抗体或其片段,其中所述异源多肽能够特异性地结合CD3 $\epsilon$ 。

58. 如权利要求57所述的IgM抗体或其片段,其中所述经修饰的J链含有氨基酸序列SEQ

ID NO:68 (V15J) 或 SEQ ID NO:71 (J15V)。

59. 如权利要求58所述IgM的抗体或其片段,其中所述经修饰的J链还含有信号肽。

60. 如权利要求59所述IgM的抗体或其片段,其中所述经修饰的J链含有氨基酸序列SEQ ID NO:67 (V15J) 或 SEQ ID NO:70 (J15V)。

61. 一种组合物,其含有权利要求1至44中任一项所述的结合分子或权利要求45至60中任一项所述的IgM抗体。

62. 一种多核苷酸,其含有编码权利要求45至60中任一项所述的IgM抗体或权利要求1至44中任一项所述的结合分子的多肽亚基的核酸序列,其中所述多肽亚基含有IgM重链恒定区和抗体结合结构域的至少抗体VH部分,该抗体结合结构域特异性地结合表达在感染性病毒颗粒表面、在感染HBV的细胞表面、或这些组合的乙型肝炎病毒(HBV)抗原。

63. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中所述多肽亚基含有融合至VH结构域的C末端的人IgA或IgM恒定区或其片段,所述VH结构域包含:

(a) VH氨基酸序列ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:73、或SEQ ID NO:75的HCDR1、HCDR2、和HCDR3结构域或包含一个或两个单氨基酸取代的HCDR1、HCDR2、和HCDR3结构域;或

(b) 与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:73、或SEQ ID NO:75至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列。

64. 一种多核苷酸,其含有编码权利要求45至60中任一项所述的IgM抗体或权利要求1至44中任一项所述的结合分子的多肽亚基的核酸序列,其中所述多肽亚基含有特异性地结合乙型肝炎病毒(HBV)抗原的抗体结合结构域的抗体VL部分,所述乙型肝炎病毒表达在感染性病毒颗粒表面,表达在感染HBV的细胞表面,或其组合。

65. 如权利要求64所述的多核苷酸,其中,所述多肽亚基包含融合至VL的C末端的人抗体轻链恒定区或其片段,其包含:

(a) VL氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76的LCDR1、LCDR2、和LCDR3结构域或包含一个或两个单氨基酸取代的LCDR1、LCDR2、和LCDR3结构域;或

(b) 与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID

NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列。

66. 一种组合物,其含有权利要求62或权利要求63所述多核苷酸,和权利要求64或权利要求65所述多核苷酸。

67. 如权利要求66所述的组合物,其中所述多核苷酸包含在单一载体上。

68. 如权利要求66所述的组合物,其中所述多核苷酸位于分开的载体上。

69. 如权利要求66至68中任一项所述的组合物,其还包含含有编码J链、或其片段、或其变体的核酸序列的多核苷酸。

70. 如权利要求69所述的组合物,其中所述多核苷酸位于单一载体上。

71. 如权利要求69所述的组合物,其中所述多核苷酸位于至少两个载体上。

72. 一种载体,如权利要求67或权利要求70所述。

73. 一种载体,如权利要求68或权利要求71所述。

74. 一种宿主细胞,其含有如权利要求62至65中任一项所述的多核苷酸、如权利要求66至71中任一项所述的组合物,或如权利要求72或权利要求73所述的载体,其中,所述宿主细胞可表达如权利要求1至44中任一项所述的结合分子,或其亚基。

75. 一种产生如权利要求1至44中任一项所述的结合分子或如权利要求45至60中任一项所述的IgM抗体的方法,包括:培养如权利要求74所述的宿主细胞,和回收所述结合分子。

76. 一种在慢性受感染的细胞中控制乙型肝炎病毒(HBV)增殖、潜伏、或维持的方法,包括:将HBV和HBV易感细胞的混合物与如权利要求1至44中任一项所述结合分子接触,其中所述结合分子比含有与所述HBV抗原特异性结合的抗原结合结构域的参照单结合单元抗体更有效。

77. 一种治疗由患者体内乙型肝炎病毒(HBV)感染引起或加重的疾病或病症的方法,包括:给予感染了HBV或易于感染HBV的患者如权利要求1至44中任一项所述结合分子,其中所述结合分子比含有与所述HBV抗原特异性结合的抗原结合结构域的参照单结合单元抗体更有效。

78. 如权利要求77所述的方法,其中所述疾病或病症是急性肝炎、慢性肝炎、肝脏炎症、肝硬化、肝衰竭、干细胞癌(HCC)、或其组合。

79. 如权利要求77或权利要求78所述的方法,其中所述患者表现出HBV疾病症状,并且其中所述症状是病毒载量增加、病毒脱落、腹部疼痛、黑尿、发烧、关节疼痛、食欲减退、恶心和呕吐、虚弱和疲劳,黄疸、或其组合。

80. 一种在慢性受感染的细胞中控制乙型肝炎病毒(HBV)增殖、潜伏、或维持的方法,包括:将HBV和HBV易感细胞的混合物与如权利要求45至60中任一项所述的IgM抗体接触,其中所述IgM比含有两条重链和两条轻链的参照单结合单元抗体更有效,其中各重链含有VH氨基酸序列SEQ ID NO:62,并且其中各轻链含有VL氨基酸序列SEQ ID NO:6。

81. 一种治疗由患者体内乙型肝炎病毒(HBV)感染所引起或加重的疾病或病症的方法,包括:给予感染了HBV或易于感染HBV的患者如权利要求45至60中任一项所述IgM,其中所述

IgM比含有两条重链和两条轻链的参照单结合单元抗体更有效,其中各重链含有VH氨基酸序列SEQ ID NO:62,并且其中各轻链含有VL氨基酸序列SEQ ID NO:6。

82.如权利要求81所述的方法,其中所述疾病或病症是急性肝炎、慢性肝炎、肝脏炎症、肝硬化、肝衰竭、干细胞癌(HCC)、或其组合。

83.如权利要求81或权利要求82所述的方法,其中所述患者表现出一种HBV疾病症状,并且其中所述症状是病毒载量增加、病毒脱落、腹部疼痛、黑尿、发烧、关节疼痛、食欲减退、恶心和呕吐、虚弱和疲劳,黄疸、或其组合。

84.一种鉴定结合分子的方法,所述结合分子以比结合非感染性病毒颗粒更高的亲和性、更高的亲合力、或其组合结合感染性病毒颗粒表面、受细菌感染的细胞表面、或其组合,所述方法包括:

(a)将测试结合分子与感染性病毒颗粒接触并且测量所述测试结合分子与所述感染性病毒颗粒结合的亲和性或亲合力;

(b)将测试结合分子与病毒颗粒的非感染型接触并且测量所述测试结合分子与所述非感染性颗粒结合的亲和性或亲合力;

(c)比较步骤(a)和(b)的结果;并且

(d)鉴定测试化合物,其在步骤(a)中测量的亲和性或亲合力高于在步骤(b)中测量的亲和性或亲合力。

85.一种鉴定结合分子的方法,所述结合分子以比结合未感染病毒的细胞更高的亲和性、更高的亲合力、或其组合结合受目标病毒感染的细胞表面,所述方法包括:

(a)将测试结合分子与受病毒感染的细胞接触并且测量所述测试结合分子与所述受病毒感染的细胞结合的亲和性或亲合力;

(b)将所述测试结合分子与未感染病毒的细胞接触并且测量所述测试结合分子与所述未受感染的细胞结合的亲和性或亲合力,其中所述未感染的细胞与受病毒感染的细胞相同,除了其是未感染的;

(c)比较步骤(a)和(b)的结果;并且

(d)鉴定测试化合物,其在步骤(a)中测量的亲和性或亲合力高于在步骤(b)中测量的亲和性或亲合力。

86.一种鉴定结合分子的方法,所述结合分子以比结合HBV亚病毒颗粒更高的亲和性、更高的亲合力、或其组合结合感染性乙型肝炎病毒(HBV)颗粒表面、受HBV感染的细胞表面、或其组合,所述方法包括:

(a)将测试结合分子与HBV病毒颗粒接触并且测量测试结合分子与HBV病毒颗粒结合的亲和性和/或亲合力;

(b)将测试结合分子与HBV亚病毒颗粒接触并且测量测试结合分子与HBV亚病毒颗粒结合的亲和性和/或亲合力;

(c)比较步骤(a)和(b)的结果;并且

(d)鉴定测试化合物,其在步骤(a)中测量的亲和性或亲合力高于在步骤(b)中测量的亲和性或亲合力。

87.一种鉴定结合分子的方法,其以比结合未感染HBV的细胞更高的亲合力、更高的亲合力、或其组合结合受乙型肝炎病毒(HBV)感染的细胞表面,所述方法包括:

(a) 将测试结合分子与受HBV感染的细胞接触并且测量所述测试结合分子与所述受HBV感染的细胞结合的亲和性或亲合力；

(b) 将所述测试结合分子与未感染HBV的细胞接触并且测量所述测试结合分子与未感染HBV的细胞结合的亲和性或亲合力,其中所述未感染的细胞与受HBV感染的细胞相同,除了其是未感染的；

(c) 比较步骤 (a) 和 (b) 的结果;并且

(d) 鉴定测试化合物,其在步骤 (a) 中测量的亲和性或亲合力高于在步骤 (b) 中测量的亲和性或亲合力。

88. 如权利要求87所述的方法,其中所述受HBV感染的细胞是人细胞。

89. 如权利要求87或88所述的方法,其中所述测试结合分子是权利要求1至44中任一项所述结合分子。

## 多价乙型肝炎病毒抗原结合分子及其应用

[0001] 相关申请的交叉援引

[0002] 本申请要求2015年3月25日提交的美国临时专利申请系列号62/137,881的优先权,其公开内容通过引用全文纳入本文。

### 背景技术

[0003] 乙型肝炎病毒 (HBV) 属于双链DNA病毒类,并且目前已知包括四种主要血清型 (adr、adw、ayr、和ayw) 和八种主要的基因型 (A-H)。血清型基于包膜蛋白序列的变化,而8种基因型在全世界特定地理区域中明显分布。已证明基因型差异与疾病的严重程度和对于治疗的应答效果有关 (参见Kramvis等, *Vaccine*, 23 (19) :2409-23, 2005, 和Magnius等, *Intervirology*, 38 (1-2) :24-34, 1995)。

[0004] HBV基因组由部分双链的环状DNA组成。也就是说,基因组中的一部分仍然是单链的。HBV基因组较长的部分的长度是3020到3320个核苷酸,而较短的部分的长度是1700到2800个核苷酸。HBV基因组较长的部分与病毒DNA聚合酶连接。

[0005] 感染HBV的细胞除了可以生成感染性病毒颗粒,还可以生成缺少核心的球状和纤维状非感染性颗粒。在感染HBV个体中,这些非感染性颗粒的数量可以比感染性颗粒多1000到100000倍 (参见Chai等, *J. Virology*, 82:7812-7817, 2005)。

[0006] HBV可以产生5种病毒蛋白,其包括:

[0007] 1、包膜蛋白 (也被称为表面抗原, HBsAg, 由S基因编码);

[0008] 2、聚合酶 (pDI, 由P基因编码);

[0009] 3、乙型肝炎X蛋白 (HbxAG, X抗原, 由X基因编码);

[0010] 4、核衣壳或核心抗原 (HbcAg, 由C基因编码); 和

[0011] 5、前核心 (HbeAg, 由核心和前C基因 (Pre-C genes) 编码)。

[0012] 由HBV基因组中三个独立的启动密码子生成三种尺寸的HBsAg。该基因产物的小型 (SmaII)、中型 (Medium) 和大型 (Large) 形式是三种指定的结构域中的一种或多种的组合: (i) 单独的S (S), (ii) 前S2和S (M), 或 (iii) 前S1和前S2和S (L) (图1A)。感染性颗粒大多具有所有三种形式的抗原,并且可以通过前S1蛋白 (图1B) 和NTCP受体 (牛黄酸钠联合运输多肽, 或胆汁酸转运蛋白, 由SLC10A1基因编码) 之间的作用进入肝细胞。因此,前S1抗原与感染相关联并且优先地在感染性病毒颗粒中表达。(Hong等, *Virology*, 318:134-141, 2004; Park等, *Antiviral Res.*, 68:109-115, 2005)。

[0013] HbeAg是分泌的前核心蛋白。前核心蛋白显示出作为免疫调节的作用。人们已经发现HbeAg可以调节对于核心抗原的免疫应答。(Chen等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 14913-14918, 2004)。

[0014] 尽管衣壳、聚合酶和表面抗原蛋白的功能看起来比较清楚,“X”基因的功能还没有完全阐明,尽管已知其在肝细胞癌 (HCC) 的发育中起作用。(Tang等, *Cancer Sci.*, 97:977-983, 2006, Ng等, *J. Gastroent.*, 46:974-990, 2011和Kew, Michael C., *J. Gastro. Hepat.*, 26Suppl. 1:144-152, 2011)。

[0015] 通常认为乙型肝炎病毒在全世界感染了超过20亿人。据称全世界有3.5亿到4亿慢性或长期受感染个体,并且HBV或HBV感染并发症每年在全世界导致780,000例死亡。HBV比人体免疫缺损病毒(HIV)的感染性高50到100倍。病毒通过暴露于感染性血液或体液传播。感染的症状通常包括食欲减退、疲乏、低烧、黄疸、肌肉和关节疼痛、恶心和呕吐、皮肤发黄和黑尿。无法将病毒从一些个体的体内完全清除,从而导致慢性感染,并因此引起肝损伤和肝硬化。大约15%到40%的慢性HBV患者患上肝硬化和/或HCC。(Xu等,Canc.Lett.,345:216-222,2014)。HBV病毒基因组留存于宿主的基因组中,并且在被清除后可以再活化,从而导致新的HBV症状。在患有HBV感染的人群中肝癌的发病率要高很多。

[0016] 病毒的清除和致病机制都是由适应性或获得性免疫应答介导的。这包括体液(抗体介导的)免疫成分和细胞介导的免疫成分。具体而言,感染触发病毒特异性的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的应答,其在慢性感染中产生对肝组织大多数可见的损伤。

[0017] 人们已经研发出许多用于对抗HBV感染的预防措施。根据病毒的重组表面抗原已经开发出疫苗。(参见WO 2014/0489101和ShouvaI,D.,J.HepatoI.39(Suppl.I):70-76,2003)。此外,从来自高效价个体的人血清中研发出了HBV免疫球蛋白(HBIG)。通常将HBIG提供给其母感染HBV的婴儿,用于防止母亲传染给孩子。如果HBIG在已知暴露的24小时内给药,可以防止HBV感染。HBIG通常也给予感染HBV的肝脏移植患者,用于防止新组织的再感染。

[0018] 慢性感染的个体是治疗的候选者。然而,目前还没有批准的用于清除慢性乙肝病毒感染的治疗方法。可用的疗法可以通过阻止病毒复制来阻断进一步的感染。人们已经研究了各种单克隆抗体和组合治疗在治疗和/或治愈HBV感染中的应用,包括慢性HBV感染,但是没有一种被商业化。

[0019] 对于慢性感染的治疗,例如干扰素和拉米夫定仅能起到有限的效果并且已知会引起严重的副作用。尽管人们在用于治疗或预防HBV感染的疗法的研究中所做的努力,现在仍需要开发针对HBV感染(例如慢性HBV感染)的新疗法。

## 发明内容

[0020] 本文公开了具有结合一个或多个乙型肝炎抗原特异性的多聚化结合分子的各种实施方式。本文公开了一种多聚化结合分子,其包括至少两个二价结合单元,或其变体或片段;其中各结合单元包括至少两个抗体重链恒定区或其片段,各自与抗原结合结构域相关联;其中至少一个抗原结合结构域特异性地结合乙型肝炎病毒(HBV)抗原,该抗原表达在感染性病毒颗粒表面,在感染HBV的细胞表面,或这些组合,并且其中结合分子比参照单二价结合单元更有效,该结合单元包括与HBV抗原特性结合的相同抗原结合结构域。在某些方面,该参照单二价结合单元是IgG抗体。

[0021] 在某些方面,结合分子可以是二聚化结合分子,其包括两个二价IgA结合单元或其片段和J链或其片段或其变体,其中各结合单元包括各自与抗原结合结构域相关联的两个IgA重链恒定区或其片段。在某些方面,二聚化结合分子还可以包括分泌部分或其片段或变体。在某些方面,IgA重链恒定区或其片段各自包括Ca2结构域或Ca3-tp结构域,并且可以还包括Ca1结构域。在某些方面,IgA重链恒定区是人重链恒定区。在某些方面,本文所提供的二聚化结合分子各结合单元可以包括两条IgA重链,其各包含位于IgA恒定区或其片段的

氨基酸末端的VH,以及两条免疫球蛋白轻链,其各包含位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基酸末端的VL。

[0022] 在某些方面,结合分子可以是五聚化或六聚化结合分子,其分别包括五个或六个二价IgM结合单元,其中各结合单元包括各自与抗原结合结构域相关联的两个IgM重链恒定区或其片段。在某些方面,IgM重链核区或其片段各自包括C $\mu$ 3结构域或C $\mu$ 4-tp结构域,并且还可以包括C $\mu$ 2结构域、C $\mu$ 1结构域、或其任意组合。在某些方面,本文所提供的五聚IgA结合分子还可包括J链,或其片段,或其变体。在某些方面,本文所提供的六聚化或五聚化结合分子的至少一个重链恒定区是人IgM恒定区。在某些方面,本文所提供的六聚化或五聚化结合分子各结合单元包括两条重链,其各自包括位于恒定区或其片段的氨基酸末端的VH,以及两条免疫球蛋白轻链,其各包含位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基酸末端的VL。

[0023] 在某些方面,本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子的至少一个结合单元(例如,IgM抗体)包括两个与乙型肝炎病毒(HBV)抗原特异性地结合的抗原结合结构域,该HBV抗原表达在感染性病毒颗粒表面,在感染HBV的细胞表面,或这些组合,并且结合单元中的两条重链是相同的。在某些方面,结合单元中的两条轻链是相同的。在某些方面,结合单元的轻链恒定区是人 $\lambda$ 恒定区或 $\kappa$ 恒定区。在某些方面,结合分子包括至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或十二个与乙型肝炎病毒(HBV)抗原特异性地结合的抗原结合结构域,该HBV抗原表达在感染性病毒颗粒表面,在感染HBV的细胞表面,或这些组合。在某些方面,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个或至少12个结合结构域是相同的。

[0024] 当结合分子是五聚化的,该结合分子可以还包括J链,或其片段,或其功能性片段,或其功能性变体。在某些方面,J链或其片段包括氨基酸序列SEQ ID NO:54或其功能性片段。在某些方面,J链或其片段可以还包括异源多肽。异源多肽可以直接或间接地与J链或其片段融合。在某些方面,异源多肽可以通过肽接头间接地与J链或其片段融合。在某些方面,肽接头可以包括,例如至少5个氨基酸,但是不超过25个氨基酸。在某些方面,肽接头由GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:72)组成。异源多肽可以融合到或接近J链或其片段的N末端、J链或其片段的C末端(C-terminus)、或到J链或其片段的N末端和C末端两端。在某些方面,异源多肽可以包括结合结构域,例如抗体或其抗原结合片段。抗原结合片段可以是,例如Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv(scFv)片段、二硫连接的Fv(sdFv)片段、或其任意组合。在某些方面,异源多肽可以特异性地结合CD3 $\epsilon$ 。例如在某些方面,经修饰的J链可以包括氨基酸序列SEQ ID NO:68(V15J)或SEQ ID NO:71(J15V)。此外,在某些方面,这些经特别修饰的J链可以还包括信号肽,其中经修饰的J链包括氨基酸序列SEQ ID NO:67(V15J)或SEQ ID NO:70(J15V)。

[0025] 在某些方面,本文所提供的由二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如IgM抗体)结合的HBV抗原在感染性病毒颗粒表面,在感染HBV的细胞表面,或这些组合以高于HBV抗原在非感染性亚病毒颗粒上表达的密度表达。在某些方面,HBV抗原是乙型肝炎表面抗原(HBsAg),前核心抗原,核心抗原,X抗原,或其任意组合。在某些方面中结合分子与HBsAg结合,它可以包括S区(S),前S2和S区,或前S1、前S2和S区,或其片段。

[0026] 在某些方面,如本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如IgM抗体)

的至少一个抗原结合结构域包括HCDR1、HCDR2、和HCDR3区,或含有一个或两个单氨基酸取代的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区,和LCDR1、LCDR2、和LCDR3区,或含有一个或两个单氨基酸取代的LCDR1、LCDR2、和LCDR3区,如分别包括在VH和VL氨基酸序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76中的。

[0027] 在某些方面,如本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如IgM抗体)的至少一个抗原结合结构域包括VH氨基酸序列SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区,或包括一个或两个单氨基酸取代的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区。

[0028] 在某些方面,如本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如IgM抗体)的至少一个抗原结合结构域包括抗体重链可变区(VH)和抗体轻链可变区(VL),其中VH和VL包括分别与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%相同的氨基酸序列。

[0029] 在某些方面,如本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如IgM抗体)的至少一个抗原结合结构域包括抗体VH,其中VH包括与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%相同的氨基酸序列。

[0030] 在某些方面,本文所提供的结合分子是的六聚化或五聚化IgM抗体或其片段,其包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:58的IgM重链和含有氨基酸序列SEQ ID NO:59的轻链。在某些方面,本文所提供的结合分子是的六聚化或五聚化IgM抗体或其片段,其包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:63的IgM重链和含有氨基酸序列SEQ ID NO:59的轻链。

[0031] 在某些方面,如本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如IgM抗体)

比包括相同HBV结合抗原结合结构域的对照单一结合单元,在病毒中和,杀死感染的细胞,加强病毒清除,在慢性受感染的细胞中控制HBV增殖、潜伏、或维持更有效。

[0032] 本文公开内容还提供了分离的IgM抗体或其片段,其包括J链,或其功能性片段或变体,以及五个结合单元,各自包括两条重链和两条轻链,其中各重链或其片段包括人 $\mu$  (Mu) 恒定区或其片段,和重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:62,并且其中各轻链可以包括人 $\kappa$  恒定区和轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:6;其中抗体或其片段可以组装入五聚化IgM抗体,其可以特异性地结合HBV表面抗原的前S1区。在某些方面,IgM抗体或其片段的轻链包括氨基酸序列SEQ ID NO:63,并且IgM抗体或其片段的轻链包括氨基酸序列SEQ ID NO:59。在某些方面,J链或其片段包括氨基酸序列SEQ ID NO:54或其功能性片段。在某些方面,J链或其片段可以还包括异源多肽。异源多肽可以直接或间接地与J链或其片段融合。在某些方面,异源多肽可以通过肽接头间接地与J链或其片段融合。在某些方面,肽接头可以包括,例如至少5个氨基酸,但是不超过25个氨基酸。在某些方面,肽接头由GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:72) 组成。异源多肽可以融合到或接近J链或其片段的N末端、J链或其片段的C末端、或J链或其片段的N末端和C末端两端。在某些方面,异源多肽可以包括结合结构域,例如抗体或其抗原结合片段。抗原结合片段可以是,例如Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv (scFv) 片段、二硫连接的Fv (sdFv) 片段、或其任意组合。在某些方面,异源多肽可以特异性地结合CD3 $\epsilon$ 。例如在某些方面,经修饰的J链可以包括氨基酸序列SEQ ID NO:68 (V15J) 或SEQ ID NO:71 (J15V)。此外,在某些方面,这些经特别修饰的J链可以还包括信号肽,其中经修饰的J链包括氨基酸序列SEQ ID NO:67 (V15J) 或SEQ ID NO:70 (J15V)。

[0033] 本文还提供了包括本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子的组合物或本文提供的分离的IgM抗体。

[0034] 本文还提供了多核苷酸,其包括编码本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如IgM抗体)的多肽亚基的核酸序列,其中多肽亚基包括IgM重链恒定区和抗体结合结构域的至少抗体VH部分,该抗体结合结构域特异性地结合表达在感染性病毒颗粒表面、在感染HBV的细胞表面、或这些组合的乙型肝炎病毒(HBV)抗原。在某些方面,多肽亚基包括融合至VH的C末端的人IgA或IgM恒定区或其片段,所述VH包括下述VH氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、和HCDR3结构域,或在一个或多个HCDR中含有一个或两个单氨基酸取代的HCDR1、HCDR2、和HCDR3结构域,所述VH氨基酸序列是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:73、或SEQ ID NO:75;或与SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:73, 或SEQ ID NO:75至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%相同的氨基酸

序列。

[0035] 本文还提供了多核苷酸,其包括编码本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如IgM抗体)的多肽亚基的核酸序列,其中多肽亚基包括抗体结合结构域的抗体VL部分,该抗体结合结构域特异性地结合表达在感染性病毒颗粒表面、感染HBV的细胞表面、或这些组合的乙型肝炎病毒(HBV)抗原。在某些方面,多肽亚基可以包括融合至VL的C末端的人抗体轻链恒定区或其片段,所述VL包括下述VL氨基酸序列的LCDR1、LCDR2、和LCDR3结构域,或在一个或多个LCDR中含有一个或两个单氨基酸取代的LCDR1、LCDR2、和LCDR3结构域,所述VL氨基酸序列是SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76;或与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%相同的氨基酸序列。

[0036] 本文还提供了包括编码重链的多核苷酸组合物和编码轻链的多核苷酸。包括在组合物中的多核苷酸可以包含在单一载体上,或安置在分开的载体上。在某些方面,组合物可以还包括多核苷酸,其包括编码J链、或其片段、或其变体的核酸序列,该序列可以在完全单独的载体上或者在相同的载体或者作为重链编码多核苷酸和/或轻链编码多核苷酸任一载体上。

[0037] 本文同样提供了上述一个、两个、或多个载体。

[0038] 在另一方面,本文还提供了宿主细胞,其包括本文提供的多核苷酸、本文提供的组合物,或本文提供的一种或多种载体,该宿主细胞可以表达本文提供的二聚化、五聚化或六聚化结合分子(例如,本文提供的分离的IgM抗体)或其亚基。本文还提供了一种生产本文提供的二聚化、五聚化或六聚化结合分子(例如,本文提供的分离的IgM抗体)的方法,其中该方法包括培养提供的宿主细胞和回收结合分子。

[0039] 本文还提供了在慢性受感染的细胞中控制乙型肝炎病毒(HBV)增殖、潜伏、或维持的方法,例如控制病毒结合、传染性、复制、潜伏、排出等,其中该方法包括将HBV和HBV易感细胞的混合物与本文提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如,本文提供的分离的IgM)接触,其中HBV复制被控制在高于包括至少一个与结合分子一样的抗原结合结构域的IgG抗体的功效。

[0040] 本文还提供了一种治疗由患者体内乙型肝炎病毒(HBV)感染引起或加重的疾病或病症的方法,其中该方法包括给予感染了HBV或易于感染HBV的患者如本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子,例如本文所提供的分离的IgM抗体。在某些方面,结合分子抗原比对照单一结合单元抗体(例如IgG)更有效,该抗体包括至少一个抗原结合结构域,其特异性地与结合分子或IgM抗体相同的HBV抗原结合。在某些方面,疾病或病症可以是例如

急性肝炎、慢性肝炎、肝脏炎症、肝硬化、肝衰竭、肝细胞癌(HCC)、或其组合。在某些方面,患者可以表现出一种或多种HBV疾病症状,例如但不限于病毒载量增加、病毒脱落、腹部疼痛、黑尿、发烧、关节疼痛、食欲减退、恶心和呕吐、虚弱和疲劳,黄疸、或其组合。

[0041] 本文还提供了一种鉴定结合分子的方法,该结合分子以比结合非感染性病毒颗粒更高的亲和性(affinity)、更高的亲合力(avidity)、或其组合结合感染性病毒颗粒表面、受细菌感染的细胞表面、或其组合,其中该方法包括:(a)将测试结合分子与感染性病毒颗粒接触,并测量该测试结合分子与该感染性病毒颗粒结合的亲和性或亲合力;(b)将该测试结合分子与病毒颗粒的非感染性型接触,并测量该测试结合分子与该病毒颗粒的非感染性型结合的亲和性或亲合力;(c)比较步骤(a)和(b)的结果;并且(d)鉴定在步骤(a)中测量的亲和性或亲合力高于在步骤(b)中测量的亲和性或亲合力的测试化合物。

[0042] 在另一方面,本文提供了一种用于鉴定结合分子的方法,该结合分子以比结合未感染病毒的细胞更高的亲和性、更高的亲合力、或其组合结合感染目标病毒的细胞表面,其中该方法包括:(a)将测试结合分子与病毒感染的细胞接触,并测量该测试结合分子与该病毒感染的细胞的亲和性或亲合力;(b)将该测试结合分子与未感染病毒的细胞接触,并测量该测试结合分子与该未感染病毒的细胞结合的亲和性或亲合力;(c)比较步骤(a)和(b)的结果;并且(d)鉴定在步骤(a)中测量的亲和性或亲合力高于在步骤(b)中测量的亲和性或亲合力的测试化合物。

[0043] 在另一方面,本文还提供了一种用于鉴定结合分子的方法,该分子以比结合HBV亚病毒颗粒更高的亲和性、更高的亲合力、或其组合结合感染性乙型肝炎病毒(HBV)病毒颗粒表面、受HBV感染的细胞表面、或这些的组合,其中该方法包括:(a)将测试结合分子与HBV病毒颗粒接触,并测量该测试结合分子与该HBV病毒颗粒结合的亲和性或亲合力;(b)将该测试结合分子与HBV亚病毒颗粒接触,并测量该测试结合分子与该HBV亚病毒颗粒结合的亲和性或亲合力;(c)比较步骤(a)和(b)的结果;并且(d)鉴定在步骤(a)中测量的亲和性或亲合力高于在步骤(b)中测量的亲和性或亲合力的测试化合物。

[0044] 在另一方面,本文提供了一种用于鉴定结合分子的方法,该分子以相较于未感染HBV的细胞较高的亲和性、较高的亲合力、或其组合结合感染乙型肝炎病毒(HBV)的细胞表面,其中该方法包括:(a)将测试结合分子与受HBV感染细胞接触,并测量该测试结合分子与该HBV感染细胞的亲和性或亲合力;(b)将该测试结合分子与未感染HBV的细胞接触,并测量该测试结合分子与该未感染HBV的细胞结合的亲和性或亲合力;(c)对比步骤(a)和(b)的结果;并且(d)鉴定在步骤(a)中测量的亲和性或亲合力高于在步骤(b)中测量的亲和性或亲合力的测试化合物。在某些方面,受HBV感染细胞是人细胞。在某些方面,测试结合分子是二聚化、五聚化、或六聚化结合分子,例如本文所提供的IgM。

## 附图说明

[0045] 图1A:HBV表面蛋白的线性结构。

[0046] 图1B:在膜内的HBV表面蛋白构象。

[0047] 图2A:SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳图,显示了各种HBV24 IgM构建物的表达产物。

[0048] 图2B:SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳图,显示了各种HBV23 IgG和IgM构建物的表达产物。

[0049] 图2C:SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳图,显示了各种HBV19 IgG和IgM构建物的表达产物。

[0050] 图3A:显示了纯化的HBV24M2V15J(三角形)、纯化的HBV24G(正方形)、和HBV24G上清液(圆形)与HBsAg-L结合的ELISA结果。

[0051] 图3B:显示了纯化的HBV23MJ(三角形)、纯化的HBV24G(正方形)与HBsAg-L结合的ELISA结果。

[0052] 图4:HBV抗体结合PLC肝癌细胞的FACS分析。上行:抗S抗体(HBV23抗-HBsAg)、IgG和IgM+人J链;下行:抗前S1抗体(HBV24G和HBV24M2V15J)、IgG和IgM+V15J。各组中未标记的直方图标示未染色的PLC细胞和通过适当人同种型对照抗体染色的PLC细胞。

## 具体实施方式

[0053] 定义

[0054] 本文所述术语“一个”或“一种”实体指一种或多种该实体;例如,“一种结合分子”应理解为表示一种或多种结合分子。如此,本文所述术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0055] 此外,本文所用“和/或”时应视作具体公开了两种特征或组分的每一种,有或没有另一种。因此,本文短语“A和/或B”中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、和“B(单独)。”同样,短语如“A、B、和/或C”中使用的术语“和/或”旨在包括各种以下实施方式:A、B、和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0056] 除非另有定义,本文使用的科技术语与本发明所属领域普通技术人员所理解的通常含义相同。例如,《生物医药和分子生物学简明词典》(Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology),Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC出版社(CRC Press);《细胞和分子生物学词典》(The Dictionary of Cell and Molecular Biology),第3版,1999,学术出版社(Academic Press);和《牛津生物化学和分子生物学辞典》(Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology),修订,2000,牛津大学出版社(Oxford University Press),向技术人员提供了本发明使用的很多术语的常用词典。

[0057] 单位、前缀和符号以它们的国际单位制(SI)接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数值。除非另外说明,氨基酸以氨基到羧基的取向从左到右书写。本文提供的标题不是本公开各种方面或某方面的限制,可以参考说明书整体理解本发明的各种方面或实施方式。因此,下面紧接着定义的术语完全参考说明书全文定义。

[0058] 本文所用术语非天然产生的物质、组合物、实体,和/或物质、组合物、实体的任意组合,或其任意语法变体是条件术语,其明确排除,但仅排除本领域普通技术人员熟知的“天然产生的”,或者可以是在任何时间,由法官或行政机关或司法机关确定或理解为“天然产生的”物质、组合物、实体,和/或物质、组合物、实体的任意组合的那些形式。

[0059] 本文所用的术语“多肽”意在包括单数形式“多肽”和复数形式“多肽”,指由酰胺键(也称肽键)线性连接的多个单体(氨基酸)所组成的分子。术语“多肽”指的是两个或更多个氨基酸的任何一条链或多条链,并且不表示特定长度的产物。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或其它任何用于指两个或多个氨基酸的一条或多条链的术语均包含

于“多肽”的定义内,术语“多肽”可与任意这些术语替代或互换使用。术语“多肽”还指多肽表达后修饰的产物,所述修饰包括但不限于糖基化、乙酰基化、磷酸化、酰胺化,和通过已知保护/阻断基团衍生化、蛋白酶切割或非天然产生氨基酸修饰。多肽可由生物来源衍生或由重组技术产生,但不必定由指定核酸序列翻译而来。其可以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0060] 本文公开的多肽的大小可以是约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个或者2,000个或更多个氨基酸。多肽可具有确定的三维结构,但它们不必定具有这种结构。具有确定三维结构的多肽称为折叠多肽,不具有确定三维结构、但可采用大量不同构象的多肽称为非折叠多肽。本文所用的术语糖蛋白指偶联至少一个糖部分的蛋白质,所述糖部分通过某一氨基酸如丝氨酸或天冬酰胺的含氧或含氮侧链连接于蛋白质。

[0061] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物指不处于其天然环境中的多肽。没有规定的具体纯化水平。例如,可从其自然或天然环境中移出分离多肽。在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质被认为是如本文公开的分离的,通过任何合适技术分离、分级,或者部分或基本上纯化的天然或重组多肽也如此。

[0062] 本文所用术语“非天然产生的”多肽、或其任意语法变体是是条件术语,其明确排除,但仅排除本领域普通技术人员熟知的“天然产生的”,或者可以是在任何时间,由法官或行政机关或司法机关确定或理解为“天然产生的”多肽的那些形式。

[0063] 本文公开的其它多肽是前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体,及其任何组合。本文所述的术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保持对应的原始抗体或多肽的至少一些性质(例如,特异性结合抗原)的任何多肽。除本文他处讨论的具体抗体片段外,多肽的片段还包括,例如,蛋白酶水解片段以及缺失片段。例如,多肽的变体包括如上所述的片段,以及因氨基酸取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。在某些方面中,变体可以是非天然产生的。可使用本领域已知的诱变技术生成非天然产生变体。变体多肽可包含保守或非保守性氨基酸取代、缺失或添加。衍生物是已经改变从而显示原始多肽上不存在的其它特征的多肽。例子包括融合蛋白。多肽变体在本文中也可称作“多肽类似物”。本文所用的多肽的“衍生物”还可指:具有通过功能侧基的反应经由化学方法衍生的一个或多个氨基酸的对象多肽。“衍生物”还包括含有20种标准氨基酸中的一个或多个衍生形式的那些肽。例如,4-羟基脯氨酸可取代脯氨酸;5-羟基赖氨酸可取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可取代组氨酸;高丝氨酸可取代丝氨酸;且鸟氨酸可取代赖氨酸。

[0064] “保守性氨基酸取代”是其中一个氨基酸被具有相似侧链的另一个氨基酸替代的情况。本领域中已定义了具有类似侧链的氨基酸的家族,包括碱性侧链(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 $\beta$ -分支侧链(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,苯丙氨酸取代酪氨酸是保守取代。在某些实施方式中,本文提供的多肽和抗体的序列中的保守取代不废除包含所述氨基酸序列的多肽或抗体与所述结合分子结合的抗原的结合。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸

保守取代的方法是本领域熟知的(参见,例如,BrummeII等,Biochem.32:1180-1 187 (1993);Kobayashi等,Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等,Proc.NatI.Acad.Sci.USA 94:.412-417(1997))。

[0065] 术语“多核苷酸”意在包括单个核酸和多个核酸,指分离的核酸分子或构建物,例如信使RNA(mRNA)、cDNA或质粒DNA(pDNA)。多核苷酸可包含常规磷酸二酯键或非常规键(如酰胺键,如肽核酸(PNA)中发现的酰胺键)。术语“核酸”或“核酸序列”指多核苷酸中存在的任何一种或多种核酸区段,如DNA或RNA片段。

[0066] “分离的”核酸或多核苷酸意为与其原始环境分离的核酸或多核苷酸的任何形式。例如,凝胶纯化的多核苷酸,或编码载体中所含多肽的重组多核苷酸将被视作是“分离的”。并且,经工程改造具有克隆的限制性位点的多核苷酸区段(例如PCR产物)也被认为是“分离的”。分离的多核苷酸的其它示例包括在异源性宿主细胞中维持的重组多核苷酸或在非原始溶液(例如缓冲液或盐水)中(部分地或基本上地)纯化的重组多核苷酸。分离的RNA分子包括多核苷酸的体内或体外RNA转录本,其中,所述转录本不是自然中存在的转录本。分离的多核苷酸或核酸还包括通过合成方式产生的这样的分子。此外,多核苷酸或核酸可以是或可包括调节元件例如启动子、核糖体结合位点,或转录终止子。

[0067] 本文所用术语“非天然产生的”多核苷酸、或其任意语法变体是是条件术语,其明确排除,但仅排除本领域普通技术人员熟知的“天然产生的”,或者可以是在任何时间,由法官或行政机关或司法机关确定或理解为“天然产生的”多核苷酸的那些形式。

[0068] 本文所用的术语“编码区”是由翻译成氨基酸的密码子组成的核酸部分。虽然“终止密码子”(TAG、TGA或TAA)不翻译成氨基酸,但它可被认为是编码区的一部分,而任何侧接序列如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等均不是编码区的一部分。两个或更多个编码区可存在于单一多核苷酸构建物中,例如在单一载体上,或者在分开多核苷酸构建物中,例如在单独(不同)载体上。此外,任何载体均能包含单一编码区,或可包含两个或更多个编码区,例如,单一载体可分开编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。此外,载体、多核苷酸或核酸可包括异源性编码区,其融合或未融合至另一个编码区。异源性编码区包括不限于,编码专有的元件或基序(例如分泌信号肽或异源性功能结构域)的那些。

[0069] 在某些实施方式中,所述多核苷酸或核酸是DNA。对DNA而言,包含多肽编码核酸的多核苷酸通常可以包含启动子和/或其它转录或翻译控制元件,这些元件与一个或多个编码区可操作连接。操作性连接指当基因产物如多肽的编码区与一个或多个调控序列以此方式连接时,将该基因产物的表达置于该调控序列的影响或控制下。如果启动子功能的诱导使编码所需基因产物的mRNA转录,且如果两个DNA片段间连接的属性不干扰表达调控序列指导基因产物表达或不干扰转录DNA模板的能力,则两个DNA片段(如多肽编码区及其相连的启动子)“操作性连接”。因此,如果启动子能够影响核酸的转录,则启动子区域与多肽编码核酸操作性连接。启动子可以是在预定细胞中指导DNA实质转录的细胞特异性启动子。启动子以外的其它转录控制元件如增强子、操纵子、阻遏物和转录终止信号,能与多核苷酸可操作连接以指导细胞特异性转录。

[0070] 多种转录控制区对于本领域技术人员而言是已知的。它们包括但不限于在脊椎动物细胞中发挥作用的转录控制区,例如但不限于,来自巨细胞病毒(立即早期启动子,与内

含子-A联用)、猿病毒40(早期启动子)和逆转录病毒(如劳氏肉瘤病毒)的启动子和增强子区段。其它转录控制区包括源自脊椎动物基因的那些,例如肌动蛋白、热激蛋白、牛生长激素和兔 $\beta$ -球蛋白,以及能够控制真核细胞中的基因表达的其它序列。其它合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及淋巴因子诱导型启动子(例如,通过干扰素或白介素诱导的启动子)。

[0071] 类似地,本领域普通技术人员了解各种翻译控制元件。它们包括但不限于:核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子以及衍生自小核糖核酸病毒的元件(特别是内部核糖体进入位点或IRES,也称为CITE序列)。

[0072] 在其它实施方式中,多核苷酸可以是RNA,例如,信使RNA(mRNA)、转移RNA或核糖体RNA的形式。

[0073] 多核苷酸和核酸编码区可与编码分泌或信号肽的其它编码区相关联,所述编码分泌或信号肽引导本文所述的多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假说,哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,一旦生长的蛋白质链向粗面内质网外的输出过程启动,所述序列从成熟蛋白质上切除。本领域普通技术人员了解,脊椎动物细胞分泌的多肽可具有融合于所述多肽N末端的信号肽,它们从完整或“全长”多肽上切割产生分泌或“成熟”形式的多肽。在某些实施方式中,使用天然信号肽,例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或者使用仍然能够指导与其操作性相连多肽分泌的该序列的功能衍生物。或者,可采用异源性哺乳动物信号肽,或其功能衍生物。例如,野生型前导序列可用小鼠 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶或人组织纤溶酶原激活剂(TPA)的前导序列取代。

[0074] 本文公开了某些结合分子,或抗原结合片段、变体、或其衍生物。除非特定地述及全尺寸抗体,否则术语“结合分子”涵盖全尺寸抗体以及所述抗体的抗原结合亚基、片段、变体、类似物或衍生物,例如,以类似于抗体分子的方式结合抗原但采用不同的支架的工程改造的抗体分子或片段。

[0075] 本文中所述的术语“结合分子”以其最宽泛的含义指特异性结合受体(例如,表位或抗原决定簇)的分子。如本文进一步描述,结合分子可包含一种或多种本文所述“抗原结合结构域”。结合分子的非限制性示例是抗体或其保持抗原-特异性结合的片段。

[0076] 术语“结合结构域”和“抗原结合结构域”在本文中可互换使用,并且指的是必需且足以特异性结合表位的结合分子的区域。例如,“Fv”,例如,抗体的可变重链和可变轻链,作为两个分开多肽亚基或作为单一链,被视作是“结合结构域”。

[0077] 其它抗原结合结构域包括但不限于,源自骆驼科物种的抗体的可变重链(VHH),或在纤连蛋白支架上表达的六个免疫球蛋白互补决定区(CDR)。本文所述的“结合分子”可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个或更多个“抗原结合结构域”。

[0078] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用。抗体(或其片段、变体或衍生物,如本文所述)包括至少重链的可变区(对于骆驼科物种而言)或至少重链和轻链的可变区。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构是相对较好地了解的。参见例如,Harlow等,《抗体:实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2版,1988)。除非另有说明,术语“抗体”涵盖从抗体的小抗原结合片段到全尺寸抗体的范围内的任何物质,例如,IgG抗体,其包括两条完整重链和两

条完整轻链, IgA抗体, 其包括四条完整重链和四条完整轻链, 并且可以包括J链和/或分泌型组分, 或IgM抗体, 其包括十条或十二条完整重链和十条或十二条完整轻链, 并且可以包括J链。

[0079] 正如下文中更详细讨论, 术语“免疫球蛋白”包括可通过生化性质区分的各种类型多肽。本领域技术人员应理解, 重链分为gamma、mu、alpha、delta、或epsilon ( $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ ), 其中还有一些亚类(如 $\gamma 1-\gamma 4$ 或 $\alpha 1-\alpha 2$ )。该链的特性决定抗体“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等已被充分表征, 且已知赋予功能特化。根据本文公开内容, 本领域技术人员不难区分这些类别和同种型的修饰形式, 因此, 它们涵盖在本公开范围内。

[0080] 轻链分类为kappa或lambda ( $\kappa$ 、 $\lambda$ )。各重链类别可与 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链结合。通常, 轻链和重链互相共价结合, 并且当由杂交瘤、B细胞或遗传工程改造的宿主细胞生成免疫球蛋白时, 两条重链的尾撮部分通过共价二硫键或非共价连接结合在一起。在重链中, 氨基酸从Y构型的分叉末端处的N-端到各条链的底部处的C-端。某些抗体(例如, IgG抗体)的基础结构包括两条重链亚基和两条轻链亚基, 其通过二硫键共价连接以形成“Y”结构, 也在本文中称为“H2L2”结构, 或“结合单元”。

[0081] 术语“结合单元”在本文中用于指结合分子的部分, 例如, 对应标准免疫球蛋白结构的抗体或其抗原结合片段, 即两条重链或其片段和两条轻链或其片段, 或来自例如骆驼或软骨鱼(condricthoid)抗体的两条重链或其片段。在某些方面, 例如当结合分子是单一结合单元IgG抗体或其抗原结合片段, 术语“结合分子”和“结合单元”是等同的。在另一方面, 例如结合分子是IgA二聚体、IgM五聚体或IgM六聚体, 结合分子是“多聚化的”并且包含两个或更多个“结合单元”。分别地, 在IgA二聚体的情况中是两个, 或在IgM五聚体或六聚体的情况中是五个或六个。结合单元不必包括全长抗体重链和轻链, 但通常将是二价的, 即将包括两个“抗原结合结构域”, 如下定义。本文提供的某些结合分子是五聚化或六聚化的, 并且包括五个或六个二价结合单元, 其包括IgM恒定区或其片段。

[0082] 本文所用包含两个或更多个, 例如, 两个、五个或六个结合单元的结合分子可以被称为称为“多聚化的”。术语“多聚化的”指具有超过一个单元。因此, 例如, 一个“多聚化结合分子”可以具有超过一个结合单元。多聚化结合分子可以具有多达两个、三个、四个、五个或甚至六个或更多个结合单元。

[0083] 本文所述术语“天然序列的J链”或“天然J链”指各种动物物种的天然序列的IgM或IgA抗体的J链, 包括成年人J链, 其氨基酸序列在SEQ ID NO:54中。

[0084] 本文所述术语“修饰的J链”指天然序列的J链多肽的变体, 其含有异源性部分, 例如, 异源多肽, 例如, 引入天然序列的外来结合结构域。该引入可以通过各种方式实现, 包括异源多肽或其它部分的直接或间接融合或通过化学或肽接头的链接。术语“修饰的人J链”涵盖但不限于通过异源性部分的引入(例如, 异源多肽, 例如, 外来结合结构域)进行修饰的氨基酸序列SEQ ID NO:54的天然序列的人J链或其功能性片段。在某些部分, 该异源性部分不干扰IgM到五聚体或IgA到二聚体的高效聚合以及这些聚合物与靶标的结合。示例性的经修饰的J链参见例如PCT公开号W0 2015/153912, 其通过引用全文纳入本文。

[0085] 术语“价”、“二价”、“多价”和语法等同形式, 指的是给定的结合分子或结合单元中抗原结合结构域的数量。如此, 述及给定的结合分子, 术语“二价”、“四价”和“六价”分别表

示存在两个抗原结合结构域、四个抗原结合结构域,和六个抗原结合结构域。在典型的IgM源性的结合分子中,各结合单元是二价的,然而该结合分子本身可具有10或12价。二价或多价结合分子可以是单特异性的,即,所有的抗原结合结构域是相同的,或可以是双特异性的或多特异性的,例如,其中两个或更多个抗原结合结构域是不同的,例如,结合相同抗原上的不同表位,或结合完全不同的抗原。

[0086] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体的任何分子决定簇。在某些方面,表位可包括分子的化学活性的表面基团(例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基基团),并且在某些方面,表位可具有三维结构特点,和/或特定的电荷特点。表位是由抗体结合的靶标的区域。

[0087] “多特异性结合分子或抗体”或“双特异性结合分子或抗体”指结合分子、抗体、或其抗原结合片段,其具有与两个或多个不同的表位在相同或不同靶标上特异性结合的能力。“单特异性”指与唯一一种表位结合的能力。

[0088] 术语“靶标”以最广泛的含义使用以包括可由结合分子结合的物质。靶标可以是,例如,多肽、核酸、碳水化合物、脂质或其它分子。此外,例如,“靶标”可以是包含可被结合分子结合的表位的细胞、器官或生物体。

[0089] 抗体轻链和重链都划分成结构和功能同源性的区域。从功能角度使用术语“恒定”和“可变”。在这方面,应当理解的是可变轻(VL)链或可变重(VK)链部分的可变区(可被称为“可变结构域”,在本文中可交换地使用)决定抗原识别和特异性。相反,轻链的恒定区(CL)和重链的恒定区(例如,CH1、CH2或CH3)提供生物学特性,例如分泌、跨胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等。按照习惯,恒定区结构域的编号随着远离抗原结合位点或抗体的N末端而增加。N末端部分是可变区,并且C末端部分是恒定区;CH3(或在IgM的情况中的CH4)和CL结构域实际上分别是重链和轻链的羧基端。

[0090] “全长IgM抗体重链”是这样的多肽,其以N末端向C末端的方向包括,抗体重链可变区(VH)、抗体重链恒定结构域1(CM1或C $\mu$ 1)、抗体重链恒定结构域2(CM2或C $\mu$ 2)、抗体重链恒定结构域3(CM3或C $\mu$ 3),和抗体重链恒定结构域4(CM4或C $\mu$ 4),其可还包括尾片段。

[0091] “全长IgA抗体重链”是这样的多肽,其以N末端向C末端的方向包括,抗体重链可变区(VH)、抗体重链恒定结构域1(CA1或C $\alpha$ 1)、抗体重链恒定结构域2(CA2或C $\alpha$ 2),和抗体重链恒定结构域3(CA3或C $\alpha$ 3),以及尾片段。单体IgA或分泌IgA的结构在例如Woof, JM和RusseII, MW,《粘膜免疫学(Mucosal Immunology)》4:590-597(2011)中描述。

[0092] 如上所述,可变区,即所述“抗原结合结构域”允许结合分子选择性地识别抗原上的表位并特异性地结合该表位。也就是说,例如抗体的结合分子的VL结构域和VH结构域、或这些互补决定区(CDR)亚组组合形成确定三维抗原结合位点的可变区。更具体地,抗原结合位点由各VH和VL链上的三个CDR确定。某些抗体形成较大结构。例如,IgA可形成这样的分子,该分子包括两个H2L2结合单元和J链,全部通过二硫键共价连接,并且IgM可形成这样的五聚或六聚分子,该分子包括五个或六个H2L2单元和在一些实施方式中通过二硫键共价连接的J链。在某些实施方式中,聚合的IgA和IgM分子可以还含有分泌性组分,其也可以通过二硫键共价连接。

[0093] 抗体抗原结合结构域中存在的六个“互补决定区”或“CDR”是氨基酸的非连续短序列,其特异性地定位,以随着抗体在水性环境中采用其三维构型而形成抗原结合结构域。抗原结合结构域中的其余氨基酸称为“构架”区,显示较小的分子间差异。构架区主要采用 $\beta$ -

片层构象,并且CDR形成连接 $\beta$ -片层结构的环,和某些情况下形成部分链接 $\beta$ -片层结构的环。因此,构架区用于通过链间非共价相互作用形成为CDR提供正确方向位置的支架。定位的CDR形成的抗原结合结构域确定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这种互补表面促进了抗体与其互补表位的非共价结合。分别组成CDR和构架区域的氨基酸,可由本领域普通技术人员通过任何给定的重或轻链可变区而容易地鉴定,因为它们已以多种不同的方式被定义(参见,“免疫学热门蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”,Kabat,E.等,美国卫生及公共服务部(U.S.Department of Health and Human Services), (1983);和Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.,196:901-917(1987),其通过引用其全文纳入本文)。

[0094] 除非明确表述为相反的含义,否则在本领域内所使用和/或接受的某一术语有两种或多种定义的情况下,本文所用的术语定义应包括所有这些含义。具体示例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非毗连抗原结合位点。”这些具体的区域已被描述,例如,由Kabat等,美国卫生及公共服务部,“免疫学热门蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”(1983),和由Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987),其通过引用纳入本文。Kabat和Chothia定义包括氨基酸在彼此比较时的重叠或子集。不过,除非另有说明,述及抗体或其变体的CDR的定义(或本领域普通技术人员已知的其它定义)意图落在本文定义或所用的术语范围之内。如上文引用的各参考文献中定义的合适的涵盖CDR的氨基酸,如下表1所示以作对比。涵盖具体CDR的确切氨基酸编号将根据CDR的序列和大小而变化。鉴于抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规地确定哪些氨基酸包含具体CDR。

[0095] 表1 CDR定义\*

[0096]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[0097] \*表1中所有CDR定义的编号均按照Kabat等所述的编号规则(见下文)。

[0098] 可以使用例如IMGT信息系统([www://imgt.cines.fr/](http://imgt.cines.fr/)) **IMGT®/V-Quest**)对免疫球蛋白可变区进行分析,以鉴定不同区段,包括CDR。(参见例如,Brochet等,Nucl.Acids Res.,36:W503-508,2008)。

[0099] Kabat等还定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员能明确地将所述“Kabat编号系统”应用于任何可变区序列,而不依赖序列本身外的任何实验数据。本文所用的“Kabat编号”指由Kabat等,美国卫生与公众服务部,“免疫学上感兴趣的蛋白序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”中所述的编号系统。除非明确注明采用Kabat编号系统,否则,对本公开的全部氨基酸序列采用连贯的编号。

[0100] 结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包括但不限于,多克隆、

单克隆、人、人源化的或嵌合抗体、单一链抗体、表位-结合片段,例如,Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fvs、单链Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fvs(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、通过Fab表达文库产生的片段。ScFv分子是本领域已知的,并且描述于例如美国专利号5,892,019。本公开所涵盖的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型(如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2等)或小类的免疫球蛋白分子。还可以预期的是免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR)同种型,其是二价的并且含有包括IgNAR可变区(VNAR)的单链。(参见Walsh等,ViroI.,411:132-141,2011)。

[0101] “特异性结合”一般表示结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物通过其抗原结合结构域结合表位,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间的一些互补性。按照这一定义,当结合分子通过其抗原结合结构域与表位结合比其与随机、无关的表位结合更容易时,称该结合分子“特异性结合”该表位。本文中使用的术语“特异性”定性分析某一抗体与某一表位结合的相对亲和性。例如,可认为结合分子“A”比结合分子“B”对给定表位具有更高特异性,或者说结合分子“A”以比对相关表位“D”的特异性更高的特异性结合表位“C”。

[0102] 可以说本文公开的结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物,以小于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^{-3} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 、或 $10^{-5} \text{秒}^{-1}$   $5 \times 10^{-6} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^{-6} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7} \text{秒}^{-1}$ 或 $10^{-7} \text{秒}^{-1}$ 的解离速率(k(off))结合靶标抗原。

[0103] 可以说本文公开的结合分子,例如,抗体或抗原结合片段、变体或衍生物,以大于或等于 $10^3 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^5 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、或 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 或 $10^7 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 的结合速率(k(on))结合靶标抗原。

[0104] 如果结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物,以一定程度上阻断参比抗体或抗原结合片段与表位的结合的程度优先结合该表位,则可以说,该结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物竞争性地抑制参比抗体或抗原结合片段与给定的表位的结合。可通过本领域已知的任意方法确定竞争性抑制,例如,竞争ELISA试验。可以说,结合分子竞争性地抑制参比抗体或抗原结合片段与给定表位的至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%的结合。

[0105] 本文所用的术语“亲和性”指单独表位与例如免疫球蛋白分子的一个或多个结合结构域结合的强度量度。参见例如,Harlow等,《抗体:实验室手册》(Antibodies: A Laboratory Manual)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2版,1988),第27-28页。本文中所用的术语“亲合力(avidity)”指的是抗原结合结构域的群体和抗原之间的复合物的总体稳定性。参见,例如,Harlow,第29-34页。亲合力既与群体中单独抗原结合结构域与特定表位的亲和性相关,也与免疫球蛋白分子和抗原的价态相关。例如,二价单克隆抗体和具有高度重复表位结构的抗原例如多聚体之间的相互作用是具有高亲合力的一个例子。二价单克隆抗体与以高密度存在于细胞表面的受体之间的相互作用也将具有高亲合力。

[0106] 本文公开的结合分子或其抗原结合片段、变体或衍生物也可就其交叉反应性进行描述或说明。本文所用的术语“交叉反应性”指对某一种抗原具有特异性的结合分子(例如抗体或其片段、变体或衍生物)与第二种抗原发生反应的能力;它是两种不同抗原性物质之间关联性的量度。因此,如果结合分子与诱导其形成的表位以外的其他表位结合,则具有交

叉反应性。交叉反应性表位通常含有许多与诱导表位相同的互补结构特征,在某些情况下甚至比原始表位更匹配。

[0107] 结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物还可就其与抗原的结合亲和性来描述或说明。例如,结合分子可以不超过 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 $10^{-2} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 $10^{-3} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $10^{-4} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $10^{-5} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $10^{-6} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $10^{-7} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $10^{-8} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $10^{-9} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $10^{-10} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $10^{-11} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 $10^{-12} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 $10^{-13} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 $10^{-14} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 或 $10^{-15} \text{M}$ 的解离常数或 $K_D$ 结合抗原。

[0108] 包括单链抗体或其它结合结构域的抗体片段可单独存在或以如下一种或多种的组合的形式存在:铰链区、CH1、CH2、CH3或CH4结构域、J链,或分泌型组分。还包括抗原结合片段,其可包括一个或多个可变区与铰链区、CH1、CH2、CH3或CH4结构域、J链或分泌型组分中的一个或多个的任何组合。结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段,可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。所述抗体可以是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲鸵、马或鸡抗体。在另一个实施方式中,可变区可以是软骨鱼(condricthoid)来源(例如,来自鲨鱼)。本文中所用的“人”抗体包括,具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,且包括从人免疫球蛋白文库分离的或来自一种或多种人免疫球蛋白的动物转基因的抗体,并且其可在一些示例中表达内源性免疫球蛋白,但一些则不是,如下文所述,例如,描述于Kucherlapati等的美国专利号5,939,598。

[0109] 本文中所用的术语“重链亚基”或“重链结构域”包括这样的氨基酸序列,其源自免疫球蛋白重链、结合分子,例如,包含重链亚基的抗体,可包括如下至少一项:VH结构域、CH1结构域、铰链(例如,上部、中部和/或下部铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域、CH4结构域,或其变体或片段。例如,结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物,除了VH结构域以外,还可包括但不限于:CH1结构域;CH1结构域,铰链和CH2结构域;CH1结构域和CH3结构域;CH1结构域,铰链和CH3结构域;或CH1结构域,铰链结构域,CH2结构域和CH3结构域。在某些方面中,结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物,除VH结构域以外,还可包括,CH3结构域和CH4结构域;或CH3结构域,CH4结构域和J链。此外,用于本公开的结合分子可缺乏某些恒定区部分,例如,CH2结构域的全部或部分。本领域普通技术人员应理解,可修饰这些结构域(例如重链亚基),从而其氨基酸序列不同于原始免疫球蛋白分子。

[0110] 结合分子,例如抗体或其片段的重链亚基可以包括衍生自不同免疫球蛋白分子的结构域。例如,多肽的重链亚基可以包括衍生自IgG1分子的CH1结构域和衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个示例中,重链亚基可以包括部分衍生自IgG1分子、部分衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个示例中,重链部分可以包括部分衍生自IgG1分子、部分衍生自IgG4分子的嵌合铰链。

[0111] 本文所用的术语“轻链亚基”或“轻链结构域”包括衍生自免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。轻链亚基包括至少VL或CL(例如,C $\kappa$ 或C $\lambda$ )结构域中的至少一个。

[0112] 结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可就它们识别或特异性结合的表位或抗原部分进行描述或说明。靶抗原与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶抗原可包含单个表位,或至少两个表位,并可包括任意数量的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。

[0113] 如前所述,各种免疫球蛋白类别的恒定区的亚基结构和三维构型是众所周知的。

本文所用的术语“VH区”或“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变区,术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(最靠氨基末端)恒定区结构域。CH1结构域邻近VH结构域,并且位于典型IgG重链分子的铰链区的氨基末端。

[0114] 本文所用的术语“CH2结构域”包括这样的重链分子部分,其例如从IgG抗体的约氨基酸244延伸到氨基酸360,采用常规的编号方案(氨基酸244至360,Kabat编号系统;和氨基酸231-340,EU编号系统;参见Kabat EA等,同前)。CH3结构域从CH2结构域延伸至IgG分子的C末端并且包含约108个氨基酸。某些免疫球蛋白类别,例如,IgM,还包括CH4区。

[0115] 本文中所述的术语“铰链区”包括在IgG、IgA和IgD重链中将CH1结构域接合至CH2结构域的重链分子的部分。该铰链区包含约25个氨基酸并且是柔性的,因此允许两个N末端抗原结合区域独立地移动。

[0116] 本文所用的术语“二硫键”包括两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含可形成二硫键或桥接第二巯基基团的巯基基团。在某些IgG分子中,CH1和CL区域通过二硫键相连,两条重链通过对应于Kabat编号系统239和242位(EU编号系统是226或229位)的两个二硫键相连。

[0117] 本文所用的术语“嵌合抗体”指这样的抗体,其中免疫反应性区域或位点获自或衍生自第一物种,而恒定区(其可能是完整、一部分或修饰的)获自第二物种。在一些实施方式中,靶标结合区或位点将是来自非人来源(例如,小鼠或灵长类)并且恒定区是人的。

[0118] 术语“多特异性抗体”或“双特异性抗体”指的是在单一抗体分子(或“结合单元”)中具有对两个或更多个不同表位具有特异性的抗原结合结构域的抗体。可构建除了标准抗体结构以外的具有两种不同结合特异性的其它结合分子。由双特异性抗体或多特异性抗体进行的表位结合可以是同时或相继的。三元杂交瘤(trioma)和杂合杂交瘤是可分泌双特异性抗体的细胞系的两个示例。双特异性抗体还可通过重组手段构建。(Ströhlein和Heiss, Future OncoI. 6:1387-94 (2010); Mabry和SnaveIy, IDrugs. 13:543-9 (2010)。13:543-9 (2010)。双特异性抗体也可以是双特异抗体(diabody)。因此,多聚化的双特异性结合分子可潜在具有若干不同的抗原结合结构域,各具有不同的特异性。例如,IgM结合分子可以被认为是多聚化的,其含有五个或六个结合单元,并且各结合单元可能具有两个抗原结合结构域。在这样的IgM结合分子中,其中可以有至多两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、或甚至12个不同的特异性,因为每个抗原结合结构域可以与不同的、可辨识的表位结合。

[0119] 本文中所述的术语“工程改造的抗体”指的是这样的抗体,其中重链和轻链之一或两者中的可变区通过在CDR或构架区域的一个或多个氨基酸的至少部分替代而被改变。在某些方面中,来自具有已知特异性的抗体的整个CDR可被移植到异源性抗体的构架区域中。虽然替代性的CDR可衍生自与产生构架区的抗体属于同一类或甚至亚类的抗体,但CDR仍可衍生自不同类别的抗体,例如,不同物种的抗体。将来自具有已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR移植到人重链或轻链构架区内形成的工程改造的抗体在本文中称为“人源化抗体”。在某些方面,并非全部CDR由来自供体可变区的完整CDR替代,而供体的抗原结合能力仍可被转移至受者可变结构域。鉴于例如美国专利号5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370中给出的解释,本领域技术人员完全有能力通过进行常规实验法或通过试验和误差检定来获得功能工程改造的或人源化的抗体。

[0120] 本文所用的术语“工程改造的”包括通过合成手段(例如通过重组技术、体外肽合成,通过酶或化学偶联肽,或这些技术的一些组合)进行的核酸或多肽分子的操作。

[0121] 本文中所述的术语“连接的”、“融合的”或“融合”或其它语法等同形式可互换使用。这些术语指通过包括化学偶联或重组在内的方式将两个或更多元件或组件连接在一起。“框内融合”指以维持原始多核苷酸开放阅读框(ORF)翻译读框的方式,将两个或多个ORF连接形成连续的较长ORF。因此,重组融合蛋白是包含两个或多个区段的单一蛋白质,所述区段对应原始ORF编码的多肽(这些区段在自然条件下通常不如此连接)。尽管因此阅读框在融合片段中是连续的,但区段仍可被物理或空间分隔,如框内接头序列。例如,编码免疫球蛋白可变区CDR的多核苷酸可框内融合,但用编码至少一个免疫球蛋白构架区或额外CDR区的多核苷酸间隔开,前提是“融合的”CDR作为连续多肽的一部分共同翻译。

[0122] 对于多肽而言,“线性序列”或“序列”是多肽中从氨基到羧基末端方向上氨基酸的顺序,在序列中彼此相邻的氨基酸是多肽一级结构中的毗连残基。

[0123] 多肽的部分位于在连续的多肽链中出现得较早的多肽的另一部分的“氨基末端”或“N末端”。类似地,多肽的部分位于在连续的多肽链中出现得较晚的多肽的另一部分的“羧基末端”或“C末端”。例如,在典型的抗体中,可变区位于恒定区的“N末端”,并且恒定区位于可变区的“C末端”。

[0124] 本文所用的术语“表达”指基因生成生化物质如多肽的过程。该过程包括在细胞内基因功能存在的任何表现,包括但不限于,基因以及瞬时表达和稳定表达。它包括但不限于,基因转录成信使RNA(mRNA)和这类mRNA翻译成多肽。如果所需的最终产物是生化物质(biochemical),则表达包括产生该生化物质和任何前体。基因的表达产生“基因产物”。本文中所述的基因产物可以是核酸,例如,通过基因转录产生的信使RNA,或由转录本翻译的多肽。本文所述的基因产物还包括具有转录后修饰的核酸,例如聚腺苷酸化,或具有翻译后修饰的多肽,如甲基化、糖基化、加入脂质、连接其它蛋白质亚基、经蛋白酶水解切割等。

[0125] 术语例如“治疗(treating)或“治疗(treatment)”或“以治疗(to treat)”或“缓解(alleviating)”或“以缓解(to alleviate)”指的是治愈、减缓、减少现存的已经诊断的病理病症或紊乱的症状,和/或截停或减缓现存的已经诊断的病理病症或紊乱的进展的治疗性措施。术语例如“预防(prevent)”、“预防(prevention)”、“避免”、“遏制(deterrence)”等指的是预防未经诊断的目标病理病症或紊乱的进展的预防性的或预防用的措施。因此,“需要治疗的那些(对象)”可包括已经患有疾病的那些(对象);易于患有疾病的那些(对象);和需要预防疾病的那些(对象)。

[0126] “对象”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”指需要诊断、预防或治疗的任何对象,特别是哺乳动物对象。哺乳动物对象包括人、家养动物、家畜和动物园动物、竞技动物或宠物,如犬、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、猪、奶牛、熊等。

[0127] 本文中所述的短语例如“将受益于治疗的对象”和“有治疗需求的动物”包括这样的对象,例如哺乳动物对象,其将受益于结合分子例如包含一个或多个抗原结合结构域的抗体的给予。所述结合分子,例如,抗体,可用于,例如,诊断性操作方法和/或用于疾病的治疗或预防。

[0128] 本文中所述乙型肝炎表面抗原,或“HBsAg”指HBV的表面糖蛋白。由HBV基因组中三个独立的启动密码子生成三种尺寸的HBsAg。该基因产物的小、中和大型是三种指定的结构

域中的一种或多种的组合：(i) 单独的S(S)，(ii) 前S2和S(M)，或(iii) 前S1和前S2和S(L) (图1A)。HBsAg在血清型和菌株中不同，但是一个示例性的“L”型HBsAg包括如下的氨基酸序列：

[0129] MGGWSSKPRKGMGTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANSN  
NPDWDFNPIKDHWPAANQVGVGAFGPGGLTPPHGGILGWS  
PQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQAM  
QWNSTAFHQALQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASH  
 [0129] ISSISARTGDPVTNMENTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIP  
 QSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCPPICP  
 GYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPG  
 STTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFSCCCTKPTDGNCTCIPIS  
 SWAFAYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWL  
 [0130] SAIWMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPIFFCLWVYI (SEQ ID  
 NO: 79).

[0131] 其中前S1区带有下划线，并且前S2区带有双下划线。前体HBsAg，包括信号肽，如下所示：

[0132] MEWSWVFLFFLSVTTGVHSMGGWSSKPRKGMGTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANSNPDWDFNPIKDHWPAANQV  
 GVGAFGPGGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPR  
 VRGLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISARTGDPVTNMENTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTS  
 LNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTT  
 TSTGPCKTCTTPAQGNSMFSCCCTKPTDGNCTCIPISWAFAYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWL  
 SAIWMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPIFFCLWVYI) SEQ ID NO: 78) .

[0133] 本文中所用HBsAg的“前S1区”指HBsAg的108-氨基酸N末端，其含有与如下氨基酸序列至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或100%相同的氨基酸序列：

[0134] MGGWSSKPRQGMGTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANSNPDWDFNPNKDQWPEANQVGVGAFGPGFTPPHGGLLW  
SPQAQGILTTVPAAPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQA (SEQ ID NO: 60) .

[0135] SEQ ID NO: 60衍生自HBV的ad血清型，但是HBsAg的该区域在HBV血清型之间具有保守性。已经证明，中和性单克隆抗体结合跨越氨基酸20至47的区域(带下划线)例如，涉及小鼠抗体KR127的抗体(参见例如，美国专利号7,115,723、美国专利号8,420,353, Hong等, ViroI., 318:131-141, 2004, 以及Kim, J.H., 等, FEBS Letters 589:193-200 (2015))与SEQ ID NO: 60的氨基酸37至47中的表位结合。单克隆抗体2D028 (WO 2011/045079A1)与SEQ ID NO: 60的氨基酸37至47中的表位结合。另一前S1抗体, F35.25 (Petit, 等, MoI ImmunoI. 1989 六月; 26 (6) :531-7)与SEQ ID NO: 60的氨基酸32至53中的表位结合。另一前S1抗体, F35.25 (Petit, 等, MoI ImmunoI. 509 六月; 26 (463) :-4682001)与前S1的ay血清型 (NTANPDW, SEQ ID NO: 77)的氨基酸37至43中的表位结合。该前S1区参与干细胞受体结合(图1A和图1B)。

[0136] 本文所用乙型肝炎X蛋白或X抗原 (HBxAg) 指由乙型肝炎病毒产生的154氨基酸X蛋白。HbxAg含有与如下氨基酸序列至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或100%相同的氨基酸序列：

[0137]

MAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAE SRGRPVSGPFGTLPSPSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSAR  
RMETTVAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEEIRLKV FVLGGCRHKLVCSPAPCNFFTSA  
(SEQ ID NO:61).

[0138] 该蛋白可参与肝细胞癌 (HCC) 的产生 (Seifer, M., 等, J Hepatology; 13 (增刊4): S61-S65)。已经证明, 针对HbxAg的抗体减小肿瘤尺寸并在患有HCC肿瘤的小鼠中提高存活率 (Li等, Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 1996Apr; 76 (4): 271-4)。

[0139] IgM结合分子

[0140] IgM是通过B细胞响应抗原刺激产生的第一种免疫球蛋白, 并且以约1.5mg/ml在血清中以5天的半衰期存在。IgM是典型的多聚体, 例如, 五聚化或六聚化分子。因此, IgM是“多聚化的”结合分子。五个、或六个IgM结合单元中的各IgM结合单元包括两条轻链和两条重链。尽管IgG如上所述包含三个重链恒定结构域 (CH1、CH2和CH3), IgM的重( $\mu$ )链还包含第四恒定结构域 (CH4), 其包括C末端“尾片段”。人IgM恒定区通常包含氨基酸序列SEQ ID NO: 53。人C $\mu$ 1区的范围是SEQ ID NO:53的约氨基酸5至约氨基酸102; 人C $\mu$ 2区的范围是SEQ ID NO:53的约氨基酸114至约氨基酸205, 人C $\mu$ 3区的范围是SEQ ID NO:53的约氨基酸224至约氨基酸319, C $\mu$ 4区的范围是SEQ ID NO:53的约氨基酸329至约氨基酸430, 并且所述尾片段的范围是SEQ ID NO:53的约氨基酸431至约氨基酸453。人IgM恒定区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:53) 如下所示:

[0141] GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVL RGGKYAATS  
QVLLPSKDV MQGTDEHV VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQV  
SWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKYVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQD TAIR  
VFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSNGER  
FTCTVTHTDLP SPLKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKY  
VTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRV TERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

[0142] IgM结合分子可以包含这样五个结合单元 (各自为“IgM结合单元”), 其可以与另一条小多肽链 (J链) 形成复合物, 以形成五聚化IgM结合分子。人J链包含氨基酸序列SEQ ID NO:54。在没有J链的情况下, IgM结合单元通常组装成六聚体。尽管不希望受理论限制, 认为IgM结合单元组装成六聚化或六聚化结合分子涉及C $\mu$ 3和C $\mu$ 4结构域。因此, 本公开提供的五聚化或六聚化结合分子通常包括IgM恒定区, 其包括至少C $\mu$ 3和C $\mu$ 4结构域。人J链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:54) 如下所示:

[0143] MKNHLLFWGVLA VFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARI TSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNR  
ENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKM  
VETALTPDACYPD

[0144] IgM重链恒定区还可包括C $\mu$ 2结构域或其片段、C $\mu$ 1结构域或其片段, 和/或其它IgM重链结构域。在某些方面中, 本文所提供的结合分子可以包括完整的IgM重( $\mu$ )链恒定结构域, 例如, SEQ ID NO:53或其变体、衍生物或类似物。

[0145] 五聚化或六聚化IgM HBV结合分子

[0146] 本公开提供五聚化或六聚化HBV结合分子, 即, 具有如本文所定义的五或六个“结合单元”的结合分子, 其可特异性地与HBV抗原结合, 例如, HBsAg, 例如, HBsAg的前S1区。

相较于由单一结合单元组成的结合分子,例如,二价IgG抗体,本文所提供的结合分子可具有改善的结合特点或生物活性。换言之,本文所提供五聚化或六聚化IgM结合分子在某些实施方式中增强病毒的清除,并且相较于只含有两个HBV特异性抗原结合结构域的参照单结合单元更有效。对术语“改善的结合特点”进一步的说明如下。本文所提供的五聚化或六聚化IgM结合分子,当给予需要其的个体后,可以表现出可凭经验确定的更强,更有效,或需要较少质量或摩尔当量的结合分子的活性,从而(i)中和,例如,减少感染性HBV病毒粒子的感染性,(ii)减少HBV感染细胞的数量(包括HCC细胞、潜伏性感染细胞、和慢性受感染的细胞),(iii)预防HBV感染,(iv)增强病毒清除,例如,通过增强的感染细胞的杀死,和/或(v)提高HBV感染的信号和症状,相较于只含有一个结合单元的单(即非多聚化的)结合分子,其结合单元具有与本文所提供的那些五聚化或六聚化IgM结合分子在序列上相同的抗原结合单元。

[0147] 本文提供的结合分子可同样地具有与由合成或嵌合结构组成的多价结合分子不同的特点。例如,相对于包含嵌合恒定区或合成结构的结合分子,人IgM恒定区的应用可提供减少的免疫原性,和由此增加的安全性。此外,基于IgM的结合分子可一致地形成六聚化或五聚化寡聚体,导致同源性更高的表达产物。更优的补体固定也可以是基于IgM的结合分子的有利的效应物功能。

[0148] 上文提到的参照单结合单元可以是IgG结合单元。对比IgG结合单元可以是任何同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4等。对比结合单元通常是来自相同的动物。因此,如果多聚化结合分子是人的,那么参照单结合单元也将是人的,但并不必须是人的。也就是,参照单结合单元可以是IgG型的人源化抗体。相反地,如果多聚化结合分子是兔结合分子,那么参照单结合单元也将是兔结合单元。此外,如果多聚化结合分子是由一种或多种结合单元片段组成的,那么参照单结合单元也将是等效的单结合单元片段。换言之,参照单结合单元同样是与多聚化结合分子中包含的结合单元在序列和结构上相同的,除了参照单结合单元是一个等效的单结合单元。

[0149] 在某些方面中,本公开提供五聚化或六聚化结合分子,其分别包含五个或六个结合单元,其中各结合单元包括两个IgM重链恒定区或其片段。在某些方面中,两个IgM重链恒定区是人重链恒定区。在一些实施方式中,IgM结合分子中的抗原结合结构域是人类源的、或人源化的、或其组合。

[0150] 如果本文提供的多聚化结合分子是五聚化的,则该结合分子还可包含J链,或其功能性片段,或其变体。如果五聚化IgM结合分子包含J链,J链可以是与IgM结合分子相同种的。也就是,如果五聚化IgM结合分子是人的,那么J链也可以是人的。在某些方面,J链是经修饰的J链,其含有异源性部分或一个或多个异源性部分,例如,异源多肽序列,例如,引入天然序列的外来结合结构域。在某些方面,外来结合结构域特异性地结合CD3,例如,CD3 $\epsilon$ 。在某些方面,成熟的经修饰的J链含有V15J (SEQ ID NO:68)或J15V (SEQ ID NO:71)。

[0151] IgM重链恒定区可包括C $\mu$ 1结构域、C $\mu$ 2结构域、C $\mu$ 3结构域和/或C $\mu$ 4结构域中的一个或多个,限制条件是,恒定区可在该结合分子中提供所需功能,例如,与第二IgM恒定区相关联以形成抗原结合结构域,或与其它结合单元相关联以形成六聚体或五聚体。在某些方面,个体结合单元中的两个IgM重链恒定区或其片段各包含C $\mu$ 3结构域或其片段、C $\mu$ 4结构域或其片段、尾片段(TP)或其片段,或C $\mu$ 3结构域C $\mu$ 结构域,和TP或其片段的任何组合。在某些

方面,个体结合单元中的两个IgM重链恒定区或其片段还各自包含C $\mu$ 2结构域或其片段、C $\mu$ 1结构域或其片段,或C $\mu$ 1结构域或其片段和C $\mu$ 2结构域或其片段。

[0152] 在某些方面,结合单元中的两个IgM重链恒定区各自与抗原结合结构域,例如抗体的Fv部分,例如,人或鼠抗体的VH和VL相关联。在某些方面,本文所提供的结合分子的至少一个抗原结合结构域是交叉反应性HBV抗原结合结构域,例如,可以特异性地结合两个、三个、四个、或更多HBV亚型的抗原结合结构域。在其它实施方式中,本文提供的IgM结合分子可以含有结合单元,其中各结合单元具有不同的、可区分的特异性。因此,五聚化IgM结合分子可以具有至多五个不同的特异性,并且因此与目前已知的每个不同的HBV亚型结合。此外,因为五聚化IgM结合分子各结合单元具有两个抗原结合结构域,并且因为两个抗原结合结构域各自可以独立地结合不同的抗原或相同抗原上的不同表位,五聚化IgM结合分子可以在不同的HBV亚种间结合多两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、甚至十个不同的抗原或表位。同样,六聚化IgM结合分子可以含有结合单元,其中各结合单元具有不同的、可区分的特异性。因此,六聚化IgM结合分子可以具有至多十二个不同的特异性,并且因此与目前已知的每个不同的HBV亚型结合。此外,因为六聚化IgM结合分子各结合单元具有两个抗原结合结构域,并且因为两个抗原结合结构域各自可以独立地结合不同的抗原或相同抗原上的不同表位,本公开的六聚化IgM结合分子可以在不同的HBV亚种间结合多两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、甚至十二个不同的抗原或表位。

[0153] 在某些方面,至少一个抗原结合结构域结合HBV病毒粒子表面包膜蛋白(HBsAg)的S区、前S2区、和/或前S1区,或HBV X蛋白。在某些实施方式中,至少一个抗原结合结构域特异性地结合前S1区。在一些方面,多聚化结合分子结合包含前S1、前S2和S的HBV抗原。在一些实施方式中,HBV抗原是前S1和前S2,或前S1和S,或前S2或S。结合前S1抗原的结合单元可以具有对前S1抗原的一个或多个不同的特异性。也就是,本文提供的多聚化结合分子的至少一个结合单元对HBV包膜蛋白的前S1蛋白具有特异性,并且因为各结合单元可以具有至多两个抗原结合结构域,各抗原结合结构域可以与前S1蛋白上不同的、可区别的表位结合。在其它实施方式中,当多价化结合分子包含超过一个结合单元,各结合单元对不同HBV抗原可以具有独立的特异性。因此,在一个包含至少两个结合单元的多价化结合分子中,一个结合单元可以具有对前S1抗原的特异性,另一个结合单元可以具有对S抗原等抗原的特异性。或者,例如,所有的结合单元可以具有对前S1相同的特异性。因此,正是因为各结合单元可以由不同的抗原结合结构域组成,多聚化结合分子可以具有对不同HBV抗原的一种或多种特异性。在一些方面,多聚化结合分子的所有结合单元具有对前S1抗原的特异性。

[0154] 本文提供的多聚化结合分子的结合单元的HBV抗原靶标,相较于HBV抗原在非感染性亚病毒颗粒上的表达,可以在感染性HBV病毒粒子表面、在感染HBV的细胞表面、或其组合以较高密度表达。例如,已知相较于在非感染性、球形和丝状HBV病毒粒子颗粒上的表达,前S1在感染性HBV病毒粒子颗粒上以较高密度表达,即,较多的数量。(Hong等,《病毒学(Virology)》,318:134-141,2004;Heerman等,J.ViroI.,52(2):396-402,1984;和Park等.,《抗病毒研究(Antiviral Res.)》,68:109-115,2005)。在某些方面,本文提供多聚化结合分子的结合单元的至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或十二个抗原结合结构域可以与乙型肝炎病毒(HBV)抗原特异性地结合,该HBV抗原表达在感染性病毒颗粒表面,在感染HBV的细胞表面,或这些组合。尽管不

希望受到理论限制,但是具有对在感染性HBV病毒粒子中表达更高的HBV抗原特异性的多聚化结合分子,如前所述,相较于参照单结合单元,其可以更加高效、具有更高活性、更有效或者需要更少的分子来达到增强病毒清除的所需活性,例如,通过感染细胞的杀死,抑制感染性,例如,通过病毒中和,和/或在感染的个体中抑制HBV细菌的生在或维持,例如,急性、慢性、或潜伏的受感染个体。

[0155] 或者,HBV抗原可以是包括包膜蛋白(S、M和/或L)、前核心抗原(例如,HBeAg)、核心抗原(例如,HBcAg)、和X抗原(例如,HBx)的HBV蛋白中的任意一种或多种。此外,本文提供的多聚化结合分子可以具有结合单元,其各自独立地具有对这些HBV抗原中的任意一种或多种的特异性。因此,单一多聚化结合分子可以,例如,对包括包膜蛋白(S、M和/或L)、前核心抗原、核心抗原(例如,HBcAg)和X抗原的HBV蛋白中的一种或多种具有特异性。

[0156] IgA结合分子

[0157] IgA在粘膜免疫中起关键作用,并且占产生的总免疫球蛋白的约15%。IgA是单体或二聚化分子。本文提供的二聚化结合分子可具有与包含五个或六个结合单元的结合分子(例如,六聚化或五聚化IgM抗体)相区分的结合特点或生物活性。例如,二聚化结合分子将更小,并且能够实现更好的组织穿透。IgA结合分子可以通过体外表达生产,从而包括两个IgA单体和J链。随后可以例如通过静脉输注将IgA分子给予个体,并且移动到粘膜或粘膜组织的IgA分子可以与上皮细胞生成的分泌型组分结合并形成复合物,形成sIgA。寡聚sIgA易位跨过上皮细胞,最终将sIgA递送至粘膜表面。(KaetzeI等,Proc.NatI.Acad.Sci.USA 88(19):8796-8800)。因此,IgA到血液的递送可以提供粘膜组织的靶向。

[0158] IgA结合单元包括两条轻链和两条重链。IgA包含三个重链恒定区(C $\alpha$ 1、C $\alpha$ 2和C $\alpha$ 3),并且包括C末端“附属物”。人IgA具有两个亚型,IgA1和IgA2。人IgA1恒定区通常包含氨基酸序列SEQ ID NO:55。

[0159] ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLQGGFFPQEPLSVTWSESGQGVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGGPPERDLGCGYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

[0160] 人C $\alpha$ 1区的范围是SEQ ID NO:55的约氨基酸6到约氨基酸98;人C $\alpha$ 2区的范围是SEQ ID NO:55的约氨基酸125到约氨基酸220,人C $\alpha$ 3区的范围是SEQ ID NO:55的约氨基酸228到约氨基酸330,并且附属物的范围是SEQ ID NO:55的约氨基酸331到约氨基酸352。人IgA2恒定区通常包含氨基酸序列SEQ ID NO:56。

[0161] ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLQGGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGGPPERDLGCGYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

[0162] 人C $\alpha$ 1区的范围是SEQ ID NO:56的约氨基酸6到约氨基酸98;人C $\alpha$ 2区的范围是SEQ ID NO:56的约氨基酸112到约氨基酸207,人C $\alpha$ 3区的范围是SEQ ID NO:56的约氨基酸215到约氨基酸317,并且所述附属物的范围是SEQ ID NO:56的约氨基酸318到约氨基酸340。

[0163] 两个IgA结合单元可与两条其它多肽链，J链(SEQ ID NO:54)和分泌型组分(SEQ ID NO:57)形成复合物，以形成分泌IgA(sIgA)抗体。尽管不希望受理论限制，认为IgA结合单元向二聚化sIgA结合分子的组装涉及Ca3和附属物结构域。因此，本文提供的二聚化IgA结合分子通常包括IgA恒定区，其包括至少Ca3和附属物结构域。分泌组分的氨基酸序列(SEQ ID NO:57)如下所示：

[0164] KSPIFGPEEVNSVEGNSVSIITCYYPPTSVNRHTRKYWCRQGARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTNF  
 PENGTFVVNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLEVSQGPGLLNDTKVYTVDLGRTVTINCPFKTENAQKRKS  
 LYKQIGLYPVLVIDSSGYVNPNYTGRIRLDIQGTGQLLFSVVINQLRLSDAGQYLCQAGDDSNNSNKKNADLQVLKPE  
 PELVYEDLRGSVTFHCALGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVNTLGKRAPAFEGRILLNPQDKDGSFSVVTGLRKE  
 DAGRYLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPRSPTVVKGVAGGSVAVLCYPYRKEKSIKYWCLWEGAQNGRC  
 PLLVDSEGWVKAQYEGRLSLLEEPGNGTFTVILNQLTSRDAGFYWCLTNGDTLWRTTVEIKIIEGEPNLKVPGNVTA  
 VLGETLKVPCHPCKFSSYEKYWCKWNNTGCQALPSQDEGPSKAFVNCDENSRLVSLTLNLVTRADEGWYCGVKQG  
 HFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVS LAKADAAPDEKVLDSGFREIENKAIQDPR

[0165] IgA重链恒定区还可包括Ca2结构域或其片段、Ca1结构域或其片段，和/或其它IgA重链结构域。在某些方面，本文提供的结合分子可包括完整IgA重( $\alpha$ )链恒定结构域，例如，SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56，或其变体、衍生物或类似物。

[0166] 二聚化HBV结合分子

[0167] 本公开提供了多聚化结合分子，例如，包含两个或多个IgA分子的多聚化结合分子，其中各IgA分子可以包含一个或多个本文所定义的“结合单元”，其可以特异性地结合HBV抗原，例如，HBsAg，例如HBsAg的前S1区。如上文在IgM多聚化结合分子中所解释，相较于由参照单结合单元组成的结合分子，例如，单结合单元IgG抗体，本文提供的IgA多聚化结合分子可具有改善的结合特点或生物活性。换言之，在一些实施方式中，相较于只含有两个HBV特异性抗原结合结构域的参照单结合单元，本文提供的IgA结合分子可以增强病毒清除，和/或在例如增强病毒清除(例如，通过感染细胞的杀死)、抑制感染性(例如，通过病毒中和)、和/或在感染的个体(例如，急性、慢性、或潜伏的受感染个体)中抑制HBV细菌的生在或维持中更有效。对术语“改善的结合特点”进一步的说明如下。本文提供的IgA结合分子，当给予有需要的个体时，相较于只含有一个具有与本文提供的这些IgA序列相同的抗原结合结构域的结合单元的单(即非多聚化)结合分子，可以表现出可凭经验确定的更强，更有效，或需要较少质量或摩尔当量的结合分子的活性，从而增强病毒清除，减少感染性HBV病毒粒子的感染性，和/或减少感染性HBV病毒粒子在受感染个体中的生长。

[0168] 上文提到的参照单结合单元可以是IgG结合单元对比IgG结合单元可以是任何同种型，例如IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4等。对比结合单元通常是来自相同的动物。因此，如果多聚化结合分子是人的，那么参照单结合单元也将是人的，但并不必须是人的。也就是，参照单结合单元可以是IgG类型的人源化抗体。相反地，如果多聚化结合分子是兔结合分子，那么参照单结合单元也将是兔结合单元。此外，如果多聚化结合分子是由一种或多种结合单元片段组成的，那么参照单结合单元也将是相对的单结合单元片段。换言之，参照单结合单元同样是与多聚化结合分子中包含的结合单元在序列和结构上相同的，除了参照单结合单元是一个等效的单结合单元。

[0169] 在某些方面，本公开提供了多聚化结合分子，其包含两个二价结合单元，其中各结

合单元包括两个IgA重链恒定区或其片段。在某些方面,两个IgA重链恒定区是人重链恒定区。IgA结合单元可以是人、或人源化结合单元或其组合。或者,IgM结合单元可以是单IgM结合分子中的混合种。

[0170] 本文提供的多聚化(例如二聚化)IgA结合分子还可包含J链,或其片段,或其变体。在某些方面,J链是经修饰的J链,其含有异源性部分或一个或多个异源性部分,例如,异源多肽序列,例如,引入天然序列的外来结合结构域。在某些方面,外来结合结构域特异性地结合CD3,例如,CD3 $\epsilon$ 。在某些方面,成熟的经修饰的J链含有V15J (SEQ ID NO:68)或J15V (SEQ ID NO:71)。本文提供的多聚化IgA结合分子还可包含分泌型组分,或其片段,或其变体。

[0171] IgA重链恒定区可包括Ca1结构域、Ca2结构域、和/或Ca3结构域中的一个或多个,限制条件是,恒定区可在该结合分子中发挥所需功能,例如,与第二IgA恒定区相关联以形成抗原结合结构域,或与另一个IgA结合单元相关联以形成二聚化结合分子。在某些方面,个体结合单元中的两个IgA重链恒定区或其片段各自包含Ca3结构域或其片段、附属物(TP)或其片段,或Ca3结构域、TP或其片段的任何组合。在某些方面,个体结合单元中的两个IgA重链恒定区或其片段还各自包含Ca2结构域或其片段、Ca1结构域或其片段,或Ca1结构域或其片段和Ca2结构域或其片段。

[0172] 在某些方面,给定抗原结合单元中的两个IgA重链恒定区各自与抗原结合结构域相关联,例如抗体的Fv部分,例如,人或鼠抗体的VH和VL。在某些方面,本文所提供的结合分子的至少一个抗原结合结构域是交叉反应性HBV抗原结合结构域,例如,可以特异性地结合两个、三个、四个、或更多HBV亚型的抗原结合结构域。在某些方面,至少一个抗原结合结构域与HBV病毒粒子的前S1或X抗原结合。

[0173] 在其它实施方式中,本文提供的IgA结合分子可以含有结合单元,其中各结合单元可以具有两个抗原结合结构域,各自具有不同的、可区分的特异性。因此,二聚化IgA结合分子可以具有至多四个不同的特异性。

[0174] 在某些方面,至少一个抗原结合结构域结合HBV病毒粒子包膜蛋白(HBsAg)的S区、前S2区、和/或前S1区。在某些实施方式中,至少一个抗原结合结构域特异性地结合前S1蛋白。在一些方面,多聚化结合分子结合包含前S1、前S2和S的HBV抗原。在一些实施方式中,HBV抗原是前S1和前S2,或前S1和S,或前S2或S。结合前S1抗原的结合单元可以具有对前S1抗原的一个或多个不同的特异性。也就是,本文提供的多聚化结合分子的至少一个结合单元对HBV包膜蛋白的前S1蛋白具有特异性,并且因为各结合单元可以具有至多两个抗原结合结构域,各抗原结合结构域可以与前S1蛋白上不同的、可区别的表位结合。在其它实施方式中,当多价化结合分子包含超过一个结合单元,各结合单元对不同HBV抗原可以具有独立的特异性。因此,在一个包含至少两个二价结合单元的多价化结合分子中,一个结合单元可以具有对前S1抗原的特异性;另一个结合单元可以具有对S抗原等抗原的特异性。或者,例如,所有的结合单元可以具有对前S1相同的特异性。因此,正是因为各结合单元可以由不同的抗原结合结构域组成,多聚化结合分子可以具有对不同HBV抗原的一种或多种特异性。在本公开的一方面,多聚化结合分子的所有结合单元具有对前S1抗原的特异性。在某些方面,至少一个抗原结合结构域结合HBV X抗原(HBxAg)。

[0175] 对提供的多聚化结合分子的结合单元具有特异性的HBV抗原,相较于HBV抗原在非

感染性亚病毒颗粒上的表达,可以在感染性HBV病毒粒子表面、在感染HBV的细胞表面、或其组合以较高密度表达。例如,已知相较于在非感染性、球形和丝状HBV病毒粒子颗粒上的表达,前S1在感染性HBV病毒粒子颗粒上以较高密度表达,即,较多的数量。(Hong等, *Virology*, 318:134-141, 2004; Park等, *Antiviral Res.*, 68:109-115, 2005)。在某些实施方式中,本文提供的多聚化结合分子的至少两个、至少三个、或至少四个抗原结合结构域特异性地结合表达在感染性病毒颗粒表面、在感染HBV的细胞表面、或这些组合的乙型肝炎病毒(HBV)抗原。当在感染细胞表面表达时,可以在表达在感染细胞表面的MHC分子中发现较高密度的HBV抗原。尽管不希望受到理论限制,但是具有对在感染性HBV病毒粒子中表达更高的HBV抗原特异性的多聚化结合分子,如前所述,相较于参照单结合单元,其可以更加高效、具有更高活性、更有效或者需要更少的分子来达到增强病毒清除的所需活性,抑制感染性,和/或在感染的个体中抑制HBV细菌的生长。

[0176] 或者,HBV抗原可以是包括HBsAg包膜蛋白(S、M和/或L)、前核心抗原(例如,HBcAg)、核心抗原(例如,HBcAg)和X抗原(例如,HBx)的HBV蛋白中的任意一种或多种。此外,本文提供的多聚化结合分子可以具有结合单元,其各自独立地具有对这些HBV抗原中的任意一种或多种的特异性。因此,单一多聚化结合分子可以,例如,对包括包膜蛋白(S、M和/或L)、前核心抗原、核心抗原(例如,HBcAg)和X抗原的HBV蛋白中的一种或多种具有特异性。

[0177] 经修饰的J链

[0178] 在某些方面,本文提供的HBV结合分子可以是双特异性的,结合了经修饰的J链。如本文所提供和在PCT公开号WO 2015/153912中,经修饰的J链可以包含异源性部分,例如,异源多肽,例如,外来结合结构域,其可以包括,例如,能够特异性地结合靶标的多肽结合结构域。结合结合与可以是,例如,抗体或其抗原结合片段、抗体-药物偶联物或其抗体结合片段、或抗体样分子。可以通过适当地选择添加的位置和种类(例如,直接或间接融合、化学链接等)将多肽结合结构域引入J链。

[0179] 在某些方面,结合结构域可以是抗体或抗体的抗原结合片段,包括单特异性、双特异性、和多特异性抗体或抗体片段。抗体片段可以是,但不限于Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、scFv、(scFv)<sub>2</sub>片段、单链抗体分子、微抗体(minibody)、或抗体片段形成的多特异性抗体。在某些方面,抗体片段是scFv。

[0180] 在另一方面,结合结构域可以是抗体样分子,例如,人结构域抗体(dAb)、双亲和性再靶向(Dual-Affinity Re-Targeting, DART)分子、双抗体、双-双抗体、双可变区结构域抗体、堆叠可变结构域抗体(Stacked Variable Domain antibody)、小模块免疫药物(SMIP)、代理链(Surrobody)、链交换工程改造结构域(SEED)、或TandAb。

[0181] 可以在任何位置将结合结构域引入天然J链序列,该位置可让结合结构域与其结合靶标结合,而不影响受体IgM或IgA分子与其一个或多个结合靶标的结合,或J链有效地结合IgA二聚体或IgM五聚体的能力。在某些方面,可以将结合结构域插入在或靠近C末端、在或靠近成熟的N末端(即,信号肽裂解后,SEQ ID NO:54的氨基酸编号23)、或在一个根据J链的三维结构可及的内部位置。在某些方面,可以将结合结构域引入天然序列J链,其不具有来自SEQ ID NO:54的人J链的C末端的约10个残基或不具有来自SEQ ID NO:54的人J链的成熟N末端的约10个氨基酸残基。在另一方面,可以将结合结构域引入SEQ ID NO:54的天然序列人J链的SEQ ID NO:54的半胱氨酸残基114到123之间,或在另一天然序列J链的等同位

置。在又一方面,可以在或接近糖基化位点将结合结构域引入天然序列J链,例如SEQ ID NO:54的J链。在某些方面,可以将结合结构域引入离C末端10个氨基酸残基之内的SEQ ID NO:54的天然序列人J链。

[0182] 可以通过与或不与肽接头直接或间接融合实现引入,即,通过将J链和结合结构域以它们的编码氨基酸序列的框内组合的形式组合成一个多肽链实现组合。如果使用肽接头(间接融合),其长度可以是大约1到50、或大约1到40、或大约1到30、或大约1到20、或大约1到10、或大约1到5、或大约10到20个氨基酸,并且可以存在一个或两个可以引入J链序列的结合结构域尾端。在某些方面,肽接头是大约1到5、大约10到20、或大约10到15个氨基酸长度。在某些方面,肽接头是15个氨基酸长度。在某些方面,肽接头是(GGGGS)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:72)。

[0183] 也有可能将超过一个异源多肽,例如,超过一个结合结构域引入J链。

[0184] 经修饰的J链可由已知的重组DNA技术通过在合适的原核生物或真核宿主生物中表达编码经修饰J链的核酸产生。

[0185] 如本文在别处所述,经修饰的J链还可与受体IgM或IgA结合分子的重链和轻链共同表达在经修饰的J链纳入之前,受体结合分子可以是单特异性、双特异性或多特异性,例如,单特异性、双特异性、或多特异性IgA和IgM抗体。双特异性、或多特异性IgA和IgM结合分子(包括抗体)在例如,美国专利申请序列号61/874,277和61/937,984中描述,它们都通过引用全文纳入本文。

[0186] 在某些方面,本文所述抗-HBV IgM或IgA结合分子可以包括对免疫效应细胞,如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、或嗜中性粒细胞具有结合特异性的经修饰的J链在某些方面,效应细胞是T细胞并且结合靶标是CD3(讨论如下)。通过激活和重定向效应细胞,例如,效应T细胞(T细胞依赖性杀伤或TDCC)对表达HBV抗原,例如HBsAg的在其表面的受感染细胞,本文提供的双特异性抗-HBV x抗-CD3 IgM或IgA结合分子可以产生对靶向增强的免疫应答,该应答含有,例如,补体介导的细胞毒性、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、TDCC、和/或NK细胞介导的杀伤,,从而进一步增强其功效和效力。在某些方面,本文提供的双特异性抗-HBV x抗-CD3 IgM或IgA结合分子含有经修饰的J链,其可用于由乙型肝炎病毒感染所引起或加重的疾病或病症的治疗。

[0187] 对于T细胞,分化3的簇(CD3)是一个多聚化蛋白复合物,被称之为T3复合物,并且由四条不同的多肽链( $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\zeta$ )组成,这四条多肽链以三对二聚体( $\epsilon\gamma$ 、 $\epsilon\delta$ 、 $\zeta\zeta$ )组装和作用。CD3复合物作为T细胞共受体与T细胞受体(TCR)非共价地相关联。CD3复合物的组分,特别是CD3 $\epsilon$ ,可以是本文提供的双特异性IgM或IgA结合分子的经修饰的J链的靶标。

[0188] 在某些方面,双特异性抗-HBV x抗-CD3 IgM或IgA结合分子经抗体结合结构域结合受HBV感染细胞或HBV病毒颗粒。

[0189] 在某些方面,本文提供的经修饰的J链的抗-CD3 $\epsilon$ 结合结构域是scFv。抗-CD3 $\epsilon$ scFv可以直接地或藉由引入到scFv和J链序列之间的合成接头(例如,(GGGGS)<sub>3</sub>接头(SEQ ID NO:72))间接地融合在或接近J链的N末端,或在或接近J链的C末端。在某些负面影响,scFv包括维西珠单抗(Nuvion公司)的VH和VL区。在某些方面,经修饰的J链包括由维西珠单抗的VH、(GGGGS)<sub>3</sub>接头、和维西珠单抗的VL组成的scFv。

[0190] 在某些方面,经修饰的J链包括通过15氨基酸(GGGGS)<sub>3</sub>接头融合到人J链N末端的

维西珠单抗的scFv,其为本文称之为V15J的经修饰的J链。V15J可以还包括信号肽,用以协助运送以及组装成IgM或IgA结合分子。成熟的V15J蛋白如SEQ ID NO:68所示,包括19氨基酸免疫球蛋白重链信号多肽的前体形式如SEQ ID NO:67所示。在某些方面,经修饰的J链包括通过15氨基酸(GGGGS)<sub>3</sub>接头融合到人J链C末端的维西珠单抗的scFv,其为本文称之为J15V的经修饰的J链。J15V可以还包括信号肽,用以协助运送以及组装成IgM或IgA结合分子。成熟的J15V蛋白如SEQ ID NO:71所示,包括22氨基酸人J链信号肽的前体形式如SEQ ID NO:70所示。在某些方面,可以使用其它的信号肽。本文所提供的选择和采用合适的信号肽以促进经修饰的J链的表达、分泌、和将其纳入抗-HBV IgM或IgA结合分子完全是在本领域普通技术人员的能力范围内。

[0191] 工程改造的HBV抗原结合结构域

[0192] 在某些方面,本文提供的HBV抗原结合结构域可以包括至多六个免疫球蛋白互补决定区HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、和LCDR3,其中至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、或至少六个与下表2中所列出的HBV mAb的对应的CDR相关,或在一些实施方式中是相同。在某些方面,本文提供的HBV抗原结合结构域可以包括至多六个免疫球蛋白互补决定区HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、和LCDR3,其中至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、或至少六个与美国专利号7,115,723中公开的HBV mAb KR127的对应的CDR相关,或在一些实施方式中是相同。KR127抗体和其衍生物对于HBsAg前S1表位具有特异性。在某些方面,本文所提供的HBV抗原结合结构域可以是KR127的人源化形式,例如,KR127,其VH和VL区分泌包括氨基酸序列SEQ ID NOs 1和3,KR127III,其VH和VL区分别包括氨基酸序列SEQ ID NOs 1和3,两者都在美国专利号7,115,723中公开。在其它方面,本文提供的HBV抗原结合结构域可以是KR127的人源化、亲和性成熟的形式,如美国专利号8,420,353(VH和VL分别是SEQ ID NOs:5和6)中、Hong等,ViroI.,318:131-141,2004(VH和VL分别是SEQ ID NOs 4和3)中、或Kim,J.H.,等FEBS Letters 589:193-20,2015(VH和VL分别是SEQ ID NOs 47和48)所提供。

[0193] 用于将克隆的可变区遗传工程改造成为免疫球蛋白结构域,并且表达和纯化所述构建体的方法是公开的并且处于本领域技术人员的能力范围内。(参见例如,Wu等,MAbs,1:339-47,2009,和Wu等,Nat.Biotechnol.,25:1290-7,2007)。

[0194]

表 2: 对 HBV 特异的单克隆抗体的 VH 和 VL 氨基酸序列

来源	靶标	VH SEQ ID NO	VH	VL SEQ ID NO	VL
美国专利号 7,115,723	前S1	1	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASG YAFSSSWMNWVRQAPGQGLEWIGRIYP GDDITNYAQKFOGKATLTADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYFCAREYDEAYW GGGTLVTVSS	3	DILMTQPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYS NGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYC VQGTTHFPQTFGGGTKEIKR
美国专利号 7,115,723	前S1	2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YFTISWMINWVRQAPGQGLEWMGRIY PGDGDIN YAQKFOGRV TMIADKSTST VYMESSLRSEDTAVYYCAREYDEAY WGQGITLVTVSS	3	DILMTQPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYS NGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYC VQGTTHFPQTFGGGTKEIKR
Hong 等, <i>Protein</i> , 318:131-141, 2004	前S1	4	QVQLVQSGDELAKVGSVKVSCKASG YAFSSWMINWVRQAPGQGLEWIGRIYP GDDITNYAQKFOGKATLTADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYFCAREYDEAYW GGGTLVTVSS	3	DILMTQPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYS NGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYC VQGTTHFPQTFGGGTKEIKR
美国专利号 8,420,353	前-S1	5	QVQLVQSGAEVKAAPGASVKVSCKASG YFTISAWMNWVRQAPGQGLEWMGRI YPSGGSTSYAQKFOGRV TMIADKSTST VYMESSLRSEDTAVYYCAREYRVAR WGQGITLVTVSA	6	DIVMTQPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYS NGKTYLNWLLQKPGQFPQRLIYLVSNRDSG VPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYC VQGTTHFPQTFGGGTKEIK
WO 2011/045079A1	前-S1	7	EVQLVESGGDLVKPGGSLRISCAASGL TFSNAWMINWVRQAPGKGLEWVGRIGS KSDGGTIDYAAPVEGRFSISRDDSKDTL YIQMNSLKTEDTAVYYCASRLVAEGG FDSWGQGITLVTVSS	8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVLY SSNNRNLYLAWYQOKPGQPKLLIYWASTR RSGVPRFSGSGSDFTLTISLQAEDVAV YYCQQYYNTPYSFGQGTKEIK
WO 2011/045079A1	前-S1	7	EVQLVESGGDLVKPGGSLRISCAASGL TFSNAWMINWVRQAPGKGLEWVGRIGS KSDGGTIDYAAPVEGRFSISRDDSKDTL YIQMNSLKTEDTAVYYCASRLVAEGG FDSWGQGITLVTVSS	9	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVLY SSNNRNLYLAWYQOKPGQPKLLIYWASTRE SGVPRFSGSGSDFTLTISLQAEDVAVY YCQQYYSTPYSFGQGTKEIK

[0195]

来源	靶标	VH SEQ ID NO	VH	VL SEQ ID NO	VL
美国专利号 RE39586	HBsAg	10	QVQLVESGGGVVRRPGRSRLESCAAASGF AFSDYSINWVRQAPGKGLEWVAHSYD GRITYRDSVKGREFISRDDSKNTLYLQ MNSLRTEDTAVYYCARQYYDFWSGSS VGRNYDGMDEVWGLGITVTVSS	11	DIVMTQSPFLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHR SGNNYLDWYLOKPGHSPOLLIVGSRASG VPDRFSGSGTEYTLKISRVAEDVGVYY CMQALQTPRFQGGTKLEIK
Walsh 等, <i>Viral.</i> , 411:132-141 (2011)	HBsAg	12	AWVDQIPRTATKETGESLINCVLRTI SCAFSSIGWYRIKLGSIHQISIGGRY VETVNTKSKSISLRISDLRVEDSGIYKC QVYFVWWDGSCFGILGRITKKGAGTAL TVK		
Walsh 等, <i>Viral.</i> , 411:132-141 (2011)	HBsAg	13	AWVDQIPRTATKETGESLINCVLRTI SCAFSGTGWYRIKLGSIHQISIGGRY VETVSKGSKSISLRISDLRVEDSGIYKC QVYFVWWDGSCFGILGRITKKGAGTAL TVK		
WO2014048910A1	HBsAg	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCFVSGF TFSNNWMHWVRRQAPGKGPVWVSRIST DGMSTSYALFVKGRFTISRDNARNFLY LQMNSLRDEDTAVYYCVRGSIYYFGS GSLNFWGQGITVIVSS	15	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGINSDIGN YDYVSWYQQHPGKAPRLIYDVSERPSGVP NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDESDYFCSS YAGIFIVVVFVGGGKILIVL
WO2014010890A1	HBsAg	16	QVKLLTSGGGLVQPGGSLRISCSASGFS LTKYKMTWVRQAPGKGLEWVSSISSTIS RDIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQ MSSLRVDITAVYYCTIRDGWLWGWDV RSNYYNALDVWGQGITVIVSS	21	ELVMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIYN SIAWYQQKPGKAPKLLLYSTISLISGVPISRF SGSGSGIDYTLTIINLQPEDFATYYCQQYFV TPETFGQGGTKVEIKR
WO2014010890A1	HBsAg	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCSASGFS LTKYKMTWVRQAPGKGLEWVSSISSTIS RDIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQ MSSLRVDITAVYYCTIRDGWLWGWDV RSNYYNALDVWGQGITVIVSS	22	DIVVTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIYN IAWYQQKPGKAPKLLLYSTISLISGVPISRF GSGSGIDYTLTIINLQPEDFATYYCQQYFV PETFGQGGTKLEIKR

[0196]

来源	靶标	VH SEQ ID NO	VH	VL SEQ ID NO	VL
WO2014010890A1	HBsAg	18	QVQLVQSGGGEVKKPGALMKVSKKASG YIFTSYGISWVRRQAPGQGLEWIGWINTY SGHTNYARKFRGRVTMTWDTSTSTAY MELSSLRSDDITAVYYCARVPTWGIDY WGQGTLVTVSS	23	QAGLIQPPSVSVAPGKTIARITCGGDNIGRKS VHWYQOKTGOAPVLVYEDNKRPSGIPERF SGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSTVVFGGGTKLIVLG
WO2014010890A1	HBsAg	19	QVQLVQSGGGEVKKPGALMKVSKKASG YIFTSYGISWVRRQAPGQGLEWIGWINTY SGHTNYARKFRGRVTMTWDTSTSTAY MELSSLRSDDITAVYYCARVPTWGIDY WGQGTLVTVSS	24	EIVLTQSPPSLSASVGDRTVITTCQASQDINN VNWVQEQEFGKAPRLIYDASNLQIGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQTISV YPLTFGGGTKVDIKR
WO2014010890A1	HBsAg	20	QVQLVQSGGGEVKKPGALMKVSKKASG YIFTSYGISWVRRQAPGQGLEWIGWINTY SGHTNYARKFRGRVTMTWDTSTSTAY MELSSLRSDDITAVYYCARVPTWGIDY WGQGTLVTVSS	25	DIVMTQIPLSLPVTGEPASISCRSSQSLLHS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLIYLGSKRASG VDFRSGSGSGTDFTLQISRVEAEDVGVYYC MQSTQFPPYTFGGGTRKLEIKR
美国专利号 8,840,895	HBsAg	26	QVQLVQSGGGEVKKPGALMKVSKKASG YIFTSYGISWVRRQAPGQGLEWIGWINTY SGHTNYARKFRGRVTMTWDTSTSTAY MELSSLRSDDITAVYYCARVPTWGIDY WGQGTLVTVSS	27	QAGLIQPPSVSVAPGKTIARITCGGDNIGRKS VHWYQOKTGOAPVLVYEDNKRPSGIPERF SGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSTVVFGGGTKLIVLG
美国专利号 8,840,895	HBsAg	26	QVQLVQSGGGEVKKPGALMKVSKKASG YIFTSYGISWVRRQAPGQGLEWIGWINTY SGHTNYARKFRGRVTMTWDTSTSTAY MELSSLRSDDITAVYYCARVPTWGIDY WGQGTLVTVSS	28	EIVLTQSPPSLSASVGDRTVITTCQASQDINN VNWVQEQEFGKAPRLIYDASNLQIGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQTISV YPLTFGGGTKVDIKR
美国专利号 8,840,895	HBsAg	26	QVQLVQSGGGEVKKPGALMKVSKKASG YIFTSYGISWVRRQAPGQGLEWIGWINTY SGHTNYARKFRGRVTMTWDTSTSTAY MELSSLRSDDITAVYYCARVPTWGIDY WGQGTLVTVSS	29	DIVMTQIPLSLPVTGEPASISCRSSQSLLHS NGYNYLDWYLOKPGQSPQLLIYLGSKRASG VPDRFSGSGSGTDFTLQISRVEAEDVGVYYC MQSTQFPPYTFGGGTRKLEIKR
美国专利号 8,580,256	HBsAg	30	QVQLVQSGGGEVKKPGALMKVSKKASG YIFTSYGISWVRRQAPGQGLEWIGWINTY SGHTNYARKFRGRVTMTWDTSTSTAY MELSSLRSDDITAVYYCARVPTWGIDY WGQGTLVTVSS	31	SYVLTQPPSVSVAPGKTIARISCGGNNGTKN VHWYQOKTGOAPVLVYADSDRPSGIPERF SGSNSGNTATLTISRVEVGDDEADYYCQVWD SVSYHVAVFGGGTLLIVLG

[0197]

来源	靶标	VH SEQ ID NO	VH	VL SEQ ID NO	VL
美国专利号 8,580,256	HBsAg	32	QVQLVESGGGVVPRGRSLRSLCAASGF AFSDYSINWVRQAPGKGLWVAISYD GRITYYRDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRTEDTAVYYCARQYYDFWSGSS VGRNYDGMVWGLGTTVYSS	33	DIVMTQPSLSLSTVPGEPASICRSSQSLHR SGNNYLDWYLQKPGHSPQLLYVGSNRASG VPDRFSGSGSTEYTLKISRVEAEDVGVYY CMQALQIPRTFGGQTKLEIK
美国专利号 7,435,414	HBsAg	34	QVQLKQSPGGLVKPSQTLISLICTVSGFS LSTYGVQWVYRPPGKGLWLVGIWWSG GNTDYNAAHISRVTISKDTSKNQVSLKJ SSVTAADTAVYYCARARYEDYWGAGT IVTVSS	35	QAVVTOEPLSLVSPGGTVTLICRSSIGAIT NNFANWFQKPGQAFRGLIGDINNRVPGV PARFSGSLIGNKAAIHTTGAQPEDEAEYYC ALWYNNWVFGGGTKLTVLG
美国专利号 7,435,414	HBsAg	34	QVQLKQSPGGLVKPSQTLISLICTVSGFS LSTYGVQWVYRPPGKGLWLVGIWWSG GNTDYNAAHISRVTISKDTSKNQVSLKJ SSVTAADTAVYYCARARYEDYWGAGT IVTVSS	36	QAVVTOEPLSLVSPGGTVTLICRSSIGAIT NNFANWFQKPGQAFRGLIGDINNRVPGV PARFSGSLIGNKAAIHTTGAQPEDEAEYYCA LWYNNWVFGGGTKLTVLG
美国前公开专利号 RI.40831	HBsAg	37	QVQLVDSGGVVPGGSERLSCAPSGF VFRSYGMHWVKRTPGKGLWVSLIWH DGSNRFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMN-SLR-AEDTAMVFCARERLIAAPAAP DEWGGITLVYSS	38	SYVLTQPPSVVAPGKTARISCGGNNIGTKN VHWYQKPGQAPVLYVYADSDRPSGIPERF SGSNSGNTAHLISRVEVGDEADYYCQVWD SVSYHVYVFGGGTLLVVLG
美国专利号 5,565,354	HBsAg	39	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQQLVLS GGGVVQPGRLRSLCAASGFTFSRYGM HWVRQAPGKGLWVAVISYDGSNKW YADSVKGRFTISRDN SKNTLELQMHSL RAADTGVYYCAKDKQLYFGSQSPGHYW VQGTLVTVSS	40	QSOLTQPPSVVAPGQTARITCGGDNIGSKS VNWFOQKPGQAPVLYVYDDNERPSGIFERF SGSNSGNTAHLISRVEAGDEADYYCQVWD SSSDHVYVFGGGTLLTVL
美国专利号 5,565,354	HBsAg	41	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQQLVLSG GGGLVQPGSLRSLCAASGFTFSRYDMY WVRQAPGKGLWVAISYDGTGDTYYAD SVKGRFTISRDN AKNSLYLTMNGLRAG DTAVYYCARDLEI WGGITLVTVSS	42	MIDTRVPAQLLELLEMLWVPGSSGDVAVTQS PLSLPVTLGQAPASISCRSSLSLVDSDDGNTYLN WFLQRPQSPRLIYQLSSRDSGVPPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGTHW PIIFGGQTRLEIKR

[0198]

来源	靶标	VH SEQ ID NO	VH	VL SEQ ID NO	VL
美国专利号 5,565,354	HBsAg	43	MKHLWFFLLVAVPRVWVSVQVQLQES GPGLVKAETLSLICTVSRGFSDFW NWFQPAAGRLEWLGRLVYTSQVSDYN PSLKRVTVSDTSKQFSLRLSSVTVVA DTAVYYCARGLSGFDYWGQALVTVS P	44	MRPVAQLLGLLLWFPGRCDIQMTQSPSS VSASVGRVTVTCRASQGISWLAWYQOK PGKAPKLLIHAASSLQSGVPSRFISGSDTF TLTITSLQAEDFATYYCQQAADSLPFTFGGGT KVDFKR
美国专利号 5,565,354	HBsAg	45	MGSTAILGLLAVLQGVCAEVQLVQSG ALYKKGESLRISKCKSGYSFISYWISW VRQMPGKGLWNGRLDPSASSAIFSPS LQGHVTISVDKSMRTAYVQWRSLKAS DTAMVYCARHYREKSMYQGVYIKDAF EHWGQCEMVTVSS	46	QSQLTQPASVSVSPGQFASHTSGDRLGDEF ASWYQQKPGQSPILVPEDNKRPSGIFERISG SNSGNLAILTISGIIQAAMDEADYYCLAWASS LWVITGGGIKLIVL
Kim, J.H., 等 FEBS Letters 589:193-200 (2015)	前-S1	47	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVCKKASG YTFSSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIV PGDGTISYAQKFGQGRVMTADKSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCAREYAEAYW GQGTLVTVSS	48	DIVMTQIPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYS NGKTYLNWLLQKPGQPPQRLIYL VSNRDSG VPDRFSGSGSDTFTLKISRVEAEDVGVYYC VQGTTHFPQTFGGGTKVEIKR
Zu, Puhiz, L., 等 Gene 221 (1): 143-149 (1998)	HBsAg	49	EVKLHESGAGLVKPGASVNLSCVTSAGF NIKDTYIHWVKQRPDQGLEWIGRIDPA NGNTKSDPKFQGGKATITADISSNLAYL QLSSLTSEDTAVYYCASYSWGGGTTVT VSS	50	DIELTQSPVSLGQRATISCKASQSVDYDGDS YMNWYQQKPGQPPKLLIY AASNLESGIPAR FSGSGSDTFTLNHPVEEEDAATYYCQOSN EDPLIFGGGKLELK
Park, O.Y., 等 Hybridoma 19 (1), 73-80 (2000)	HBsAg	51	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGY TFISYWIHWVKQRPGQGLEWIGRIDPS DSHANYNQKFKGKAILTVDKSSSTVY MQLSSLTSEDSAVYFCTINGYWGQGTIL TVSSA	52	DVVMITQIPLTILSVTIQGPASISCKSSQSLIDS DGEIYLNWLLQRPQGPQPKRLIYMVSKLDSG VPDRFTGSGSDTFTLKISRVEAEDLGVYYC WQGTTHFPFTFGSGTKLEIKR
Corno, 等 (2015) PLOS one 10(4): e0125704. doi: 10.1371	HBsAg	73	EVQVLESGGGLVQPGGSLRISCAASGF RFSSYAMSWVROAPGKGLFHWVSGISGT GENTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYY QMNSLRKAEEDTAVYYCAKDAIIGSGRHP WYFHWGRGHLVTVSS	74	SYVLTQPPSVSVARGQTAEMITCGGNIGSE SVHFVFOOKPGQAPVLA VYDDSDRPSGIPER FSGNSGNLAILTISRVEAEDYADYYCQVW DSSSDHVAVFGGGTQITVTL

[0199]

来源	Pizzato, 等, <i>FEBS Letters</i> 509:463-468 (2001)	靶标	前-S1 或任何 血清型	VH SEQ ID NO	75	VH	EVQLEESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLKLS <sup>K</sup> CAASGF TFSSYAMSW <sup>V</sup> RQSP <sup>E</sup> KRLEWVAE <sup>V</sup> SSD GSYAYYPD <sup>I</sup> L <sup>T</sup> GRFT <sup>I</sup> SRD <sup>N</sup> AKNT <sup>L</sup> YLE M <sup>T</sup> SLRSE <sup>D</sup> I <sup>A</sup> M <sup>Y</sup> Y <sup>C</sup> ASE <sup>N</sup> WD <sup>V</sup> AY <sup>W</sup> G QGIL <sup>V</sup> TV <sup>S</sup> AA	VL SEQ ID NO	76	VL	ELVMTQSP <sup>S</sup> SLAVSV <sup>G</sup> E <sup>K</sup> V <sup>T</sup> MSC <sup>R</sup> SSQ <sup>S</sup> LL N <sup>T</sup> IR <sup>K</sup> SYLA <sup>W</sup> FQ <sup>K</sup> PG <sup>Q</sup> SP <sup>K</sup> M <sup>L</sup> I <sup>Y</sup> W <sup>A</sup> ST RES <sup>G</sup> V <sup>P</sup> DR <sup>F</sup> T <sup>G</sup> SG <sup>S</sup> G <sup>T</sup> D <sup>F</sup> L <sup>T</sup> ISS <sup>V</sup> Q <sup>A</sup> ED <sup>L</sup> A V <sup>Y</sup> Y <sup>C</sup> K <sup>Q</sup> SY <sup>S</sup> L <sup>Y</sup> TF <sup>G</sup> GG <sup>T</sup> K <sup>L</sup> E <sup>I</sup> K <sup>R</sup>
----	--	----	--------------------	--------------------	----	----	--	--------------------	----	----	---

[0200] 在某些方面, 本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子的HBV抗原结合结构域包括抗体重链可变区 (VH) 和抗体轻链可变区 (VL), 其中VH区、VL区、或VH和VL区两者都

与上表2中所引参考中公开的HBV单克隆抗体的对应的的VH或VL相关。在某些方面,相较于包含表2中所列抗体的VH和VL的IgG,本文提供的结合分子展现出较高的功效。抗-HBV的IgA或IgM形式的亲合力增加可以导致更有效的治疗性抗体,其可以结合那些具有非常低的HBV表面蛋白质密度的受感染细胞,允许从受感染患者体内更高效地清除HBV。在某些方面,VH可以包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:73、或SEQ ID NO:75的任意一个或多个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列。在某些方面,VL可以包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76任意一个或多个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列。在某些方面,VH/VL序列分别包含如下成对序列的任意一个或多个:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76。

[0201] 尽管本领域普通技术人员基于本公开可设想多种不同的二聚化、五聚化和六聚化结合分子,并因而包括在本公开中,但在某些方面,提供如上所述的结合分子,其中各结合单元包含两IgM重链,其各包含位于IgM恒定区或其片段的氨基末端的VH,以及两条免疫球蛋白轻链,其各包含位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。在某些方面,提供如上所述的结合分子,其中每个结合单元包含两条IgA重链,其各包含位于IgA恒定区或其片段的氨基酸末端的VH,以及两条免疫球蛋白轻链,其各包含位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基酸末端的VL。

[0202] 此外,在某些方面,结合分子的至少一个结合单元,或结合分子的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、或至少六个结合单元,包含或包括如上所述的HBV抗原结合结构

域中的两个。在某些方面,结合分子的一个结合单元中的两个HBV抗原结合结构域,或结合分子的两个、三个、四个、五个、或六个结合单元中的两个HBV抗原结合结构域可以是彼此不同的,或它们可以是相同的。

[0203] 在某些方面,结合分子的一个结合单元中的两条IgA重链或结合分子的两个结合单元中的两条IgA重链是相同的。在某些方面,结合分子的一个结合单元中的两条IgM重链或结合分子的两个、三个、四个、五个、或六个结合单元中的两条IgM重链是相同的。

[0204] 在某些方面,结合分子的一个结合单元中的两条轻链或结合分子的两个、三个、四个、五个、或六个结合单元中的两条轻链是相同的。在某些方面中,结合分子的至少一个结合单元中的两条相同的轻链,或结合分子的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的两条相同的轻链是 $\kappa$ 轻链,例如,人 $\kappa$ 轻链,或 $\lambda$ 轻链,例如,人 $\lambda$ 轻链。

[0205] 在某些方面,本公开所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子的至少一个、两个、三个、四个、五个、或六个结合单元包含或各包含两条相同的IgA或IgM重链,以及两条相同的轻链。根据这一方面,结合分子的一个结合单元中的HBV抗原结合结构域,或结合分子的两个、三个、四个、五个、或六个结合单元中的HBV抗原结合结构域可以是相同的。此外根据这一方面,本文提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子可以包含至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、或十二个如上所述的HBV抗原结构域的拷贝。在某些方面,结合单元的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个可以是相同的,并且,在某些方面,结合单元可以包含相同的抗原结合结构域,例如,至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或至少十二个HBV抗原结合结构域可以是相同的。

[0206] 在某些方面,二聚化、六聚化、或五聚化结合分子包括至少一个包含VH和VL的抗原结合结构域,其中VH区、VL区、或VH和VL区两者与分别包含如下氨基酸序列的对应的VH和VL区相关:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76。在某些方面,二聚化、五聚化、或六聚化结合分子包括至少一个包含VH的HBV抗原结合结构域,其中VH区与包含氨基酸序列SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的对应的VH区相关。

[0207] 在某些方面,二聚化、六聚化、或五聚化结合分子包括至少一个HBV抗原结合结构域,其含有:包含下述VH和VL氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区或具有一个或两个单一氨基酸取代的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区的VH,和LCDR1、LCDR2、和LCDR3区或具有一个或两个单一氨基酸取代的LCDR1、LCDR2、和LCDR3区,所述VH和VL氨基酸序列分别是SEQ ID NO:1和

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76。在某些方面，二聚化、六聚化、或五聚化结合分子包括至少一个含有VH的HBV抗原结合结构域，该VH含有HCDR1、HCDR2、和HCDR3区，或包含一个或两个单一氨基酸取代的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区。

[0208] 在某些方面，二聚化、六聚化、或五聚化结合分子包括至少一个含有VH和VL的HBV抗原结合结构域，其中VH区、VL区、或VH和VL区两者分别含有与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列。在某些方面，二聚化、五聚化、或六聚化结合分子包括至少一个含有VH的HBV抗原结合结构域，其中VH区含有与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列。

[0209] 在某些方面，VH和VL可以衍生自美国专利7,115,723中所述的HBV前S1mAb。例如，HBV抗原结合结构域可以含有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VH氨基酸序列，以及与SEQ ID NO:3至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VL氨基酸序列。

[0210] 在某些方面，VH和VL可以衍生自Hong等，*Virology*, 318:131-141, 2004中所述的HBV前S1mAb。例如，HBV抗原结合结构域可以含有与SEQ ID NO:4至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VH氨基酸序列，以及与SEQ ID NO:3至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少

90%、至少95%或100%相同的VL氨基酸序列。

[0211] 在某些方面,VH和VL可以衍生自美国专利8,420,353中所述的HBV前S1mAb。例如,HBV抗原结合结构域可以含有与SEQ ID NO:5至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VH氨基酸序列,以及与SEQ ID NO:6至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VL氨基酸序列。

[0212] 在某些方面,HBV抗原结合结构域可以含有VH和VL氨基酸序列,其分别包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76。在某些方面,HBV抗原结合结构域可以含有VH氨基酸序列,其含有SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13。

[0213] 在某些方面,提供了本文中称作HBV24M的六聚化或五聚化抗体,其含有包含氨基酸序列SEQ ID NO:58的IgM重链,以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:59的κ轻链。SEQ ID NOs 58和59如下提供:

[0214] >HBV24 IgM重链 (SEQ ID NO:58)

[0215] QVQLVQSGAEVKAPGASVKVSKASGYTFTSAWMNWRQAPGQGLEWMGRIYPSGGSTSYAQKFQGRVT  
MTADKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREYRVARWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD  
YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT  
CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0216] >HBV24κ轻链 (SEQ ID NO:59)

[0217] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQKPGQPPQRLIYLVSNRDSGVPDRFSG  
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPQTFGGGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0218] 在某些方面,提供了含有氨基酸序列SEQ ID NO:62的人源化重链可变区 (VH)。

[0219] >HBV24M2 IgM重链 (SEQ ID NO:62)

[0220] QVQLVQSGAEVKAPGASVKVSKASGYTFTSAWMNWRQAPGQGLEWMGRIYPSGGSTSYAQKFQGRVT  
MTADKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREYDEAYWGQGLTVTVSS

[0221] 在某些方面,提供了本文中称作HBV24M2的六聚化或五聚化抗体,其含有包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的IgM重链,以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:59的κ轻链。SEQ ID NO:

63和59如下提供：

[0222] >HBV24M2 IgM重链 (SEQ ID NO:63)

[0223] QVQLVQSGAEVKAPGASVKVSKASGYTFTSAWMNWRQAPGQGLEWMGRIYPSGGSTSYAQKFQGRVT  
MTADKSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAREYDEAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD  
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHT  
CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0224] >HBV24κ轻链 (SEQ ID NO:59)

[0225] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQKPGQPPQRLIYLVSNRDSGVPDRFSG  
SGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCVQGTHFPQTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0226] 在某些方面，相较于其它结合分子，例如含有相同抗原结合结构域的参照单结合单元，本文提供的二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子可以具有有利的结构或功能性质，或“改善的结合特点”。例如，相对于如上所述对应的参照单结合单元，例如，含有与多聚化结合分子中存在的VH和VL区序列相同的VH和VL区序列的IgG1结合分子，二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子在体内或体外的生物试验中可以具有改善的活性或性能。生物试验包括但不限于病毒中和试验、试验、细胞黏着试验、病毒排出试验、免疫组织化学试验、定向细胞毒性试验，补体介导的细胞毒性 (CDC) 试验、T细胞介导的杀伤 (TDCC) 试验、NK细胞介导的杀伤试验等。在某些方面，与等量的特异性结合与所述HBV抗原结合结构域相同的HBV表位的单特异性、单结合单元IgG1抗体或其片段相比，本文提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子，例如，IgM抗体，可以更高的功效进行定向HBV中和，或杀伤受HBV感染细胞。

[0227] “功效”或“改善的结合特点”指为了实现给定的生物结果，例如，中和给定的试验 (EC<sub>20</sub>, EC<sub>50</sub>, 或EC<sub>90</sub>) 中20%、50%、或90%的病毒培养液，所需的给定的结合分子的最小量。功效可以表示为曲线，其中例如，%病毒中和，%受感染细胞的杀伤，或其它测量参数在Y轴，而结合分子浓度 (以例如μg/ml或nM表示) 在X轴。

[0228] 在某些方面，TDCC可以通过T细胞活性试验在体外进行测量，例如，通过存在本文提供的双特异性抗-HBsAg x抗-CD3 IgM结合分子条件下，对HBsAg-表达细胞和工程改造的CD3-表达T细胞进行共培养，并且通过细胞因子释放、目标细胞裂解、或其它检测方法测量T细胞活性。在某些方面，TDCC可以通过T细胞定向的靶细胞杀伤进行测量。

[0229] 在某些方面，HBsAg-表达细胞可以是永生细胞系，例如，肝细胞癌 (HCC) 细胞系，例如，PLC/PRF/5细胞，或例如HEK293、CHO、HepG2、或HepaRG细胞的细胞系，其经HBV抗原转染并表达HBV抗原，例如，HBsAg或HBsAg-L，或受HBV感染细胞，例如，受HBV感染的HepaRG细胞，或产生HBV的细胞，例如，HepG2.2.15细胞。本领域普通技术人员已知并可容易地获得相似的细胞系。在某些方面，HBV抗原-表达细胞系可以从患HBV感染、HCC、或相关癌症的患者处得到。

[0230] 在某些方面，可以在使用分离的T细胞和/或补体或包括T细胞和补体的全血的试验中体外测试HBV抗原-表达细胞的全部的杀伤，所述杀伤例如通过CDC、TDCC、ADCC、或其它杀伤的方式，例如细胞凋亡。

[0231] 在某些方面,例如在结合分子是如本文所提供的含有五个相同结合单元的五聚化结合分子(其中各结合单元含有两个相同的抗-HBsAg结合结构域,其在使用例如HBsAg-表达PLC/PRF/5细胞系或HepG2.2.15细胞的CDC试验中进行测试)的情况下,该结合分子以比等量(通过例如 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $\text{nM}$ 测量)的抗-HBsAg单特异性IgG1抗体与相同的抗-HBsAg结合结构域(同等重量或摩尔浓度)的 $1\text{C}_{50}$ 测量值低至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少150倍、至少200倍或更多倍的 $1\text{C}_{50}$ 来引导补体介导的杀伤。在某些方面,HBsAg-表达细胞是PLC/PRF/5细胞系或HBsAg转染的细胞,结合分子以比等量(例如摩尔或分子重量当量测量)的抗-HBsAg单特异性IgG1抗体与相同的抗-HBsAg结合结构域的 $1\text{C}_{50}$ 低至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍或更多倍的 $1\text{C}_{50}$ 来引导补体介导的杀伤。

[0232] 在某些方面,本文提供的五聚化结合分子含有五个相同的结合单元,各结合单元含有两个相同的抗-HBsAg结合结构域,加上本文提供的野生型或经修饰的J链,可以在表现出较低HBV抗原表达水平的细胞中进行的CDC试验中显示增强的功效。例如,如本文所提供的具有野生型或经修饰的J链的五聚化结合分子,其在使用HBsAg-表达PLC/PRF/5细胞系或HepG2.2.15细胞的CDC试验中进行测试,其以比等量(通过例如摩尔或分子重量当量测量)的抗-HBsAg单特异性IgG1抗体与相同的抗-HBsAg结合结构域的 $1\text{C}_{50}$ 低至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少150倍、至少200倍或更多倍的 $1\text{C}_{50}$ 来引导补体介导的杀伤。

[0233] 在某些方面,本文提供的双特异性结合分子含有五个相同的结合单元,各结合单元含有两个相同的抗-HBV结合结构域,加上本文提供的能够结合人CD3(例如,V15J或J15V)经修饰的J链,可以在TDCC试验中显示增强的功效。例如,如本文所提供的具有能够结合人CD3(例如,V15J或J15V)的经修饰的J链的五聚化抗-HBsAg结合分子,其在例如使用HBsAg-表达PLC/PRF/5细胞系或与工程改造的Jurkat T细胞共培养的HepG2.2.15细胞的T细胞活化试验中进行测试,其以比等量(通过例如摩尔或分子重量当量测量)的双特异性抗-HBsAg IgG1抗体以及结合HBV抗原-表达细胞和T细胞(例如,单结合单元双特异性抗-HBsAg x抗-CD3分子)的相同的抗-HBsAg结合结构域的 $1\text{C}_{50}$ 低至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少150倍、至少200倍或更多倍的 $1\text{C}_{50}$ 促进T细胞介导的杀伤。

[0234] 在某些方面,本文提供的单特异性或双特异性五聚化结合分子含有五个相同的结合单元,各结合单元含有两个相同的抗-HBV结合结构域,加上本文提供的能够结合人CD3(例如,V15J或J15V)野生型J链或经修饰的J链,可以在全血体外细胞毒性试验中显示增强的功效。例如,如本文所提供的五聚化抗HBV结合分子加上能够结合人CD3(例如,V15J或J15V)的野生型或经修饰的J链,在使用HBsAg表达PLC/PRF/5细胞系与Hirudin抗凝人血共培养的合适的体外细胞毒素试验中进行测试,可以以比等量(通过例如摩尔或分子重量当量测量)的抗-HBsAg单特异性IgG1抗体以及相同的抗-HBsAg结合结构域的 $1\text{C}_{50}$ 低,或以比等量(通过例如摩尔或分子重量当量测量)的双特异性抗-HBsAg IgG1抗体以及结合HBV抗原-表达细胞和T细胞(例如,双特异性单结合单元抗-HBsAg x抗-CD3分子)的相同的抗-HBsAg结合结构域的 $1\text{C}_{50}$ 低至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至

少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少150倍、至少200倍或更多倍的IC<sub>50</sub>实现PLC/PRF/5细胞或HepG2.2.15细胞的杀伤。

[0235] 在某些方面,本文提供的单特异性或双特异性五聚化结合分子含有五个相同的结合单元,各结合单元含有两个相同的抗-HBV结合结构域,加上本文提供的能够结合人CD3(例如,V15J或J15V)野生型J链或经修饰的J链,可以在体内显示增强的HBsAg-表达或杀伤受HBV感染细胞。

[0236] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0237] 本公开还提供多核苷酸,例如,分离的、重组、和/或非天然产生的多核苷酸,其包含编码上述二聚化、六聚、或五聚化结合分子的多肽亚基的核酸序列。“多肽亚基”表示可被独立地翻译的结合分子、结合单元或结合结构域的部分。示例包括但不限于,抗体可变区,例如,VH或VL、单链F<sub>v</sub>、抗体重链、抗体轻链、抗体重链恒定区、抗体轻链恒定区,和/或其任何片段。

[0238] 在某些方面,多肽亚基可以含有IgM或IgA重链恒定区或其片段,以及HBV抗原结合结构域的VH部分。在某些方面,多核苷酸可以编码含有融合至VH的C末端的IgM或IgA恒定区或其片段的多肽亚基,其中所述VH包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:73、或SEQ ID NO:75的VH的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区,或具有一个或两个单氨基酸取代的该HCDR1、HCDR2、和HCDR3区。

[0239] 在某些方面,如上文所述,多肽亚基可以含有HBV抗原结合结构域的VL部分。在某些方面,多肽亚基可以含有融合至VL的C末端的人抗体轻链恒定区或其片段,其中所述VL包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76的VH的HCDR1、HCDR2、和HCDR3区,或具有一个或两个单氨基酸取代的该HCDR1、HCDR2、和HCDR3区。

[0240] 在某些方面,多核苷酸可以编码包含融合至VH的C末端的IgM或IgA恒定区或其片段的多肽亚基,其中VH包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:73、或SEQ ID NO:75任意一个或多个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少

95%或100%相同的氨基酸序列。

[0241] 在某些方面,多核苷酸可以编码包含融合至VL的C末端的人轻链恒定区或其片段的多肽亚基,其中VL包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76任意一个或多个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的氨基酸序列。

[0242] 因此,为了形成抗原结合结构域,可以将与乙型肝炎抗原特异性结合的抗体的可变区插入IgM和/或IgA结构的表达载体模板,从而创造出具有至少两个二价结合单元的多聚化结合分子。简言之,可以由现有的分子合成或扩增编码重链和轻链可变区序列的核酸序列,并且将其以合适的取向和结构插入载体,在表达之后,载体将收获全长的重链或轻链。用于这些目的的载体是本领域所熟知的。这样的载体可以还含有增强子和其它为了实现目标链的表达所需的序列。可以使用多种载体或单一载体。将这些载体转染至宿主细胞,然后表达和纯化链。在表达之后,链形成全功能的多聚化结合分子,如同文献中所报道。该完全组装的多聚化结合分子接下来通过标准方法进行纯化。如果需要,表达和纯化过程可以在商业化规模下进行。

[0243] 本公开还提供一种组合物,其包含两个或更多个多核苷酸,其中,所述两个或更多个多核苷酸可共同地编码如上所述的二聚化、六聚化、或五聚化结合分子。在某些方面中,组合物可包括编码IgM和/或IgA重链或其片段的多核苷酸,例如,如上所述的人IgM和/或IgA重链的多核苷酸,其中IgM和/或IgA重链至少包含HBV抗原结合结构域的VH,和编码轻链或其片段的多核苷酸,例如,至少包含HBV抗原结合结构域的VL的人κ或λ轻链的多核苷酸。提供的多核苷酸组合物还可包括编码J链(例如,人J链)或其片段或其变体的多核苷酸。在某些方面,本文提供的组合物所含的多核苷酸可位于两个或三个分开载体(例如,表达载体)上。本公开提供了这样的载体。在某些方面中,本文提供的组合物所含的多核苷酸中的两种或更多种可位于单一载体(例如,表达载体)上。本公开提供了这样的载体。

[0244] 本公开还提供宿主细胞,例如,原核或真核宿主细胞,其包含编码如本文所提供的二聚化、五聚化或六聚化或其任何亚基的多核苷酸或两个或更多个多核苷酸,如本文所提供的多核苷酸组合物,或载体或两个、三个或更多个载体,其共同地编码如本文所提供的二聚化、五聚化或六聚化HBV结合分子或其任何亚基。在某些方面,本公开所提供的宿主细胞可表达入本公开所提供的二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子,或其亚基。

[0245] 在一个相关方面中,本公开提供了生产本公开提供的二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子的方法,其中所述方法包括培养如上所述的宿主细胞,和回收结合分子。

[0246] 使用方法

[0247] 本公开提供了,在例如两个或多个亚型中,在慢性受感染的细胞中控制乙型肝炎病毒(HBV)增殖、潜伏、或维持的改进的方法,例如,控制病毒结合、传染性、复制、潜伏、排出等,使用基于IgA的二聚化HBV结合分子、或基于IgM的五聚化或六聚化HBV结合分子。如下所述方法可以利用含有衍生自任何新的或现存的HBV抗体的抗原结合结构域的多聚化结合分

子,包括但不限于,抗体和在表2所列参考中公开的对应的VH和VL序列,或其变体、衍生物、或类似物,其中二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如,1gM抗体),相较于如上所述并且阐述的对应的单结合单元抗体、片段、变体、衍生物、或类似物,可以提供改善的功效。基于本公开,含有任何感兴趣的HBV特异性抗原结合结构域的二聚化1gA结合分子、或五聚化或六聚化1gM结合分子的构建完全在本领域普通技术人员的能力范围内。抗-HBV的1gA或1gM形式的亲合力增加可以导致更有效的治疗性抗体,其可以结合那些具有非常低的HBV表面蛋白质密度的受感染细胞,允许改善的病毒中和,改善的杀伤受HBV感染的细胞,例如,通过补体或T细胞介导的细胞毒性,预防由HBV感染所引起或加重的疾病或病症,包括但不限于,急性肝炎、慢性肝炎、肝脏炎症、肝硬化、肝衰竭、肝细胞癌(HCC)、或其组合,以及从受感染患者体内更高效地清除HBV。这些组合物改善的结合特点可以,例如,允许使用减少的剂量,或可以导致对于耐受单结合单元抗体的病毒或受病毒感染的细胞更有效的进行中和和/或清除。“耐受”表示HBV抗体在中和HBV、清除HBV或受HBV感染的细胞,控制感染性、复制、释放等中任何程度的活性降低。

[0248] 在某些方面,本公开提供了一种治疗由患者体内乙型肝炎病毒(HBV)感染引起或加重的疾病或病症的方法,其包括给予感染了HBV或易于感染HBV的患者如本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子,例如,1gM抗体。如在本文其它部分所述,提供的结合分子相对于含有等价或相同抗原结合结构域的参照单结合单元抗体(例如,与相同HBV表位特异性结合的单特异性、单结合单元1gG抗体或其片段,例如,在HBV表面抗原的前S1区上的表位),可以表现出增强的效力,如同例如包含氨基酸序列SEQ 1D NO:62的VH和氨基酸序列SEQ 1D NO:6的VL的抗原结合结构域。在某些方面,疾病或病症是急性肝炎、慢性肝炎、肝脏炎症、肝硬化、肝衰竭、干细胞癌(HCC)、或其组合。在某些方面,使用结合分子,例如本文提供的1gM抗体治疗的患者可以表现出某些疾病症状,例如但不限于:病毒载量增加、病毒脱落、腹部疼痛、黑尿、发烧、关节疼痛、食欲减退、恶心和呕吐、虚弱和疲劳,黄疸、或其组合在某些方面,相较于等价的单一结合单元抗体,通过本文所提供的结合分子可以很大程度上的缓解或减轻疾病症状。

[0249] 在某些方面,本公开提供了引导中和HBV改善的方法,其中该方法包括将HBV、或受HBV感染的细胞与本文所述二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如,1gM抗体)接触,其中结合分子可以相较于等量的参照单结合单元结合分子(例如,与相同HBV表位特异性结合的单特异性、单一结合端原1gG抗体或其片段,例如,在HBV表面抗原的前S1区上的表位)更高的功效引导病毒中和,如同例如包含氨基酸序列SEQ 1D NO:62的VH和氨基酸序列SEQ 1D NO:6的VL的抗原结合结构域。例如,抗原结合结构域可以含有与SEQ 1D NO:1或SEQ 1D NO:2至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VH氨基酸序列,和与SEQ 1D NO:3至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VL氨基酸序列。在另一方面,抗原结合结构域可以含有与SEQ 1D NO:5或SEQ 1D NO:62至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VH氨基酸序列,和与SEQ 1D NO:6至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的VL氨基酸序列。在某些方面,如本文所提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如,1gM抗体)K可以引导两个或多个HBV亚型以较高的功效中和病毒,相较于等量

的单特异性、单一结合单元HBV单克隆抗体,例如,对应的IgG抗体或其片段,其中抗体是或含有与例如表2中所列的VH和VL序列相同的VH和VL区。在某些方面,六聚化或五聚化结合分子(例如,1gM抗体)或其片段,其包括含有氨基酸序列SEQ 1D NO:58的重链和含有氨基酸序列SEQ 1D NO:59的轻链。在某些方面,六聚化或五聚化结合分子(例如,1gM抗体)或其片段,其包括含有氨基酸序列SEQ 1D NO:63的重链和含有氨基酸序列SEQ 1D NO:59的轻链。

[0250] 例如,方法包括对感染性HBV病毒颗粒、或其他感染性病毒颗粒的亲合性和/或亲合力还没有确定的各种结合分子的筛选。本文所提供的方法可以用于鉴定这样的结合分子,其以比结合HBV亚病毒颗粒更高的亲和性、更高的亲合力、或其组合结合感染性乙型肝炎病毒(HBV)病毒颗粒表面、如果受HBV感染的细胞的表面、或这些组合。抗-HBV的IgA或IgM形式的亲合力增加可以导致更有效的治疗性抗体,其可以结合那些具有非常低的HBV表面蛋白质密度的受感染细胞,允许更高效地从受感染患者体内清除HBV。相似地,本文所提供的方法可以用于鉴定这样的结合分子,其以比结合相同病毒的非感染性型更高的亲和性、更高的亲合力、或两者,结合感染性病毒颗粒或受病毒感染的细胞的表面。因此,本文所提供的具有如上所述有利的性质的结合分子可用于结合感染性HBV或其它病毒颗粒的方法。由于本文所提供的多聚化结合分子的有利的性质,可以鉴定出结合分子以比结合亚病毒(非感染性)HBV病毒颗粒或其它非感染性病毒颗粒更高的亲合力或亲和性,结合感染性HBV颗粒或其它感染性病毒颗粒。因此,公开了这样的方法,其中具有这样性质的这些结合分子可以这样鉴定,通过检测结合感染性和非感染性病毒颗粒并比较结合亲和性和/或亲合力,从而鉴定具有有利的性质的其它结合分子。可以通过这一方法筛选出以比结合亚病毒(非感染性)病毒颗粒更高的亲合力或亲和性、或其组合结合感染性颗粒的结合分子。

[0251] 该方法通常可以通过将测试结合分子与感染性病毒颗粒接触并且测量测试结合分子与感染性病毒颗粒结合的亲和性和/或亲合力进行。测试结合分子还与非感染性HBV亚病毒颗粒或其它非感染性病毒颗粒接触,并且可以删除测试结合分子与HBV应变点颗粒或其它非感染性颗粒结合的亲和性和/或亲合力。将两测试的结果进行比较,从而鉴定出测试化合物(结合分子),其与感染性HBV颗粒或其它感染性颗粒结合的亲和性和/或亲合力要高于其与非感染性HBV亚病毒颗粒或其它非感染性颗粒结合的亲和性和/或亲合力。

[0252] 以此方式,可以鉴定并且利用可以用于本文所提供的方法的其它结合分子。

[0253] 相似地,公开了这样的方法,其中尚未测定各种测试化合物(结合分子)对于受HBV感染的细胞或其它受病毒感染的细胞的亲和性和/或亲合力。本文提供的方法可用于这样的鉴定结合分子,其以更高的亲和性、更高的亲合力、或其组合结合受HBV感染的细胞或其它受感染细胞表面,相较于结合没有被病毒感染或结合非感染性病毒颗粒的相同细胞。因此,具有如上所述有利的性质的结合分子可用于结合受HBV感染的细胞或其它受病毒感染的细胞的方法。由于本文所提供的多聚化结合分子的有利的性质,结合分子可以更高的亲合力或/或亲和性结合受HBV感染的细胞或其他受病毒感染的细胞,相较于那些结合相似的非感染性细胞、或结合非感染性病毒颗粒。因此,公开了这样的方法,其中受病毒感染的细胞和未受感染的细胞,以及非感染性病毒颗粒,并且比较结合亲和性和/或亲合力,从而鉴定结合的不同。可以通过该方法筛选出以较高的亲合力或/或亲和性结合受HBV感染的细胞或其它受病毒感染的细胞的结合分子,相较于那些结合未被HBV或其它病毒所感染的相似的细胞、或结合非感染性病毒颗粒。

[0254] 该筛选方法可以通过下述步骤实现：将测试结合分子与受HBV感染的细胞(或受其他病毒感染的细胞)接触,并测量测试结合分子结合受HBV或病毒感染细胞的亲和性和/或亲合力,并且将相同的测试结合分子与未受HBV或其它病毒感染的细胞接触,并测量测试结合分子结合未受HBV或其它病毒感染的细胞的亲和性和/或亲合力,其中未受感染的细胞与受HBV感染的细胞相同,除了其未被感染。接下来可以比较该测试化合物、或任意数目的测试化合物的结合结果,从而鉴定其中受感染的细胞的亲和性和/或亲合力高于未受感染的细胞或非感染性病毒颗粒的测试化合物。

[0255] 在这样方法中的细胞可以是任何能够被HBV或其它病毒感染的细胞,例如,人类细胞。

[0256] 在某些方面,二聚化、五聚化、或六聚化结合分子(例如,1gM抗体)的HBV抗原结合结构域含有六个免疫球蛋白互补决定区HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、和LCDR3,其中至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、或至少六个CDR与图表2中所列HBV抗体中的任意一个对应的CDR相关联,例如,那些具有对乙型肝炎表位HBsAg亲和性的,例如,前S1区。

[0257] 用于本文所提供的方法的二聚化、六聚化或五聚化结合分子是具有两个、五个或六个如同本文所定义的“结合单元”的结合分子,其可以特异性地结合两个或多个HBV亚型,例如,A、B、C、D、E、F、G和/或H。在某些方面,用于本文所提供的方法的二聚化、五聚化或六聚化结合分子各自含有两个、五个或六个二价结合单元,其中各结合单元包括两个1gA重链恒定区或其片段(对于基于1gA的结合分子),或两个1gM重链恒定区或其片段(对于基于1gM的结合分子)。在某些方面中,两个1gA或1gM重链恒定区是人重链恒定区。

[0258] 相较于其它结合分子,用于本文提供的方法的二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子可以具有有利的结构或功能性质。例如,相较于如上所述的对应的参照单结合单元,例如,1gG或其变体、类似物,或衍生物,如上所述,用于本文提供的方法的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子可在生物试验(体外或体内)中具有改善的活性。生物试验包括但不限于体外中和试验、血凝抑制试验、细胞黏着试验、病毒排出试验、免疫组织化学试验、直接细胞毒性试验,补体介导的细胞毒性试验等。体内功效模型包括但不限于内源性肝功能减弱并用人肝细胞再造的免疫功能不全的鼠模型。或者,二聚化、五聚化、或六聚化结合分子可以使用HBV感染的非人灵长动物在体内进行测试,从而评估HBV清除(参见实施例7,如下所示)。

[0259] 药物组合物和给药方法

[0260] 制备和给予本文所提供的多聚化结合分子,例如,二聚化、五聚化、或六聚化结合分子,例如1gM抗体,至有此需要的对象的方法是本领域人员熟知且能根据本发明容易地确定的。多聚化结合分子的给予途径可以是,例如,经口、胃肠外、通过吸入或局部给予。本文所用的术语胃肠外包括例如,静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道给药。尽管这些给予形式设想为合适的形式,但给予形式的其它示例将是注射用溶液,具体地是用于静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。合适的药物组合物可包含缓冲剂(如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂(如聚山梨酯),以及在某些实施方式中的稳定剂(如人白蛋白)等。

[0261] 如本文所述,本文提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子可以药学上有效的量给予,用于需要消耗B细胞的疾病和病症的体内治疗。在这方面,应理解的是,将配制本本文

公开的多聚化结合分子以利于给药并提高活性物质的稳定性。药物组合物因此可含有药学上可接受的、非毒性无菌运载体,例如生理盐水、非毒性缓冲液、防腐剂等。本文提供的二聚化、五聚化或六聚化HBV结合分子的药学有效的量表示足以实现有效结合靶标并实现治疗益处的量。合适的制剂描述于《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 马克出版公司(Mack Publishing Co.)第16版。(1980)。

[0262] 本文提供的某些药物组合物可以可接受的剂型口服给予,包括例如,胶囊、片剂、水性悬液或溶液。也可通过鼻气溶胶或吸入来给予某些药物组合物。这类组合物可采用苯甲醇或其他合适的防腐剂,吸收促经济以增强生物可及性,和/或其他常规增溶剂或分散剂制备成盐水溶液。

[0263] 可与运载体材料组合以产生单一剂型的二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子的量将根据,例如,治疗的对象和具体的给予模式而变化。可以单剂型、多剂型或在确立的时间段内的输注中给予组合物。也可调整给药方案,以提供最优所需响应(例如,治疗或预防性响应)。

[0264] 保持在本公开的范围内,本文提供的二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子可以足够的量给予有治疗需求的对象以产生治疗作用。如本文提供的多聚化结合分子可以常规的剂型给予该对象,该常规的剂型通过根据已知技术,将本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物与常规的药学上可接受的运载体或稀释剂相组合来制备。药学上可接受的运载体或稀释剂的形式和性质可根据其将要组合的活性成分的量、给予途径和其它熟知变量来描述。

[0265] “治疗有效剂量或量”或“有效量”意在表示,当给予时,就患有需要治疗的疾病或病症的患者的治疗而言,获得积极治疗响应的二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子的量。

[0266] 本文公开的组合物对于由乙型肝炎病毒感染引起或加重的疾病或病症的治疗的有效剂量将根据许多不同的因素变化,包括给药方式、目标位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、给予的其他药物和治疗是预防性还是治疗性。在某些方面中,对象或患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可使用本领域技术人员已知的常规方法对治疗剂量进行滴定以优化安全性和功效。

[0267] 待给予的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子,例如1gM抗体的量是本领域普通技术人员根据本发明而容易地确定的,无需过度实验。影响给予模式和多聚化结合分子的相应量的因素影响包括但不限于,经历治疗个体的疾病严重性、病史、年龄、身高、体重、健康和身体状况。类似地,待给予的二聚化、五聚化、或六聚化HBV结合分子的量将取决于给予模式,以及对象将经历该试剂的单一剂量还是多重剂量。

[0268] 本公开还提供二聚化、五聚化或六聚化HBV结合分子在制备用于治疗、预防,或控制由乙型肝炎病毒感染所引起或加重的疾病或病症的药物中的应用。

[0269] 除非另有说明,本发明将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,它们均在本领域技术范围内。这些技术在文献中已有充分描述。(参见,例如Sambrook, J.等编(1989), *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》)(第二版;冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)); Sambrook等编(1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》), (冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 纽

约);D.N.Glover编,(1985)DNA Cloning(《DNA克隆》),卷1和卷11;Gait编(1984)Oligonucleotide Synthesis(《寡核苷酸合成》);Mullis等美国专利号4,683,195;Hames和Higgins编(1984)Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》);Hames和Higgins编(1984)Transcription And Translation(《转录和翻译》);Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(《动物细胞培养》)(Alan R.Liss有限公司);Immobilized Cells And Enzymes(《固定化细胞和酶》)(IRL出版社(IRL Press))(1986);Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning(《分子克隆实用指南》);该专著,Methods In Enzymology(《酶学方法》)学术出版社有限公司,纽约(Academic Press,Inc.,N.Y.);Miller和Calos编(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(《哺乳动物细胞基因转移载体》),(冷泉冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory));Wu等著Methods In Enzymology(《酶学方法》),第154和155卷;Mayer和Walker著(1987)Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》)(学术出版社,伦敦(Academic Press,London));Weir和Blackwell著(1986)Handbook Of Experimental Immunology(《实验免疫学手册》),卷1-1V;Manipulating the Mouse Embryo(《小鼠胚胎操作》),冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.), (1986);和在Ausubel等(1989)Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》)(约翰韦利父子公司,巴尔的摩,Baltimore(John Wiley and Sons,Baltimore,Md.))。

[0270] 抗体工程的一般原理可参见Borrebaeck编(1995)Antibody Engineering(《抗体工程》)(第2版;牛津大学出版社(Oxford Univ.Press))。蛋白质工程的一般原理可参见Rickwood等编(1995)Protein Engineering,A Practical Approach(《蛋白质工程,实践方法》),(英国牛津的牛津大学出版社的IRL出版公司(IRL Press at Oxford Univ.Press, Oxford,Eng.))。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理可参见:Nisonoff(1984)Molecular Immunology(《分子免疫学》)(第2版;马萨诸塞州桑德兰的辛奥尔联合公司(Sinauer Associates,Sunderland,Mass.));和Steward(1984)Antibodies,Their Structure and Function(《抗体的结构和功能》)(Chapman和Hall,纽约州纽约市)。此外,本领域已知且没有具体描述的免疫学标准方法可按照下述文献所述进行:Current Protocols in Immunology(《新编免疫学实验指南》),纽约州的约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons);Stites等编(1994)Basic and Clinical Immunology(《基础和临床免疫学》)(第8版;Appleton和Lange,康涅狄格州的诺沃克(Norwalk,Conn.))和Mishell和Shiigi(编)(1980)Selected Methods in Cellular Immunology(《细胞免疫学的选用方法》)(W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman and Co),纽约州)。

[0271] 列出免疫学通用原理的标准参考文献包括:Current Protocols in Immunology(《新编免疫学实验指南》),约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons),纽约州;Klein(1982)J.,Immunology:The Science of Self-Nonself Discrimination(《免疫学:自身-非自身区分的科学》)(约翰韦利父子公司,纽约州);Kennett等编(1980)Monoclonal Antibodies,Hybridoma:A New Dimension in Biological Analyses(《单克隆抗体,杂交瘤:生物学分析的新领域》)(普莱努公司(Plenum Press),纽约州);Campbell(1984)"Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular

Biology” (《生化和分子生物学实验室技术》中的“单克隆抗体技术”), Burden等编 (的埃尔斯威尔公司 (Elsevier), 阿姆斯特丹); Goldsby等编 (2000) Kuby Immunology (《库比免疫学》) (第4版; W.H. 弗里曼公司 (W.H. Freeman & Co.)); Roitt等 (2001) Immunology (《免疫学》) (第6版; 伦敦: 摩兹比公司 (Mosby)); Abbas等 (2005) Cellular and Molecular Immunology (《细胞和分子免疫学》) (第5版; 埃尔斯威尔健康科学分公司 (Elsevier Health Sciences Division)); Kontermann和Dubel (2001) Antibody Engineering (《抗体工程》) (施普林格公司 (Springer Verlag)); Sambrook和Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (《分子克隆: 实验室手册》) (冷泉港出版社 (Cold Spring Harbor Press)); Lewin (2003) Gene VIII (《基因VIII》) (普伦蒂斯霍尔出版社 (Prentice Hall) 2003); Harlow和Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (《抗体: 实验室手册》) (冷泉港出版社); Dieffenbach和Dveksler (2003) PCR Primer (《PCR引物》) (冷泉港出版社)。

[0272] 将上文中引用的所有参考文献以及其中引用的所有参考文献通过引用全文纳入本文。

[0273] 通过说明的方式, 而非限制性方式提供以下实施例。

[0274] 实施例

[0275] 实施例1: 表面抗原制备

[0276] 如先前报道可以制备表面抗原。(参见, 例如, Short等, J. Mol. Biol. (2009) 390, 135-141)。在一方法中, HBsAg分离自HBV携带者的血液。可以从例如, 英国伦敦Colindale中心国家血液服务研究部门诊断处 (Diagnostics, Development and Research Division, National Blood Service, Colindale Centre, London, UK) 获得包含HBV的冷冻血清。接着解冻并离心 (3700x g, 20分钟) 各个包装, 上清液在0.5ml的20%蔗糖TBS (5.1ml试管中) 中分层, 并离心 (266,000x g, 30分钟)。颗粒在20mM Tris氯化物 (PH 7.4) 和140mM NaCl (Tris缓冲盐水) 中重悬 (置于4°C湿润过夜至软化后), 合并以及用CsCl (0.22g/ml初始浓度) 进行平衡离心 (266,000x g, 72小时)。从梯度中取出组分 (250 $\mu$ l) 并通过电子显微镜和DNA提取进行监测, 分析乙型肝炎DNA。取出包含最合适的HBsAg颗粒的组分并针对TBS透析后备用, 最合适的HBsAg颗粒同时不含乙型肝炎DNA (并且因此, 不含病毒)。表面抗原HBsAg的各种形式 (长, 前S1-前S2-S; 中, 前S2-S; 短, S), 天然和重组以及肽片段, 均来自商业来源, 如同其它HBV蛋白的形式。

[0277] 实施例2: HBV衣壳和病毒粒子分离

[0278] 衣壳和病毒粒子的分离方法是本领域所熟知的, 并且可以通过各种已知方法进行。(参见, 例如, Dryden, 分子细胞 (Molecular Cell), 22:843-850, 六月23, 2006, 增补)。在一种衣壳分离的方法中, 新解剖的整个肝脏被灌注生理盐水溶液。然后在裂解缓冲液中将肝脏匀化 (例如, 0.25M蔗糖、1mM MgCl<sub>2</sub>、5mM Tris (pH 7.4)) 并且补充完全蛋白酶抑制剂 (罗氏应用科学, 印第安纳波利斯, 印第安纳州 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN))。各匀浆的上清液通过在SW40转子 (SW40 rotor) 中以4°C、11,000rpm离心15分钟获得。取上清液的等分, 用于进行HBV特异性的Southern印迹分析。然后, 剩余物在30%蔗糖垫 (0.73M蔗糖在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中) 上分层, 并且病毒颗粒通过在SW40转子中以4°C、40,000rpm离心5小时成团。其后, 将颗粒置于1ml的CsCl溶液 [3.3g CsCl溶解在10ml的PBS溶液中 (1x PBS、20mM EDTA、和1x完全蛋白酶抑制剂混合物 (complete protease

inhibitor cocktail))]中重悬。随后将重悬的物质转移至快速密封管(quick seal tubes)(加利福尼亚帕洛阿尔托市贝克汉姆仪器公司(Beckman Instruments,Palo Alto, CA))。将CsCl溶液填充至管内,密封,然后通过T180转子中以11℃、60,000rpm离心18小时将HBV颗粒分段(banded)。

[0279] 从底部刺穿管体并收集组分。合并含有衣壳的组分,在PBS中稀释,然后浓缩。组合过滤物,并沉淀(pellet)额外30分钟。然后分离样品,并上样至进行的CsCl梯度( $\rho$ 1.2-1.4)。4℃、38,000rpm离心3小时后,通过移液器收集组分(各200 $\mu$ l),测量它们的折射率,然后合并相同的组分。

[0280] 为了移除CsCl并且浓缩合并的组分,样品在PBS中成团并重悬三次,两次使用例如TLA100.4转子,最后使用例如TLA100.2转子,各以45,000rpm和4℃进行1小时。

[0281] 一种病毒粒子分离的方法中,将从一个或多个HBV阳性个体处获得的多个血浆分离单元(plasmapheresis units)合并,通过无菌棉布过滤,如其所述纯化病毒粒子。简言之,聚碳酸酯管装有65ml的血浆汇集(plasma pool),其在SW30转子中以21,000rpm、5℃进行3小时离心。倾滙上清液,在管内重新装入另外65ml的血浆汇集,并且重复进行离心。各来自130ml起始物质的两个团块分别在大约7ml的PBS中重悬,合并,并且在SW30转子中以30,000rpm、5℃离心通过7ml的PBS中的20%(w/w)蔗糖垫,持续4小时。团块在PBS中重悬至相较于原始起始物质50X的最终浓度,将其分为50 $\mu$ l等份并冷冻在-80℃。

[0282] 或者,HBV病毒粒子可以按照Kim所列出的方法生产(FEBS Letters 2015;589, 193-200)。简言之,病毒颗粒是通过用全长HBV基因组的载体(例如,pHBVEcoR1-;Gripon 1995;Viro1.213(2),292-299)瞬时转染HepG2细胞(ATCC HB-8065)所生成的。病毒颗粒其后可以通过PEG沉淀浓缩50倍(Le Seyed 1999;J.Viro1.73(3),2052-2057)。HBV病毒的基因型取决于所用载体。

[0283] 实施例3:对HBV具有特异性的工程改造的IgM结合分子

[0284] 本文所提供的各种HBV抗体的VH和VL区可以通过标准方法或商业承包商被克隆至IgG和IgM背景。

[0285] HBV24:美国专利号8,420,353中提供的对前S1抗原特异性的人源化抗体的VH和VL,本文中分别以SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6表示,被克隆至适当的载体之中以编码分别含有氨基酸序列SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:58的人IgG和IgM重链,和含有SEQ ID NO:59、SEQ ID NOs 58的 $\kappa$ 链轻链,58如上所述。将载体(在适当时与如下所述编码人野生型或经修饰的J链的载体一起)转染至HEK293细胞中并且允许其表达,从而生成IgG分子HBV24G和IgM分子HBV24M。

[0286] SEQ ID NO:84 HBV24G重链

[0287] QVQLVQSGAEVKAPGASVKVSKASGYTFTSAWMNWRQAPGQGLEWMGR1YPSGGSTSYAQKFQGRVTMTADKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYRVARWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLM1SRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0288] HBV23:Cerino,等(2015)PLOS one 10(4):e0125704.doi:10.1371中提供的对

HBsAg的S区特异性的人抗体的VH和VL,本文中分别以SEQ 1D NO:73和SEQ 1D NO:74表示,被克隆至适当的载体之中以编码分别含有氨基酸序列SEQ 1D NO:85和SEQ 1D NO:80的人IgG和IgM重链,和含有SEQ 1D NO:81的λ链轻链。将载体(在适当时与如下所述编码人野生型或经修饰的J链的载体一起)转染至HEK293细胞中并且允许其表达,从而生成IgG分子HBV23G和IgM分子HBV23M。

[0289] SEQ 1D NO:85 HBV23G重链

[0290] MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRFSSYAMSWVRQAPGKGL  
EWVSG1SGTGENTYYADSVKGRFT1SRDNSKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKDA1LGSHPWYFHVWGRGTLTVTS  
SASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL  
GTQTY1CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT1SKAKGQPREPQ  
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKSLSPG

[0291] SEQ 1D NO:80 HBV23M重链

[0292] MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRFSSYAMSWVRQAPGKGL  
EWVSG1SGTGENTYYADSVKGRFT1SRDNSKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKDA1LGSHPWYFHVWGRGTLTVTS  
SGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDS1TFSWKYKNSD1SSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSK  
DVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPV1AELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKL1CQATGFSPRQ1QVSWLREGK  
QVSGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLT1KESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPVDQDTA1RVFA1PPS  
FAS1FLTKSTKL1TCLVTDLTTYDSVT1SWTRQNGEAVK1THTN1SESHPNATFSAVGEAS1CEDDWSNGERFTCTVTH  
TDLPSPLKQ1T1SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLN1RESAT1TCLVTGFSPADVFVQW1MRGQPLSPEKYVTSAPMP  
EPQAPGRYFAHS1LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV1TERTV1DKSTGKPTLYNV1SLVMSDTAGTCY

[0293] SEQ 1D NO:81 HBV23M轻链

[0294]

MSVPTQVLGLLLLWLT DARCSYVL1TQPPSVSVAPGQTARMT1CGGNN1GSESVHWFQ1KPGQAPVLV1VYDDSDRPSG1  
PERFSGSNSGNTATLT1SRVEAGDEADY1CQVW1DSSSDH1AVFGGGTQLTVLG1QPKAAPS1VTLFPPSSEELQANKATL  
VCL1SDFYPGAVTV1AWKADSSPVKAGVET1TPSKQSN1KYAASSYLSL1TPEQWKSHRSY1SCQVTHEGSTVEKTVAPT  
ECS\*

[0295] HBV19:Pizarro,等,FEBS Letters 509:463-468(2001)中提供的对HBsAg的前S1区特异性的人抗体的VH和VL,本文中分别以SEQ 1D NO:75和SEQ 1D NO:76表示,被克隆至适当的载体之中以编码分别含有氨基酸序列SEQ 1D NO:86和SEQ 1D NO:82的人IgG和IgM重链,和含有SEQ 1D NO:83的κ链轻链。将载体(在适当时与如下所述编码人野生型或经修饰的J链的载体一起)转染至HEK293细胞中并且允许其表达,从而生成IgG分子HBV19G和IgM分子HBV19M。

[0296] SEQ 1D NO:86 HBV19G重链

[0297] MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQSPEKRL  
EWVAEVSSDGSYAYYPDTLTGRFT1SRDNAKNTLYLEMTSLRSED1TAMYYCASFNWDVAYWGQGLTVTVSAASTKGP  
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY1C  
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA  
LHNHYTQKSLSLSPG

[0298] SEQ ID NO:82 HBV19M重链

[0299] MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTSSYAMSWVRQSPEKRL  
EWVAEVSSDGSYAYYPDTLTGRFTISRDNANTLYLEMTSLRSEDAMYYCASFNWDVAYWGQGLVTVSAGSASAP  
TLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGT  
EHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVI AELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVGT  
TDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLT  
KSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHDLPSP  
KQTISRPGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGR  
YFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

[0300] SEQ ID NO:83 HBV19M轻链

[0301] METDTLLLWVLLLWVPGSTGELVMTQSPSSLAIVSVEKVTMSCRSSQSLNTRTRKSYLAWFQQKPGQS  
PKMLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCKQSYSLYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH  
QGLSSPVTKSFNRGEC

[0302] 利用不同的融合位点与抗-CD3抗体维西珠单抗 (Nuvion公司) 的不同区域合并构建两个不同的J链变体。如下所示是具有scFv的两条J链的序列, scFv对应于通过包含15个氨基酸的(GGGGS)<sub>3</sub>接头 (SEQ ID NO:72, 下划线) 以V15J和J15V两种不同取向融合至J链(斜体)的维西珠单抗(V) (VH-(GGGGS)<sub>3</sub>-VL, 双下划线)。各序列包含没有用下划线或斜体标出的N末端信号肽。在某些方面, 其它信号肽序列可以取代此处所示信号肽。

[0303] SEQ ID NO:67:V15J (DNA序列:SEQ ID NO:66) 的前体经修饰的J链序列:

MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV  
SCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTH  
YNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR  
SAYYDYDGFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI  
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKA  
[0304] PKRLIYDTSKLAGVPSRFRSGSGTDFLTITSSLPEDFAT  
YYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQE  
DERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNRE  
NISDPTSPLRTRFVYHLSLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNIC  
DEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGGETKMOVETALTPDAC  
YPD

[0305] SEQ ID NO:68::V15J的成熟的经过修饰的J链序列:

[0306] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRO  
APGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSAST  
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGLV  
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIOMTQSPSSLSASVGD  
RVTITCSASSSVSYMNWYQOKPGKAPKRLIYDTSK  
LASGVPSRFSGSGSGTDFLT  
TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTK  
LEIKGGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARIT  
SRIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLR  
TRFVYHLSDLCKKCDPTE  
VELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYT  
AVVPLVYGGGETKMVETALTPDACYPD

[0307] SEQ ID NO:66:

[0308] ATGGGCTGGTCCTACATCATCCTCTTCCTCGTGGCCACAGCCACAGGCGTCCATAGCCAGGTGCAGCTG  
GTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTCCGGCTACACCTTCAT  
CTCCTACACCATGCACTGGGTGAGGCAAGCTCCTGGCCAGGCCTGGAGTGGATGGGATACATCAACCCTCGGTCCG  
GCTATAACCCACTACAATCAGAAGCTGAAGGACAAGGCCACCCTGACCGCTGACAAGTCCGCCTCCACCGCTTACATG  
GAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTIONGTGCCAGGTCCGCCTACTACGACTACGACGGATT  
CGCTTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGAGCTCCGGAGGAGGAGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGGC  
GCGGCAGCGATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGC  
AGCGCTTCTCCTCCGTGTCTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGAGGCTGATCTACGA  
CACCTCCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCTTCCAGGTTCCAGCGGCTCCGGCTCCGGAACCGACTTACCCTGACCATTA  
GCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAACCCTCCACCTTCGGCGGGCGGC  
ACAAAGCTGGAGATCAAGGGAGGAGGAGGATCCGGTGGTGGTGGTCTGGCGGAGGTGGATCCCAAGAAGATGAAAG  
GATTGTTCTTGTGACAACAAATGTAAGTGTGCCCCGATTACTTCCAGGATCATCCGTTCTTCCGAAGATCCTAATG  
AGGACATTGTGGAGAGAAACATCCGAATTATTGTTCTCTGAACAACAGGGAGAATATCTCTGATCCCACCTCACCA  
TTGAGAACCAGATTTGTGTACCATTTGTCTGACCTCTGTAAAAAATGTGATCCTACAGAAGTGGAGCTGGATAATCA  
GATAGTTACTGCTACCCAGAGCAATATCTGTGATGAAGACAGTGCTACAGAGACCTGCTACACTTATGACAGAAACA  
AGTGCTACACAGCTGTGGTCCCACTCGTATATGGTGGTGAGACCAAAATGGTGGAACAGCCTTAACCCAGATGCC  
TGCTATCCTGACTGA

[0309] SEQ ID NO:70:J15V (DNA序列:SEQ ID NO:69)的前体经修饰的J链序列:

[0310] MKNHLLFWGVLAVFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARI  
TSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYH  
LSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRN  
KCYTAVVPLVYGGGETKMVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSG  
GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFISYTMH  
WVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTAD  
KSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWG  
QGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIOMTQSPSSLSASV  
DRVTITCSASSSVSYMNWYQOKPGKAPKRLIYDTSK  
LASGYPSRFSGSGTDFLT  
TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFG  
GGTKLEIK

[0311] SEQ ID NO:71::J15V的成熟的经过修饰的J链序列:

[0312] QEDERIVLVDNKCKCARITSRIHRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNN  
RENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSN  
ICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGGETKMOVETALTPDA  
CYPDGGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVK  
VSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYT  
HYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCA  
RSAYYDYDGFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS  
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPG  
KAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDE  
ATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

[0313] SEQ ID NO:69:

[0314] ATGAAGAACCATTTGCTTTTCTGGGGAGTCCCTGGCGGTTTTTATTAAGGCTGTTTCATGTGAAAGCCCAA  
GAAGATGAAAGGATTGTTCTTGTGACAACAAAATGTAAGTGTGCCGGATTACTTCCAGGATCATCCGTTCTTCCGA  
AGATCCTAATGAGGACATTGTGGAGAGAAACATCCGAATTATTGTTCCCTCTGAACAACAGGGAGAATATCTCTGATC  
CCACCTCACCATTGAGAACCAGATTTGTGTACCAATTTGTCTGACCTCTGTAAAAAATGTGATCCTACAGAAGTGGAG  
CTGGATAATCAGATAGTTACTGCTACCCAGAGCAATATCTGTGATGAAGACAGTGCTACAGAGACCTGCTACACTTA  
TGACAGAAACAAGTGCTACACAGCTGTGGTCCCACTCGTATATGGTGGTGAGACCAAATGGTGGAAACAGCCTTAA  
CCCCAGATGCCTGCTATCCTGACGGAGGAGGAGGATCCGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGAGGTGGATCCCAGGTGCAG  
CTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTT  
CATCTCCTACACCATGCACTGGGTGAGGCAAGCTCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGATACATCAACCCTCGGT  
CCGGCTATACCCACTACAATCAGAAGCTGAAGGACAAGGCCACCCTGACCGCTGACAAGTCCGCCTCCACCGCTTAC  
ATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGGTCCGCCTACTACGACTACGACGG  
ATTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGAGCTCCGGAGGAGGAGGCAGCGGTGGTGGCGGAAGCGGTG  
GAGGTGGCAGCGATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC  
TGCAGCGCTTCTCCTCCGTGTCTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGAGGCTGATCTA  
CGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCTTCCAGGTTCCAGCGCTCCGGCTCCGGAACCGACTTACCCTGACCA  
TTAGCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAACCCTCCCACCTTCGGAGGC  
GGCACAAAGCTGGAGATCAAGTGA

[0315] 该成熟结构体各自具有大约45kD的分子,并且可以结合CD3的可溶性 $\epsilon$ 链(义翘神州生物技术公司(Sino Biological)),或T细胞(数据未显示)。

[0316] 对应各种抗-HBsAg重链和轻链的DNA构建体以及对应野生型(wt)J链、V15J或J15V J链序列的DNA构建体共同转染至HEK293细胞中,表达蛋白质并根据标准方法进行纯化。参见例如,PCT公开号W0 2015/153912,其通过引用全文纳入本文。经HBV19、HBV23、和HBV24抗体的IgG或IgM+J型转染的HEK293细胞生成足以允许通过标准方法进行纯化的蛋白质。

[0317] 琼脂糖-丙烯酰胺混合凝胶。IgM构建体通过从之前所述方法(Chugai Seiyaki Kabushiki Kaisha,2010,美国专利公开号2010/0172899A1)中获得的非还原SDS-PAGE进行分离。简言之,混合凝胶与40%的丙烯酰胺/二-丙烯酰胺(37.5:1)(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和超纯琼脂糖(英杰公司(Invitrogen))混合成在pH 8.8的0.375M Tris缓冲液和15%的甘油中终浓度分别为3.6%和0.5%。加热所得混合物至50℃,通过添加0.08%的TEMED和0.08%的过硫酸铵聚合开始。将所得的溶液倒入两个平板之间,允许丙烯酰胺在37℃聚合1小时,然后置于室温30分钟以保证完整的聚合。将蛋白质样品加入所得的

混合凝胶之中,然后将凝胶在Tris-乙酸盐SDS运行缓冲液(诺维科公司(Novex))中运行800Vh。然后将凝胶固定在40%甲醇、10%乙酸中10分钟,使用胶态蓝染色试剂盒(Colloidal Blue Staining Kit)(诺维科公司(Novex))进行至少3小时的染色,随后在水中脱色。

[0318] 非还原SDS-天然-PAGE。将蛋白质样品上样至NativePAGE 3-12%Bis-Tris凝胶(诺维科公司(Novex))。添加Tris-乙酸盐SDS运行缓冲液(诺维科公司(Novex)),然后凝胶在40V运行15分钟,然后在90V运行2小时。然后将凝胶固定在40%甲醇、10%乙酸中10分钟,使用胶态蓝染色试剂盒(Colloidal Blue Staining Kit)(诺维科公司(Novex))进行至少3小时的染色,随后在水中脱色。

[0319] 通过非还原SDS天然-PAGE测量的HBV24的表达和组装如图2A所示。HBV23的表达和组装如图2B所示。HBV19的表达和组装如图2C所示。各1gG的重链和轻链表达良好并且被组装近1gG抗体之中(HBV24,未显示;HBV23,图2B,泳道2;HBV19,图2C,泳道2)。

[0320] HBV24的重链和轻链表达良好,但是当与人J链共同表达只是,并未适当地组装入1gM五聚体(图2A,“Hu/Hu”)。另一方面,含有SEQ ID NO:59的轻链,当与具有鼠1gM重链恒定区的嵌合HBV24组合时,并未适当的组装(图2A,“Ch/Hu”)。

[0321] 通过某些氨基酸的定点诱变来制备构建了与SEQ ID NO:5相关联的1gM重链可变区,获得了含有氨基酸序列SEQ ID NO:62的重链可变区。根据如上所述方法将SEQ ID 62克隆至适合的载体之中,从而编码含有氨基酸序列SEQ ID NO:63的1gM重链。将该载体与包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:59的 $\kappa$ 轻链的载体和编码人J链(SEQ ID NO:68)的载体或编码经修饰的J链V15J(SEQ ID NO:54)的载体共同转染至HEK293细胞之中,并且允许表达,生成1gM分子HBV24M2J和HBV24M2V15J。两个表达产物均适当地组装入五聚化1gM分子。双特异性结合分子HBV24M2V15J如图2A(“M2/Hu”)所示。

[0322] 实施例4:结合试验

[0323] 通过ELISA试验评估HBV24M2V15J和HBV23MJ与全长HBsAg-L(前S1,前S2,和S)的结合。对于HBV24M2V15J,其结合与对美国专利号8,420,353中提供的前S1区具有特异性的人源化1gG抗体进行比较,同时,对HBV23MJ的结合,其与Cerino等(2015)PLOS one 10(4):e0125704.doi:10.1371中提供的人1gG抗体进行比较。

[0324] 该试验通过如下方法进行。对于HBV24,96孔MaxiSorp ELISA聚苯乙烯平板(Nunc)用1 $\mu$ g/mL HBsAg-L抗原(Beacle,BCL-AG-001)被覆,在100 $\mu$ L包被缓冲液(100mM碳酸氢盐,pH 9.5)中4 $^{\circ}$ C过夜。对于HBV23,平板用HBsAg(Prospect HBS-872)被覆。然后用0.05%PBS-Tween洗涤平板,并用2%BSA-PBS封闭平板。封闭后,将100 $\mu$ L的系列稀释样品(纯化的蛋白质或细胞培养物上清液)加入孔内,并在室温下孵育1小时。然后将平板洗涤,并与鼠抗-人 $\kappa$ 抗体偶联的HRP(Southern Biotech,9230-05。在2%BSA-PBS中1:6000稀释)孵育1小时以获得HBV24抗体,以及与鼠抗-人 $\lambda$ 偶联的HRP孵育1小时以获得HBV23抗体。再用0.05%PBS-Tween的5次最终洗涤后,向各孔内加入100 $\mu$ L TMB基质(BD生物科学公司(BD Biosciences),555214)并在避光下孵育。然后通过向每孔中加入50 $\mu$ L的2N HCl停止反应。然后收集A450数据,并通过GraphPad Prism使用4参数逻辑模型分析。

[0325] 对于HBV24的结果如图3A所示,通过摩尔浓度比较1gM与1gG。HBV24M2V15J相较于1gG对应物(HBV24G)表现出更有效的结合,表现出26pM的EC50值相较于1gG上清液的57pM和

纯化的IgG的61pM。

[0326] 对于HBV23的结果如图3B所示,通过重量浓度比较IgM与IgG。HBV23MJ相较于IgG对应物(HBV23G)表现出表现出更有效的结合,表现出64ng/ml的EC50值相较于IgG的30ng/ml。通过最大A450测定的HBV23MJ结合的能力同样也比HBV23G更高。

[0327] 随后通过如下的方法对HBV24M2V15J、HBV24G、HBV23MJ、和HBV23G与PLC细胞的结合做进一步的评估,PLC细胞是在细胞表面表达HBsAg的肝细胞癌细胞系。

[0328] 亚历山大肝癌细胞(Alexander hepatoma cells) (PLC/PRF/5;ATCC CRL-8024) 与10%的HI FBS(吉布可公司(Gibco),目录号10082-147)在DMEM中培养,并且在染色钱的那天用新鲜的培养基补充细胞。在染色的当天,使用细胞解离缓冲液(吉布可公司(Gibco),目录号131510-14)移开细胞。吸出所有培养基之后,使用10mL的不含钙和镁的PBS漂洗细胞。吸出PBS之后,细胞与10ml的细胞解离缓冲液在37℃孵育20到30分钟。然后通过敲击以产生单细胞悬浮液来将细胞移开。通过加入等量的培养基中和细胞解离缓冲液,然后使用台盼蓝排除法在细胞计数器(伯乐公司(BioRad) TC20)上确定活细胞计数。将细胞的密度调整至FACS 2%FBS缓冲液(BD法敏进公司(BD Pharmingen),目录号554656)每60μL含 $1.5 \times 10^4$ 细胞,然后将60μL加入“V”底96孔板。所有的抗体都在30μg/mL、10μg/mL、3μg/mL、和1μg/mL的最终浓度下进行测试;并且将50μL的各抗体加入相应的孔内。随后将平板在4℃下孵育30分钟。用150μL的FACS 2%FBS缓冲液洗涤细胞之后,将平板以1200rpm离心5分钟(Orvall Legend X1R离心机)并小心地吸出将上清液,没有干扰细胞颗粒。通过将细胞与适当的AlexaFluor-647-标记的二抗、抗人κ轻链(白乐津公司(BioLegend),目录号316514)或AF647抗人λ轻链(白乐津公司(BioLegend),目录号316614)在4℃孵育30分钟来检测抗体结合。重复如上洗涤步骤,并且在60μL的1:100 7\_AAD的FACS 2%FBS(BD法敏进公司(BD Pharm),目录号51-68981E)中重悬。在FACSCalibur™(Becton Dickinson公司)上获得了各样品1000个事件,并且在FlowJo有限公司(FlowJo有限公司)的FlowJo上完成数据分析。对各研究,抗体结合与未染色的细胞和通过适当的人同种型对照抗体染色的细胞相比。

[0329] HBV24G和HBV23G的结合可能不被FACA试验所检测到。另一方面,HBV23MJ和双特异性HBV24M2V15J显示出可检测的结合(图4)。

[0330] 实施例5:筛选优先结合感染性病毒粒子和/或受HBV感染的细胞的抗体

[0331] 在本实施例中,针对以更高程度的例如亲和性、亲合力、或其他特点结合受感兴趣的病毒、或该病毒的感染型感染的细胞的结合分子进行文库筛选。建立结合分子文库,例如,抗体文库(噬菌体/杂种细胞/等),例如,衍生自受病毒感染的哺乳动物(例如,受HBV感染的哺乳动物)的B细胞的VH和VL区的文库。其后,文库与受病毒感染的细胞(例如,受HBV感染的细胞,例如,肝细胞癌(HCC)细胞系)或感染性病毒颗粒(例如,HBV颗粒)在固体支持物(例如,黏附的到96孔板或珠)上接触以富集那些结合受感染细胞的抗体(将包括所有此类抗体,无论它们是否也结合非感染性颗粒)。收获并扩增结合受感染细胞的抗体。接下来将回收的抗体与非感染性病毒颗粒接触,例如,HBV亚病毒颗粒,和/或至如之前所用受病毒感染的细胞相同类型的未受感染的细胞,其中非感染性颗粒和/或细胞连接至固体支持物,例如,平板、珠、柱等。回收并扩增未连接至非感染性病毒颗粒或未受感染的细胞的抗体。重复该步骤一次或多次以富集那些优先结合之收病毒感染的细胞或非感染性病毒颗粒的抗体。再次回收并扩增富集的/选择性耗尽的文库。最终,回收感兴趣的抗体,纯化克隆,并进一步

鉴定。

[0332] 实施例6:病毒中和试验

[0333] 可以使用各种标准技术,如Maeng等, *Virology* 270:9-16, 2000中所述,进行体外HBV病毒中和试验。简言之,将人肝细胞(通过非癌肝脏片段的酶消化制备)以 $10^6$ 细胞/孔的密度接种至含有2ml的正常生长培养基,并在3天后用HBV颗粒(大约 $3 \times 10^7$ 病毒基因组等价物)将其感染。

[0334] 对于中和试验,病毒颗粒与各种浓度的抗体(以及适当的对照)在室温下进行1小时的预孵育,然后接种至培养的肝细胞。用1ml的含有4%聚乙二醇(PEG)的无血清培养基覆盖肝细胞。受感染的细胞用生长培养基洗涤,然后孵育17天,每2天更换培养基。

[0335] 在感染后的第17天,移出培养基的等分并稀释10倍,并且使用合适的试验试剂盒,例如,对于HBsAg,放射免疫试验试剂盒(伊利诺伊州芝加哥雅培公司(Abbott Laboratories))确定HBV抗原(例如,HBsAg)的浓度。

[0336] 或者,HBV病毒中和研究可以如Kim(*FEBS Letters* 2015;589,193-200)所述进行。简言之,以 $6 \times 10^4$ 细胞/孔的密度(含有100 $\mu$ L的培养基)接种HepaRG细胞(例如, ThermoFisher HPRGC10),并培养6天。然后,病毒颗粒(5 $\mu$ L)与5 $\mu$ L各种浓度的抗体在室温下预孵育30分钟,然后与培养的HepaRG细胞在不存在或存在4%的PEG 8000时孵育24小时。受感染的细胞用培养基洗涤,然后孵育10天,每2天更换培养基。在感染后的第10天,稀释培养上清液以使其维持在试验的范围内,并且HBsAg浓度用ELISH试剂盒(伯乐公司(Bio-Rad))确定。

[0337] 实施例7:体内模型

[0338] 本文提供的二聚化、五聚化、或六聚化结合分子可以在小鼠模型体内测试,包括但不限于uPA/RAG-2小鼠(*Dandri Hepatology* 2001;33(4):981-988)、免疫缺陷尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)/重组活性基因-2(RAG-2)小鼠。为了测试结合分子的体内效力,可以在小鼠中重建人肝细胞并用HBV感染。Trimer小鼠模型(*Ilan Hepatology* 1999;29:553-562)涉及致命照射的小鼠,其经SCID小鼠骨髓细胞辐射保护。Fah<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>Il2rg<sup>-/-</sup>模型(*Grompe Nat Biotech* 2007;25(8):903-910;Verma *PNAS* 2007;104(51):20507-20511)涉及免疫缺陷的、丁烯乙酰乙酸水解酶缺乏的(fah<sup>-/-</sup>)小鼠,其具有重建具有人肝细胞肝脏的调节型系统源自TK-NOG的人源化小鼠模型(*Kosaka Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 8;441(1):230-5)涉及超级免疫缺陷NOG小鼠,其在肝限制的白蛋白启动子控制下转基因表达胸苷激酶。MUP-uPA/SCID/Bg模型(*Tesfave PLoS ONE* 2013;8(10):e77298)涉及携带由在SCID/Beige背景上的主要尿蛋白启动子驱动的uPA基因的小鼠。二聚化、五聚化、或六聚化结合分子可以在非人灵长动物体内进行测试。As/HSG-hu HSC/Hep小鼠模型(*Bility PLoS ONE* 2014;10(3):e1004032)涉及重建了人免疫和肝脏细胞的小鼠,并且支持持续性HBV感染。

[0339] 实施例8:HBV抗体的补体依赖性细胞毒性

[0340] IgM表型的抗体特别适于使用补体蛋白C1q的高效结合,从而影响靶细胞上补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。为了测量CDC,使用表达HBsAg(例如,亚历山大肝癌细胞(Alexander hepatoma cells)(PLC/PRF/5;ATCC CRL-8024))的肝细胞癌细胞或表达HBsAg-L的重组细胞。靶细胞经冲洗并以 $1.0 \times 10^6$ 细胞/mL的密度重悬于CDC试验培养基

(RPMI 1640, 10%热失活的FBS), 并且10 $\mu$ L/孔添加至Nunc 384孔组织培养处理的白色聚苯乙烯板。测试抗体的连续3倍稀释物在试验培养基中制备, 10 $\mu$ L/孔添加至试验板, 并将板于37 $^{\circ}$ C在5%CO<sub>2</sub>孵育箱中2小时以允许发生调理素作用。正常人血清补体(Quidel)在试验培养基中稀释至30%, 并将10 $\mu$ L/孔添加至试验板。板在37 $^{\circ}$ C于5%CO<sub>2</sub>孵育箱中孵育4小时。细胞效应-Glo试剂(Promega)用前解冻并将15 $\mu$ L/孔添加至试验板。在摇床上板温和混合2分钟以裂解细胞, 然后在室温另置10分钟随后于EnVision酶标仪(Perkin-Elmer)上检测发光。减去背景信号后, 活力百分比针对抗体浓度作图, 并采用GraphPad Prism确定EC50值。

[0341] 实施例9: HBVxCD3特异性抗体对T细胞的活化

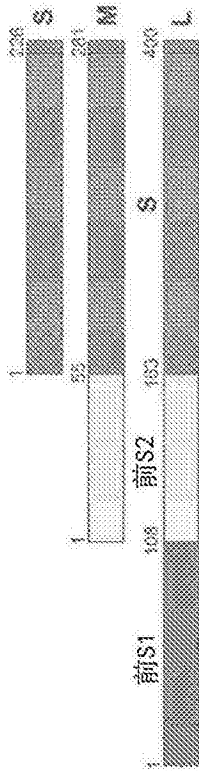
[0342] 为显示双特异性抗-HBsAg/抗CD3抗体是否能够在结合HBsAg靶标后活化T细胞, 进行如下试验。工程改造的Jurkat T细胞(普洛麦格公司(Promega) CS176403)以及表达HBsAg(例如, 亚历山大肝癌细胞(Alexander hepatoma cells) (PLC/PRF/5; ATCC CRL-8024))的肝细胞癌细胞或表达HBsAg-L的重组细胞在补充了10%胎牛血清(英杰公司(Invitrogen))的RPMI(英杰公司(Invitrogen))中培养。纯化的双特异性和单特异性抗-HBV抗体的连续稀释物与表达HBsAg的细胞以20 $\mu$ L在白色384孔试验板中用5%CO<sub>2</sub>在37 $^{\circ}$ C孵育2小时。经工程改造的Jurkat细胞(25000)添加至混合物至40 $\mu$ L的终体积。该混合物用5%CO<sub>2</sub>在37 $^{\circ}$ C孵育5小时。然后, 细胞混合物与包含荧光素(Promega, Cell Titer Glo)的20 $\mu$ L裂解缓冲液混合以检测荧光素酶报告物活性。光输出通过EnVision酶标仪检测。EC50值采用Prism软件通过4参数曲线拟合来确定。

[0343] 实施例10: T细胞引导的B细胞杀伤-LDH释放试验

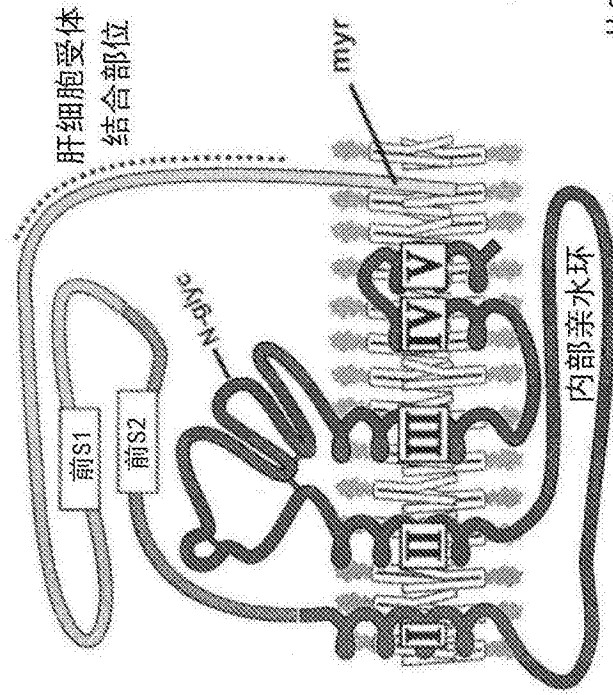
[0344] 为了显示双特异性HBV x CD3 IgM结合分子是否能够在CD8+T细胞急性淋巴母细胞白血病(TALL)细胞的存在下杀伤靶标细胞, 进行了共培养实验。在存在不同浓度的测试化合物之下, 表达HBsAg的细胞(大约6x 10<sup>3</sup>个细胞), 例如, 肝细胞癌细胞例如亚历山大肝癌细胞(PLC/PRF/5; ATCC CRL-8024)或表达HBsAg-L的重组细胞与3x 10<sup>4</sup>个TALL细胞(ATCC CRL-11386)在每孔45 $\mu$ L总体积的补充有10%热失活的FBS的RPMI 1640培养基中于384孔黑色组织培养物板上共培养。在5%CO<sub>2</sub>孵育箱中37 $^{\circ}$ C孵育24小时之后, 15 $\mu$ L的CytoTox-ONE底物试剂(Promega, G7891)添加至各孔以检测从死细胞释放的LDH的水平。板经短暂振荡以混合试剂, 然后室温孵育90分钟, 随后在EnVision酶标仪(Perkin-Elmer)上检测荧光信号(激发光485nm, 发射光615nm)。然后, 数据用GraphPad Prism分析以确定EC<sub>50</sub>。

[0345] \*\*\*

[0346] 本公开的宽度和范围不应受限于任何上述示例性的实施方式, 而应仅根据下列权利要求书及其等同项来定义。



A



B

从Chi 2007 & Glebe 2005获得

图1

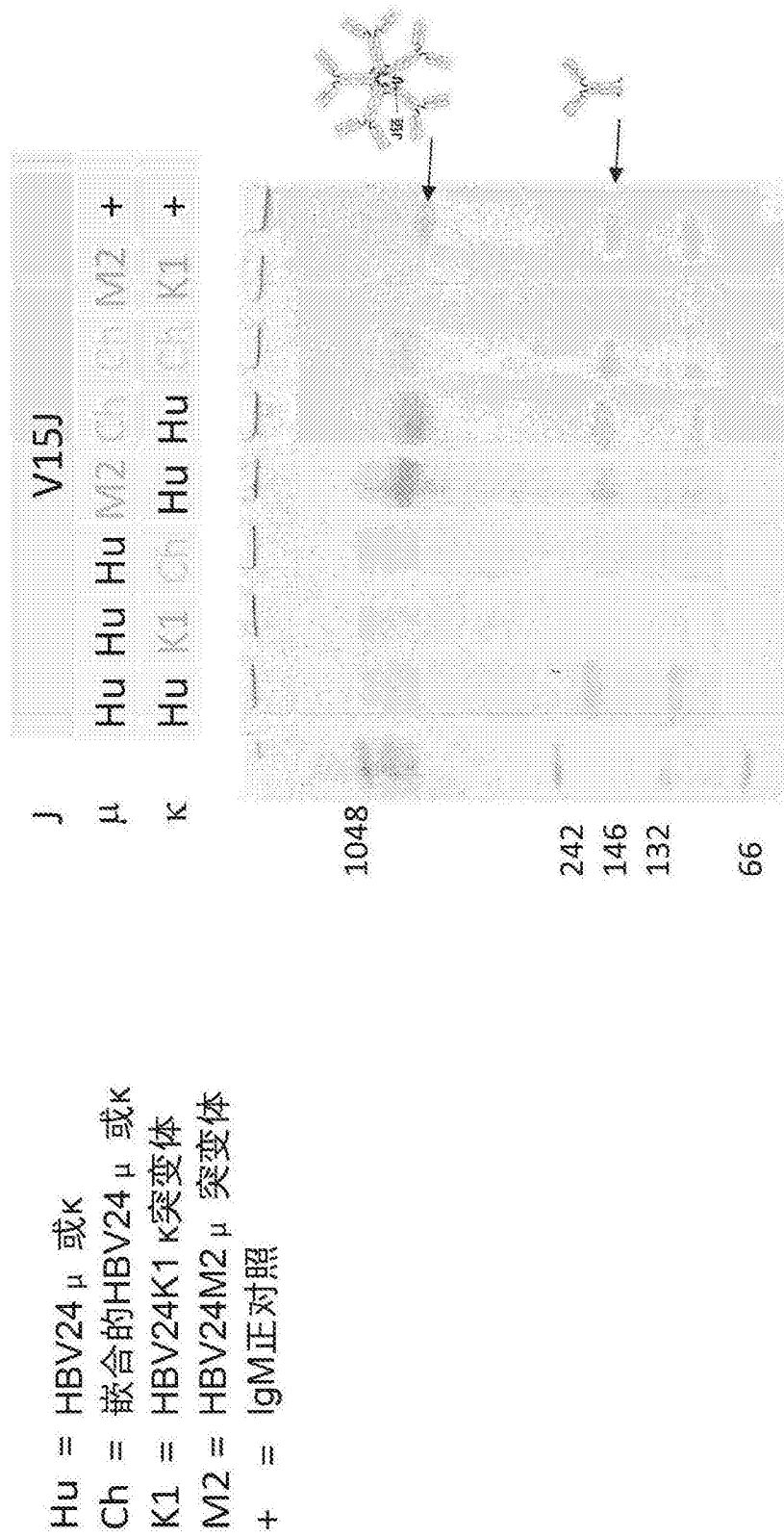


图2A

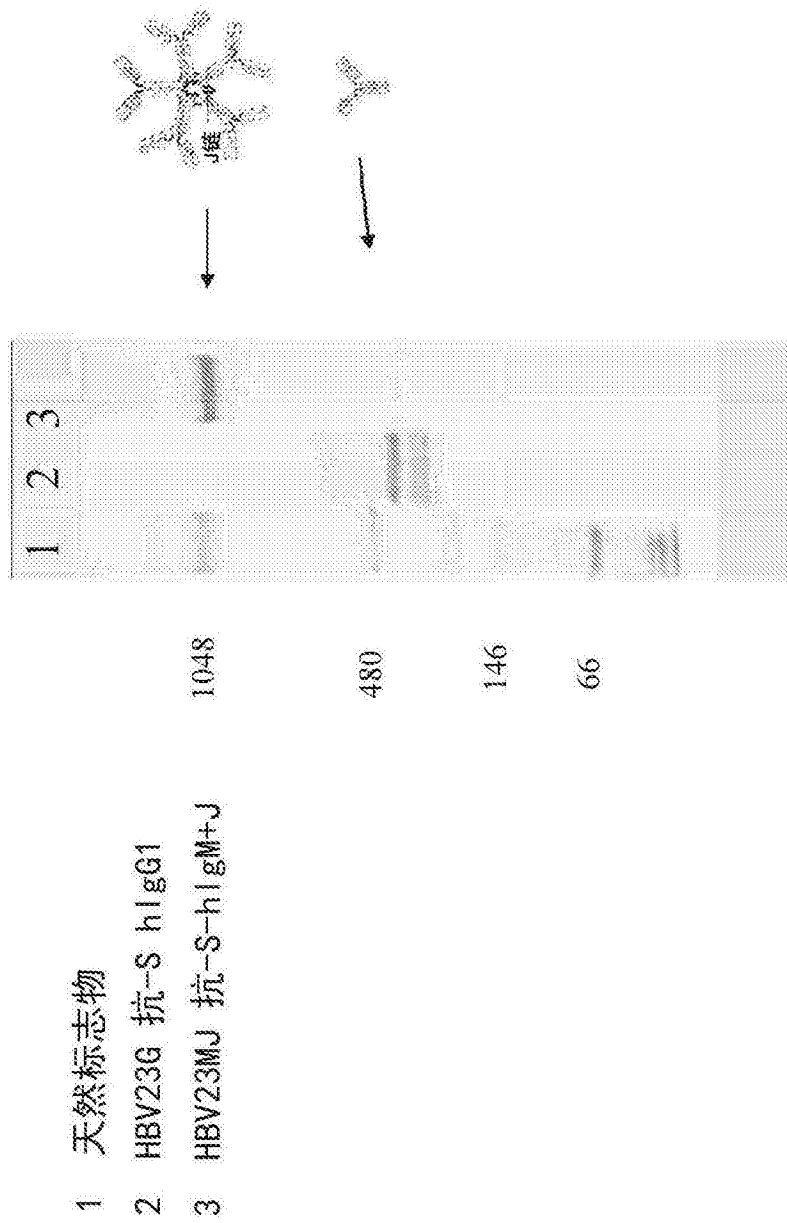


图2B

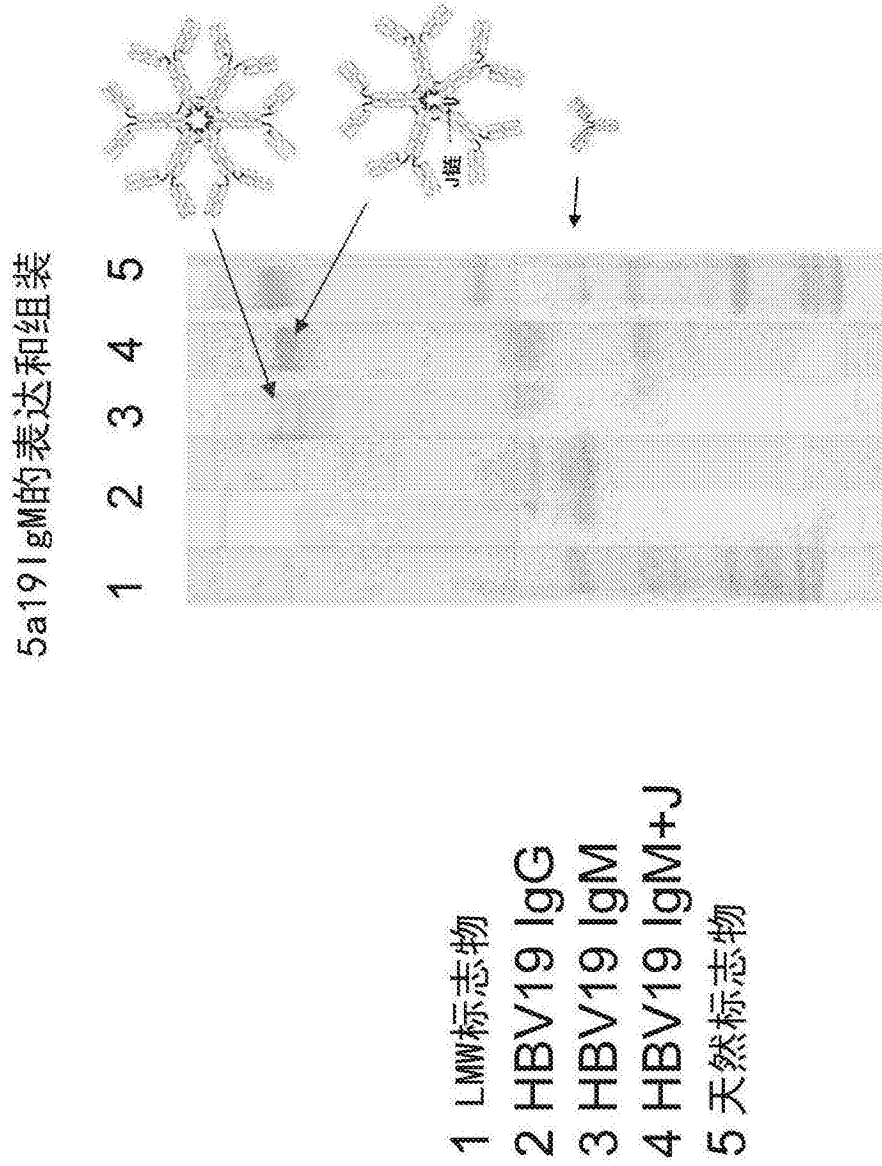


图2C

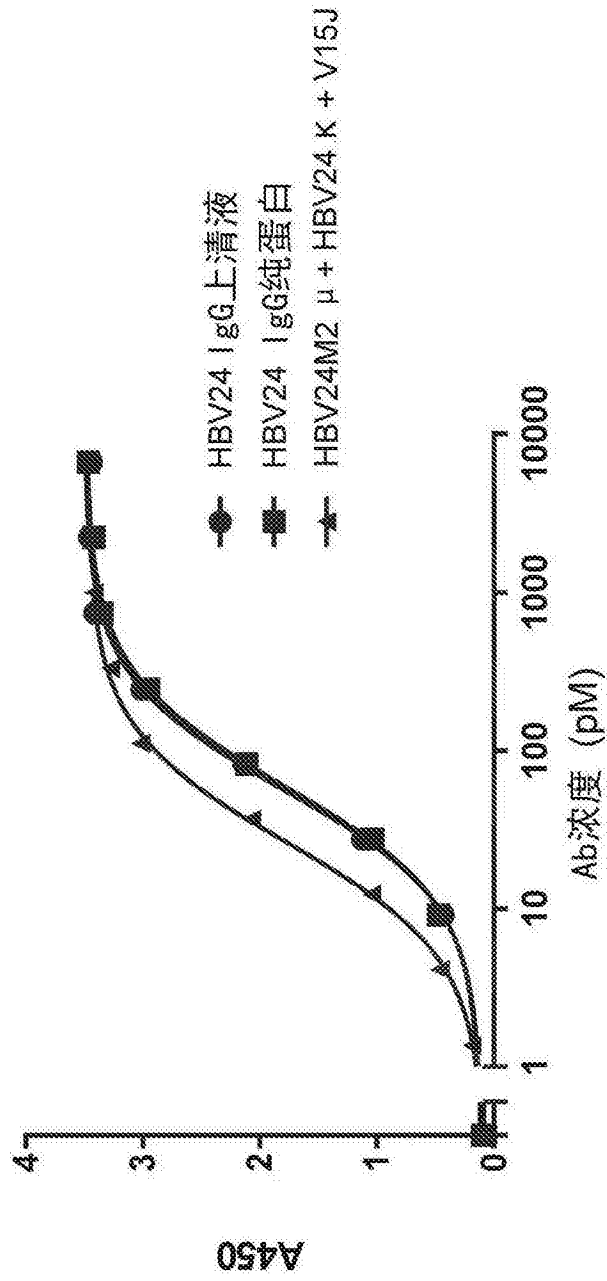


图3A

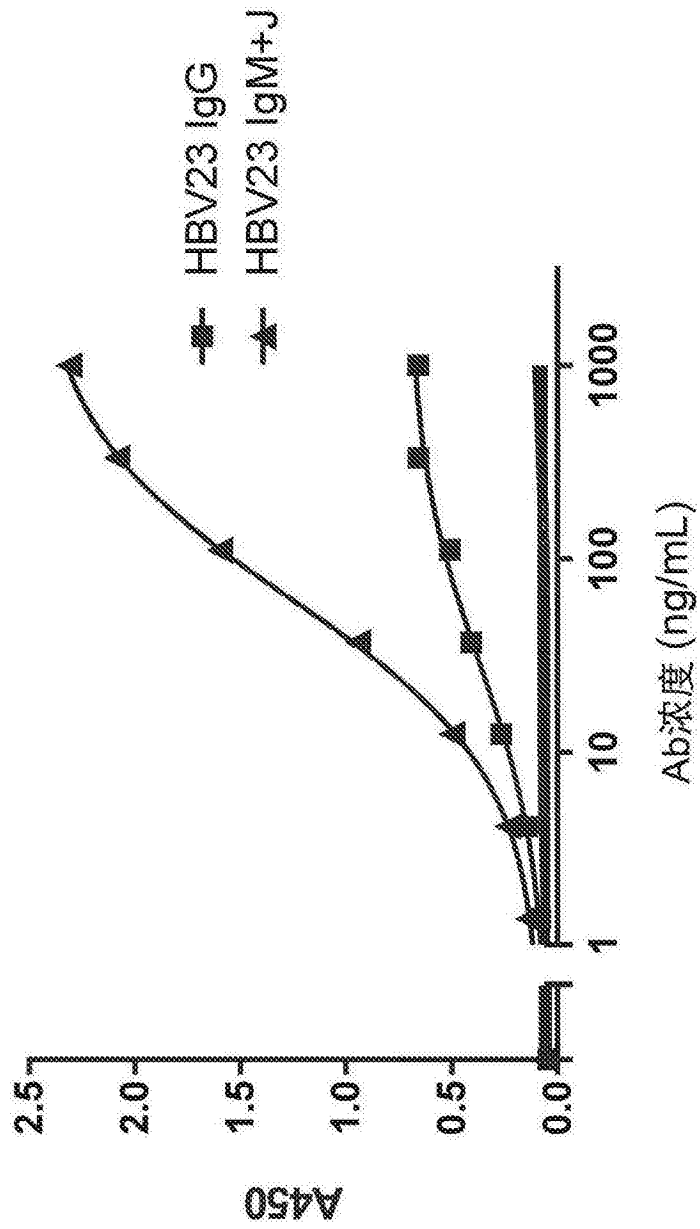


图3B

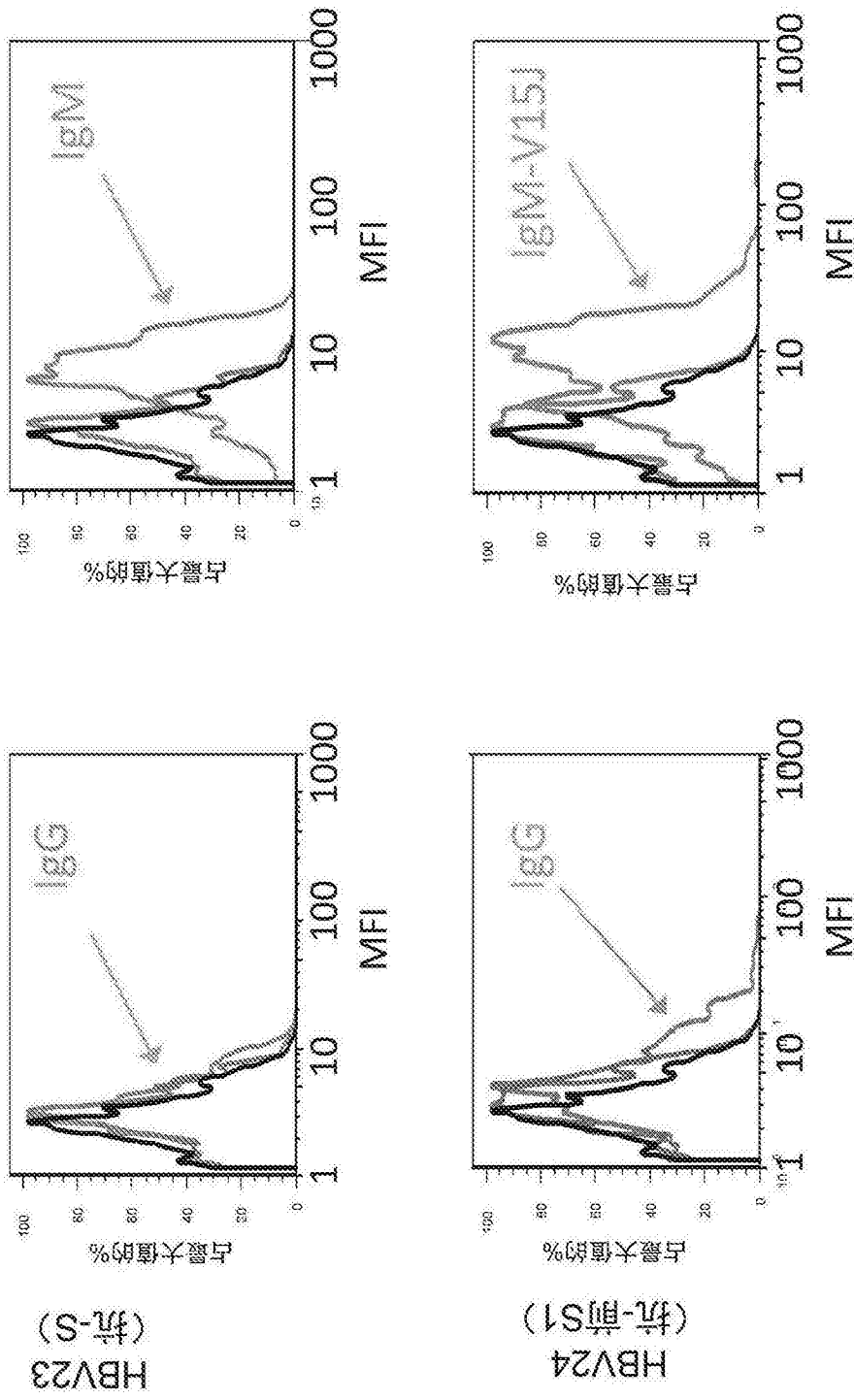


图4

专利名称(译)	多价乙型肝炎病毒抗原结合分子及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107921285A</a>	公开(公告)日	2018-04-17
申请号	CN201680029323.0	申请日	2016-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	IGM BIOSCI		
[标]发明人	SF卡罗尔 R 巴利加 D吴 BA基特		
发明人	S·F·卡罗尔 R·巴利加 D·吴 B·A·基特		
IPC分类号	A61P31/20 A61K39/29 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/082 A61K39/395 A61K39/39541 A61K39/40 A61K2039/505 A61P1/16 A61P31/20 C07K16/2809 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/35 C07K2317/56 C07K2317/60 C07K2317/622 C07K2317/734 C07K2317/76 G01N33/502 G01N33/56983 G01N2333/02 G01N2500/04 G01N2500/10		
代理人(译)	余颖		
优先权	62/137881 2015-03-25 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本文公开了一种多聚化乙型肝炎病毒(HBV)蛋白结合分子，例如二价IgA或五聚化或六聚化IgM结合分子，其包括至少两个二价结合单元，或其变体或片段，各包括至少两个抗体重链恒定区或其片段，其中各重链恒定区或其片段与HBV抗原结合结构域相关联。本文还公开了包括多聚化结合分子的组合物，编码多聚化结合分子的多核苷酸，以及制造和使用多聚化结合分子的方法。

MGGWSSKPRKGMGTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSN  
NPDWDFNPIKDHWPAAANQVGVGAFGPGGLTPPHGGILGWS  
PQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQAM  
OWNSTAFHQALQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASH  
ISSISARTGDPVTNMENTISGFLGPLLVLQAGFELLTRILTIP  
QSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPICP  
GYRWMCLRRFIFLFIILLCLIFLLVLDYQGMPLVCPCLIPG  
STTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIS  
SWAFKYLWEWASVRFWSLLVPFVQWFVGLSPTVWL