(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 035846 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.20

(21) Номер заявки
201591974

(22) Дата подачи заявки
2014.04.14

(51) Int. Cl. ***C07K 16/10*** (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/115 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С G-БЕЛКОМ RSV

(31) **61/812,118; 13179242.6**
(32) **2013.04.15; 2013.08.05**
(33) **US; EP**
(43) **2016.04.29**
(86) **PCT/EP2014/057501**
(87) **WO 2014/170258 2014.10.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Вадиа Джехангир (US), Уилльямсон Роберт Энтони, Лангедейк Йоханнес Петрус Мария (NL), Паскуал Габриель (US), Ван 'Т Воут Анжелик (NL)

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

(56) WO-A2-2009055711

YOUNGJOO CHOI ET AL.: "Antibodies to the Central Conserved Region of Respiratory Syncytial Virus (RSV) G Protein Block RSV G Protein CX3C-CX3CR1 Binding and Cross-Neutralize RSV A and B Strains", VIRAL IMMUNOLOGY, 2 May 2012 (2012-05-02), XP055102546, ISSN: 0882-8245, DOI: 10.1089/vim.2011.0094, the whole document

LARRY J ANDERSON ET AL.: "NEUTRALIZATION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BY INDIVIDUAL AND MIXTURES OF F AND G PROTEIN MONOCLONAL ANTIBODIES", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 62, no. 11, 1 November 1988 (1988-11-01), pages 4232-4238, XP002661211, ISSN: 0022-538X, the whole document

WAYNE SULLENDER: "Antigenic Analysis of Chimeric and Truncated G Proteins of Respiratory Syncytial Virus", VIROLOGY, vol. 209, no. 1, 1 May 1995 (1995-05-01), pages 70-79, XP055102753, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1006/viro.1995.1231, the whole document

POWER U. F. ET AL.: "Identification and characterisation of multiple linear B cell protectopes in the respiratory syncytial virus G protein", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 19, no. 17-19, 21 March 2001 (2001-03-21), pages 2345-2351, XP027349942, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2001-03-21], the whole document

E. E. WALSH ET AL.: "Comparison of Antigenic Sites of Subtype-specific Respiratory Syncytial Virus Attachment Proteins", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 70, no. 11, 1 November 1989 (1989-11-01), pages 2953-2961, XP055103541, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/0022-1317-70-11-2953, the whole document

(57) Изобретение предлагает выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с G-белком RSV и которые способны нейтрализовать RSV, и их применение в профилактике или лечении инфекции RSV или их комбинации.

035846 B1

035846 B1

Область настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к медицине. Настоящее изобретение, в частности, относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с гликопротеином связывания (G-белок) респираторного синцитиального вируса человека (RSV) и которые нейтрализуют RSV.

Предпосылки изобретения

Респираторный синцитиальный вирус человека (RSV) - это вирус, содержащий одноцепочечную РНК с отрицательной полярностью, из семейства Paramyxoviridae, которое также включает типичные респираторные вирусы, такие как вызывающие корь и эпидемический паротит. Существует два основных подтипа RSV: подтип A и подтип B. RSV реплицируется в верхних дыхательных путях и затем распространяется в нижние дыхательные пути, вызывая бронхиолит или пневмонию. Вирус вызывает воспаление, отек дыхательных путей, увеличивает выработку слизи и разрушает респираторный эпителий.

По предварительным подсчетам установлено 64 млн случаев респираторных заболеваний и 160000 смертельных исходов во всем мире, обусловленные RSV-индуцированным заболеванием. Тяжелая инфекция RSV чаще всего проявляется у детей и младенцев, особенно у недоношенных детей. Основные проблемы со здоровьем, такие как хронические заболевания легких или врожденные пороки сердца могут существенно увеличить риск серьезной болезни. Инфекции RSV также вызывают серьезную болезнь у пожилых людей, индивидуумов с хроническими заболеваниями легких и у взрослых с ослабленным иммунитетом, таких как реципиенты, которым пересадили костный мозг.

Были исследованы несколько подходов предупреждения и лечения инфекции RSV. Иммуноглобулин для внутривенного введения (RSV-IGIV; RespiGam®), выделенный у доноров, и моноклональное антитело паливизумаб (SYNAGIS®) были одобрены для применения с целью профилактики RSV у недоношенных детей с высоким риском заболеваемости. Однако вакцина или коммерчески доступное средство для лечения RSV до настоящего времени не доступны. Только рибавирин одобрен для лечения инфекции RSV. Для того чтобы лечение инфекции RSV было эффективным, требуются высокие дозы, повторные введения и/или большие объемы продуктов на основе антител, таких как паливизумаб, из-за их низкой эффективности.

RSV имеет два основных поверхностных гликопротеина, F и G. F-белок опосредует слияние, обеспечивая проникновение вируса в цитоплазму клетки, и способствует образованию синцития in vitro. Последовательность F-белка является высококонсервативной (~90%) среди штаммов RSV (Johnson and Collins, J Gen Virol. (1988) 69: 2623-2628). Единственное представленное на рынке моноклональное антитело паливизумаб направлено против F-белка RSV.

G-белок RSV является поверхностным белком, который в значительной степени гликозилирован и функционирует в качестве белка связывания. В отличие от F-белка G-белок является высоковариабельным среди штаммов, за исключением центрального консервативного домена (CCD), содержащего аминокислотные остатки 153-184 из G-белка в штамме A2 RSV или соответствующие аминокислотные остатки в других штаммах. Как центральный консервативный домен, так и смежные участки (остатки 145-193) являются ограниченными жесткими и тяжелыми O-гликозилированными муциноподобными участками. N-концевая половина центрального консервативного домена содержит небольшой участок, который является консервативным среди более 700 штаммов. C-концевая половина содержит 4 консервативных цистеина, связанные в топологию 1-4, 2-3, и уложена в цистеиновую петлю.

Хотя пассивная иммунизация с использованием антител, направленных на G-белок, обычно считалась непрактичной из-за отсутствия консервативности последовательностей среди штаммов, известны нейтрализующие моноклональные антитела, которые связываются с G-белком RSV. Anderson, L. J. et al. (J. Virol. (1988) 62:4232-4238) описал нейтрализующую способность смеси из мышиных моноклональных антител к F и G, одно из которых имело отношение к связыванию G-белка (т.е., 131-2G). Антигенный сайт этого антитела был позже определен Sullender (Virol. (1995) 209:70-79). Было обнаружено, что это антитело связывает вирусы как группы A, так и группы B RSV, относящиеся к основным штаммам RSV. Кроме того, в WO 2009/055711 раскрыты антитела, такие как 3D3 и 3G12, которые являются иммунореактивными с консервативным мотивом в положениях 160-176 в G-белке RSV A2 и имеют нейтрализующую активность по отношению к A и B подтипам RSV. Было показано, что эти антитела распознают линейные эпитопы в центральном консервативном домене, но их не тестировали на предпочтительных животных моделях (т.е., хлопковых хомяках) для оценки антител к RSV и вакцин против RSV.

Принимая во внимание степень тяжести респираторных заболеваний, вызываемых RSV, в частности, у маленьких детей и пожилых людей, существует постоянная потребность в эффективных средствах для профилактики и лечения инфекции RSV.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предлагает выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с G-белком RSV и способны нейтрализовывать RSV. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно способны специфически связываться и нейтрализовать RSV обоих подтипов A и B. Предпочтительно, антитела являются антителами человека. Антитела связы-

ваются с эпитопами в центральном консервативном негликозилированном участке (также называемом центральным консервативным доменом, CCD) G-белка RSV.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты обладают высокой аффинностью к G-белку и обладают потенциальной нейтрализующей способностью. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются применимыми в качестве диагностических, профилактических и/или терапевтических средств, оба по отдельности и в комбинации с другими диагностическими, профилактическими и/или терапевтическими средствами.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает композиции, которые содержат одно или несколько антител по настоящему изобретению и/или их антигенсвязывающие фрагменты. Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

Антитела по настоящему изобретению отличаются тем, что эти антитела являются более эффективными против RSV типа A и B, чем любые известные антитела к G RSV, в частности, чем известные ранее моноклональные антитела 3D3 к G RSV, в in vitro анализе нейтрализации.

Антитела по настоящему изобретению связываются с уникальными эпитопами на G-белке RSV.

В определенных вариантах осуществления антитела содержат тяжелую цепь с CDR3, содержащим мотив CXXXXC в его аминокислотной последовательности.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты отличаются тем, что они действуют аддитивно и/или синергически с антителами к F RSV.

Описание фигур

На фиг. 1 показаны профили связывания для белков Ga RSV и Gb RSV. Проводили тестирование IgG анализах ELISA в отношении их способности связывать рекомбинантные Ga- и Gb-белки RSV. Пустые круги (пунктирная линия) обозначают связывание с Ga (RSV A/Long), а заретушированные круги (сплошная линия) обозначают связывание с Gb (RSV B/B1).

На фиг. 2 приведены профили нейтрализации в отношении штаммов RSV-A и RSV-B. Проводили тестирование IgG в реакции нейтрализации в отношении их способности нейтрализовать штаммы RSV-A и RSV-B. Пустые круги (пунктирная линия) обозначают нейтрализацию RSV-A (RSV A/A2), а заретушированные круги (сплошная линия) обозначают нейтрализацию RSV-B (RSV B/18537).

На фиг. 3 показано антител, специфичных к G-белку RSV, с пептидами из G RSV (ELISA). Короткий и длинный пептиды из G RSV охватывают центральный консервативный домен (табл. 15), используемый в экспериментах связывания в ELISA с варьирующими концентрациями mAb (моноклональных антител), специфичных к G RSV: CB017.5 (заретушированные темно-серые круги), CB030.1 (пустые круги) или без mAb (заретушированные светло-серые круги).

Фиг. 4: картирование минимального эпитопа в PepScan. Активность связывания антител, специфичных к G-белку RSV, с полностью перекрывающимися 5-мерными, 8-мерными, 10-мерными, 14-мерными, 18-мерными, 25-мерными и 32-мерными пептидами из центрального участка (остатки 145-201 в у RSV-G типа A и типа B). Активность связывания с пептидом приведена в виде вертикальной линии пропорционально сигналу PepScan ELISA.

Фиг. 5: Аланиновое сканирование центрального участка G-белка RSV (PepScan). Замены на аланин во всех положениях в пептидах, соответствующие остаткам 161-192 центрального домена RSV-G типа A (левый график) и типа B (правый график). Аланин в положении 180 типа A был заменен глицином. Реактивность исходных пептидов приведена в сером столбце.

На фиг. 6 показано связывание моноклональных антител с встречающимися в природе вариантами центрального участка G-белка RSV. Связывание mAb CB017.5 и CB030.1 с разными пептидами соответствует доступным вариантам типа A (верхняя панель) и типа B (нижняя панель). Активность пептидов дикого типа показана в виде серого столбца.

На фиг. 7 показана профилактическая эффективность mAb к G RSV в модели хлопкового хомяка, которую инфицировали штаммом RSV-A/Long, по вирусной нагрузке в легких и носовых раковинах на 4 день после заражения.

На фиг. 8 показана терапевтическая эффективность mAb к G RSV в модели хлопкового хомяка, которую инфицировали штаммом RSV-A/Long, по вирусной нагрузке в легких и носовых раковинах на 4 день после заражения.

На фиг. 9 показана терапевтическая эффективность mAb к G RSV в модели хлопкового хомяка, которую инфицировали штаммом RSV-A/Long, по гистопатологической оценке в 6 день после заражения.

Описание настоящего изобретения

Определения

Ниже представлены определения выражений, используемых в настоящем изобретении.

Предусматривается, что после используемых в данном документе терминов "включенный" или "включающий" следуют слова "без ограничения".

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела, такие как химерные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела. Термин "антитело" включает все известные в данной области классы и подклассы им-

муноглобулинов. В зависимости от аминокислотной последовательности в константном домене тяжелой цепи антитела можно разделить на пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделить на подклассы (изотипы), например, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Термин антитело также относится к антигенсвязывающим и/или вариабельным доменам, содержащим фрагменты иммуноглобулинов, которые конкурируют с интактным иммуноглобулином за специфичное связывание с партнером иммуноглобулинов, т.е. G-белком RSV. Независимо от структуры, антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же антигеном, который распознается интактным иммуноглобулином, антигенсвязывающие фрагменты включают, в частности, Fab, F(ab'), $F(ab')_2$, Fv, dAb, Fd, фрагменты участка, определяющего комплементарность (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), двухвалентные одноцепочечные антитела, (одно)доменные антитела, диатело, триотело, тетрателo, (поли)пептиды, которые содержат по меньшей мере фрагмент иммуноглобулина, что является достаточным чтобы предать специфичности антигену, который связывается с (поли)пептидом и т.д. антигенсвязывающие фрагменты могут содержать пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность как минимум из 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 или 250 повторяющихся аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности антитела, антигенсвязывающие фрагменты можно получить синтетически или ферментативным или химическим расщеплением интактных иммуноглобулинов, или они могут быть генетически сконструированы путем использования методик рекомбинантной ДНК. Способы получения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, для антител: A Laboratory Manual, Edited by: E. Harlow и D, Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, которое включено в настоящий документ для ссылки. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь один или несколько сайтов связывания. При наличии более одного сайта связывания сайты связывания могут быть идентичны друг другу или они могут отличаться.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к молекулам антитела одной специфичности. Моноклональное антитело характеризуется одной специфичностью и аффинностью связывания в отношении конкретного эпитопа. Соответственно, термин "моноклональное антитело человека" относится к антителу, характеризующемуся одной специфичностью связывания, которое имеет вариабельные и константные участки, полученные от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека или основанные на них или полученные от полностью искусственных последовательностей. Способ получения моноклонального антитела не относится к вопросу специфичности связывания.

Используемый в настоящем документе термин "функциональный вариант" относится к антителу, которое содержит нуклеотидную и/или аминокислотную последовательность, которая изменена на один или несколько нуклеотидов и/или аминокислот в сравнении с нуклеотидными и/или аминокислотными последовательностями исходного антитела, и которое способно конкурировать за специфическое связывание с партнером по связыванию, т.е. RSV, с исходным антителом. Другими словами, модификация аминокислотной и/или нуклеотидной последовательности исходного антитела существенно не влияет или не изменяет характеристики связывания антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью, или содержащего аминокислотную последовательность; т.е. антитело все еще способно специфично распознавать и связывать свою мишень. Функциональный вариант может иметь модификации в консервативной последовательности, в том числе нуклеотидные и аминокислотные замены, присоединения и делеции. Эти модификации можно вводить с помощью стандартных методик, известных в данной области, таких как сайт-направленный мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез, и они могут включать естественные, а также неестественные нуклеотиды и аминокислоты.

Используемый в настоящем документе термин "нейтрализующий" применительно к антителам по настоящему изобретению относится к антителам, которые способны предупреждать или ингибировать инфицирование вирусом клетки посредством их нейтрализующего или ингибирующего биологического эффекта и/или снижения инфекционного титра RSV, вне зависимости от механизма посредством которого достигается нейтрализация. Нейтрализация также может достигаться ингибированием контакта или адгезии вируса с поверхностью клетки, или ингибированием слияния вирусной и клеточной мембран после контакта вируса с клеткой-мишенью и им подобными.

Используемый в настоящем документе термин "специфичное связывание" относится к взаимодействию антитела с его партнером по связыванию, например, антиген обозначает что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры, например, антигенной детерминанты или эпитопа на партнере по связыванию. Другими словами, антитело предпочтительно связывается или распознает партнера по связыванию даже если партнер по связыванию присутствует в смеси из других молекул или организмов. Связывание может быть опосредовано ковалентными или нековалентными взаимодействиями или комбинацией и тех, и других. Другими словами, термин "специфичное связывание" означает, что антитело является специфично иммунореактивным по отношению к антигенной детерминанте или эпитопу, и не является иммунореактивным с другими антигенными детерминантами и эпитопами. Антитело, которое (иммуно)специфично связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами с низкой аффинностью, как определенно, например, для радиоиммунного анализа (RIA), иммуно-

ферментного анализа (ELISA), BIACORE и других анализов, известных из уровня техники. Антитела или их фрагменты, которые специфично связываются с антигеном, могут характеризоваться перекрестной реактивностью с родственными антигенами, несущими тот же эпитоп. Предпочтительно, антитела или их фрагменты, которые специфично связываются с антигеном, не проявляют перекрестную реактивность с другими антигенами.

Подробное описание настоящего изобретения

Согласно первому аспекту настоящее изобретение предлагает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, способные к специфичному связыванию G-белка респираторного синцитиального вируса человека (RSV), и которые способны нейтрализовать RSV. Антитела предпочтительно способны специфично связывать и нейтрализовать RSV обоих подтипов A и B. Предпочтительно антитела являются моноклональными антителами человека.

Было показано, что антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются более активными против RSV типа A и B, чем любые другие из известных антител к G RSV, в частности, более активные чем известные моноклональные антитела 3D3 к G RSV, в in vitro анализе нейтрализации, в частности в in vitro анализе, описанном в примере 7.

В соответствии с настоящим изобретением, антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопами в центральном консервативном домене (CCD) G-белка RSV. Центральный консервативный домен охватывает аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты 153-184 G-белка у штамма A2 RSV (или соответствующие аминокислотные остатки у других штаммов).

В соответствии с настоящим изобретением предлагаются антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот с аминокислотным участком, содержащим аминокислоты 160-169 и одну или несколько аминокислот в участке, содержащем аминокислоты 184-192 в G-белке RSV (RSV типа A и B; пронумерованы согласно RSV штамму A2). Предлагаемые таким образом антитела обеспечивают связывание с эпитопом, который практически полностью перекрывает центральный консервативный домен. Эти антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с центральным консервативным доменом еще одним совершенно отличающимся способом. Эти антитела, которые обладают наивысшей нейтрализующей способностью, связывают более сложные эпитопы, которые состоят из полного центрального участка и части основного участка C-концевой части центрального домена (остатки 160-192 RSV типа A и B (пронумерованы согласно штамму A2 RSV). Хотя эти антитела связываются с более крупным и, следовательно, более вариабельным участком, эти антитела связывают и нейтрализуют оба подтипа, поскольку связывание зависит исключительно от распознавания основной и боковой цепей консервативных остатков (смотри таблицу 17). В соответствии с тонким картированием, используя анализ Pepscan, показано, что антитела зависят от остатков в консервативной N-концевой части домена и от остатков в C-концевой части основного домена, и не зависят от остатков в цистеиновой петле. Эти антитела зависят от комплексной конформационной целостности центрального домена, поскольку мутации в цистеине прекращают связывание (например, mAb CB017.5 и особенно CB030.1, смотри табл. 17). Картирование показывает, что участок 160-169 и участок 184-192 являются частью одного антигенного участка, который составляет разделяющий эпитоп у этого класса антител.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела содержат тяжелую цепь с CDR3, содержащим мотив CXXXXC в его аминокислотной последовательности.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из:

a) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3,

b) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 9,

c) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 13, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 14 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 15,

d) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 19, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 20 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 21,

e) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 25, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 26 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 27,

f) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 31, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 33,

g) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 37, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 38 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 39,

h) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 43, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 44 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 45,

i) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 49, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 50 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 51,

j) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 55, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 56 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 57,

k) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 61, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 62 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 63 и

l) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 64, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 65 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 66.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из

a) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 6,

b) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 11 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 12,

c) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 16, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 17 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 18,

d) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 22, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 23 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 24,

e) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 28, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 29 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 30,

f) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 34, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 35 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 36,

g) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 40, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 41 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 42,

h) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 46, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 47 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 48,

i) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 52, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 53 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 54,

j) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 58, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 59 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 60,

k) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 64, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 65 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 66,

l) антитела, содержащего CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 70, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 71 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 72,

Согласно определенным вариантам осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из:

a) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 6;

b) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 9, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 12,

c) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 13, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 14 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 15, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 16, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 17 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 18;

d) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 19, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 20 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 21, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 22, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 23 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 24;

e) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 25, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 26 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 27, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 28, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 29 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 30;

f) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 31, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 33, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 34, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 35 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 36;

g) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 37, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 38 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 39, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 40, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 41 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 42;

h) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 43, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 44 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 45, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 46, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 47 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 48;

i) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 49, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 50 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 51, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 52, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 53 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 54;

j) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 55, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 56 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 57, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 58, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 59 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 60;

k) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 61, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 62 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 63, CDR1-участок легкой цепи с SEQ

ID NO: 64, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 65 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 66;

l) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 68 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 69, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 70, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 71 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 72.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 95.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 96.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из:

a) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 73, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 74;

b) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 75, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 76;

c) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 77, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 78;

d) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 79, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 80;

e) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 81, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 82;

f) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 83, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 84;

g) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 85, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 86;

h) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 87, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 88;

i) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 89, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 90;

j) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 91, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 92;

k) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 93, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 94; и

l) антитела, содержащего вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 95, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 96.

Согласно определенным вариантам осуществления предложены антигенсвязывающие фрагменты из перечисленных выше антител.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с разными эпитопами при сравнении с эпитопами известных антител к G-белку RSV, таких как известное антитело 3D3 к G RSV, которое, как было показано, также связывается с эпитопом в центральном консервативном домене G-белка RSV. Под связыванием с разными эпитопами подразумевают, что антитело связывается с разными критическими аминокислотными остатками по сравнению с известными антителам, такими как 3D3. Более того, показано, что антитела по настоящему изобретению являются более активными, чем любые другие известные антитела, связывающие G-белок RSV, при измерении в in vitro анализе нейтрализации; в частности, in vitro анализе нейтрализации, как описано в примере 7.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела действуют синергически, когда применяются в комбинации с антителами, связывающими F-белок RVS. Используемый в настоящем документе термин "синергический" означает, что комбинированный эффект антител или антигенсвязывающих

фрагментов, когда их применяют в комбинации, выше чем их аддитивные эффекты при отдельном применении. Способ расчета синергии осуществляют с помощью показателя аддитивности. Общее представление о показателе аддитивности (CI) было описано у Chou and Talalay (1984).

Согласно определенным вариантам осуществления антитела предназначены для применения в качестве лекарственного препарата, и предпочтительно для применения в диагностике, терапии и/или профилактике инфекции RSV, вызываемой подтипами A и/или B RSV. Используемый в настоящем документе термин "лечить" или "лечение" относится к снижению вирусной нагрузки у субъекта в случае, если он уже инфицирован RSV, и/или для уменьшения интенсивности симптомов заболевания у такого субъекта. Такие симптомы включают в себя, например, бронхиолит, воспаление дыхательных путей, застой в легких и затрудненное дыхание. "Предупреждение" или профилактика" охватывает замедление или уменьшение распространения RSV, или замедление или снижение проявления, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с инфекцией RSV.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере одно антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. В определенных вариантах композиции являются фармацевтическими композициями, содержащими по меньшей мере одно антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением и по меньшей мере фармацевтически приемлемое вспомогательное средство. Под "фармацевтически приемлемым наполнителем" подразумевают любое инертное вещество, которое сочетают с активной молекулой, такой как антитело, для получения удобной дозировочной формы. "Фармацевтически приемлемое вспомогательное средство" представляет собой вспомогательное средство, которое в применяемых дозах и концентрациях является нетоксичными для пациентов, и является совместимым с другими ингредиентами в составе, содержащем лекарственное средство, другое средство или антитело. Фармацевтически приемлемые наполнители широко применяются и известны из уровня техники.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящее изобретении относится к применению антитела по настоящему изобретению в получении лекарственного препарата для диагностики, профилактики и/или лечения инфекции RSV. Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения или лечения инфекции RSV путем введения нуждающегося в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела в соответствии с настоящим изобретением. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антител, как определено в данном документе, которое является эффективным для предупреждения, уменьшение интенсивности и/или лечения состояния, возникшего в результате инфекции RSV. Уменьшение интенсивности, используемое в данном документе, может относится к снижению видимых или заметных симптомов заболевания, вирусемии или любого другого заметного проявление инфекции RSV.

Для применения в терапии антитела или их фрагменты составляют в фармацевтическую композицию, используя подходящие вспомогательные средства, и вводят в соответствии со стандартными протоколами. Фармацевтическая композиция может содержать в качестве основного активного ингредиента, моноклональное антитело, особенно моноклональное антитело или фрагмент, которые характеризуются перекрестной реактивностью с G-белком из обоих подтипов A и B. В качестве альтернативы, два моноклональных антитела могут выступать основным активным ингредиентом, где один более интенсивно вступает в реакцию с G-белком из подтипа A, а другой более интенсивно вступает в реакцию с G-белком из B-подтипа. Во всех этих случаях может присутствовать дополнительное терапевтическое средство, включающее в себя одно или несколько антител, которые характеризуются иммунореактивностью с F-белком RSV, или другие терапевтические средства, которые эффективны в отношении RSV или воспаления. Таким образом, противовоспалительные средства, такие как стероидные и нестероидные противовоспалительные соединения, могут входить в состав композиции.

Согласно определенным вариантам осуществления можно применять полное антитело, т.е. содержащее комплемент-связывающий Fc-участок.

Согласно определенным вариантам осуществления, например, для уменьшения воспалительной реакции в легких, применяют только антигенсвязывающие фрагменты антител. Введение смесей иммуноспецифичных фрагментов и целых антител также включено в объем настоящего изобретения.

Лечение может быть целесообразным в группе пациентов, восприимчивой к инфекции RSV. Такая группа пациентов включает без ограничений, например, пожилых (например, ≥50 лет, ≥60 лет и предпочтительно ≥65 лет), молодых (например, ≤5 лет ≤1 лет), госпитализированных пациентов, пациентов с ослабленным иммунитетом и пациентов, которые получали лечение противовирусными соединениями, но показали недостаточный ответ на лечение противовирусными соединениями.

Введение композиций антител по настоящему изобретению, как правило, осуществляют посредством инъекции, обычно внутримышечной или внутривенной инъекции. Лекарственные формы получают способами, известными в данной области, для введения композиций антител. Подходящие лекарственные формы можно найти в стандартных справочниках, таких как Remington's Pharmaceutical Sciences, последнее издание, Mack Publishing Co., Easton, PA, включены в настоящий документ путем ссылки. Составы, как правило, представляют собой составы, которые подходят для парентерального введения, в том

числе изотонические растворы, которые включают буферы, антиоксиданты и им подобные, а также эмульсии, которые включают системы доставки, такие как липосомы, мицеллы и наночастицы. Использование необходимых протоколов и лекарственных форм зависят от заключения лечащего врача, а также от конкретного состояния субъекта. Уровни дозировок будут зависеть от возраста, общего состояния здоровья и тяжести инфекции, при необходимости, от субъекта.

Другой аспект настоящего изобретения включает в себя функциональные варианты антител, как определено в настоящем документе. Молекулы считаются функциональными вариантами антитела в соответствии с настоящим изобретением, если варианты способны конкурировать за специфическое связывание с эпитопом RSV или его фрагментом с "исходными" или "эталонными" антителами. Другими словами, молекулы считаются функциональными вариантами антитела в соответствии с настоящим изобретением, если функциональные варианты все еще способны связываться с одним и тем или перекрывающимся эпитопом RSV или его фрагментом. Функциональные варианты включают без ограничения производные, которые, по сути, подобны по основной структурной последовательности, включая те, которые имеют модификации в Fc-рецепторе или других участках, связанных с эффекторными функциями, и/или которые содержат, например, in vitro или in vivo модификации, химические и/или биохимические, не встречающиеся в исходном антителе. Такие модификации включают, помимо прочих, ацетилирование, ацилирование, ковалентное присоединение нуклеотидов или производных нуклеотидов, ковалентное присоединение липидов или производных липидов, перекрестное сшивание, формирование дисульфидных связей, гликозирование, гидроксилирование, метилирование, окисление, ПЭГилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование и им подобные.

В качестве альтернативы, функциональные варианты могут представлять собой антитела, которые определены в настоящем изобретении, содержащие аминокислотную последовательность, которая содержит замены, вставки, делеции или их комбинации по одной или более аминокислотам по сравнению с аминокислотными последовательностями исходных антител. Кроме того, функциональные варианты могут характеризоваться усечениями аминокислотной последовательности либо на амино-, либо на карбоксильном концах, либо на обоих концах. Функциональные варианты в соответствии с настоящим изобретением могут иметь одинаковую или различные, либо более высокую, либо более низкую аффинности связывания по сравнению с исходным антителом, но все еще способны связываться с RSV или его фрагментом. Например, функциональные варианты в соответствии с настоящим изобретением могут характеризоваться повышенной или пониженной аффинностью связывания в отношении RSV или его фрагменту по сравнению с исходными антителами. Предпочтительно модифицируют аминокислотные последовательности в вариабельных участках, включая без ограничения каркасные участки, гипервариабельные участки, в частности, CDR3-участки. Обычно вариабельные участки легкой цепи и тяжелой цепи содержат три гипервариабельных участка, включающих три CDR, и более консервативные участки, так называемые каркасные участки (FR). Гипервариабельные участки содержат аминокислотные остатки из CDR и аминокислотные остатки из гипервариабельных петель. Функциональные варианты, подразумеваемые как подпадающие в объем настоящего изобретения, характеризуются по меньшей мере от приблизительно 50 до приблизительно 99%, предпочтительно по меньшей мере от приблизительно 60 до приблизительно 99%, более предпочтительно по меньшей мере от приблизительно 70 до приблизительно 99%, еще более предпочтительно по меньшей мере от приблизительно 80 до приблизительно 99%, наиболее предпочтительно по меньшей мере от приблизительно 90 до приблизительно 99%, в частности, по меньшей мере от приблизительно 95 до приблизительно 99% и, в частности, по меньшей мере от приблизительно 97 до приблизительно 99% идентичностью и/или гомологией аминокислотной последовательности с определенными в данном документе исходными антителами. Для оптимального выравнивания подлежащих сравнению аминокислотных последовательностей и для определения похожих или идентичных аминокислотных остатков можно применять компьютерные алгоритмы, такие как, помимо прочих, Gap или Bestfit, которые известны специалистам в данной области. Функциональные варианты можно получить путем изменения исходных антител или их частей с помощью общих способов молекулярной биологии, известных из уровня техники, включая без ограничений ПЦР сниженной точности, олигонуклеотид-направленный мутагенез, сайт-направленный мутагенез или шаффлинг тяжелой и/или легкой цепи.

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение включает иммуноконъюгаты, т.е. молекулы, содержащие по меньшей мере одно антитело, антигенсвязывающий фрагмент или функциональный вариант или дополнительно содержащее по меньшей мере одну метку, например, помимо прочих, выявляемый фрагмент/выявляемое средство. Также в настоящем изобретении предусмотрены смеси с иммуноконъюгатами в соответствии с настоящим изобретением или смеси по меньшей мере с одним иммуноконъюгатом в соответствии с настоящим изобретением или другой молекулой, такой как терапевтический средство или другое антитело или иммуноконъюгат. В дополнительных вариантах осуществления иммуноконъюгаты по настоящему изобретению могут содержать более одной метки. Эти метки могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга, и они могут быть нековалентно присоединены к антителам/нековалентно конъюгированы с ними. Метка (метки) может быть непосредственно присоединена к антителам/конъюгирована с ними посредством ковалентного связывания. Альтернативно, мет-

ка(метки) может быть присоединена к антителам/конъюгирована с ними посредством одного или нескольких сшивающих соединений. Методики конъюгирования меток с антителами хорошо известны специалистам в данной области. Метки иммуноконъюгатов по настоящему изобретению могут представлять собой терапевтические средства, но также они могут представлять собой выявляемые фрагменты/средства. Метками, подходящими для применения в терапии и/или в предупреждении, могут быть токсины или их функциональные части, антибиотики, ферменты, другие антитела, которые повышают фагоцитоз и иммуностимуляцию. Иммуноконъюгаты, содержащие выявляемое средство, можно применять в диагностических целях, например, для оценки того, был ли субъект инфицирован RSV, или для отслеживания развития или прогресса инфекции RSV как части процедуры клинического тестирования, например, для определения эффективности данной схемы лечения. Тем не менее, их также можно применять для других связанных с выявлением, и/или аналитических, и/или диагностических целей. Выявляемые фрагменты/средства включают без ограничения ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминисцентные материалы, биолюминисцентные материалы, радиоактивные материалы, позитрон-активные металлы и не радиоактивные ионы парамагнитных металлов. Метки, применяемые для мечения антител для связанных с выявлением, и/или аналитических, и/или диагностических целей, зависят от конкретных применяемых связанных с выявлением/аналитических/диагностических методик и/или способов, таких как, помимо прочих, иммуногистохимическое окрашивание образцов (ткани), выявление с помощью проточной цитометрии, выявление с помощью сканирующей лазерной цитометрии, флуоресцентные иммуноанализы, твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), радиоиммунологические анализы (RIA), биоанализы (например, анализы фагоцитоза), применения вестерн-блоттинга и т.д. Подходящие метки для связанных с выявлением/аналитических/диагностических методик и/или способов хорошо известны из уровня техники и доступны специалистам в данной области.

Кроме того, антитела человека или иммуноконъюгаты по настоящему изобретению также могут быть прикреплены к твердым подложкам, которые особенно пригодны для иммуноанализов in vitro или для очистки RSV или его фрагментов. Для облегчения очистки антитела по настоящему изобретению можно слить с маркерными последовательностями, такими как пептид. Примеры включают без ограничений гекса-гистидиновую метку, гемагглютининовую (HA) метку, myc-метку или flag-метку. Альтернативно, антитело можно коньюгировать со вторым антителом с получением гетероконьюгата антител. Согласно другому аспекту антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с одним или несколькими антигенами/присоединены к ним. Предпочтительно эти антигены представляют собой антигены, которые распознаются иммунной системой субъекта, которому вводят конъюгат антитело-антиген. Антигены могут быть одинаковыми, но также могут отличаться друг от друга. Способы конъюгации для присоединения антигенов к антителам хорошо известны из уровня техники и включают без ограничений применение сшивающих средств.

После получения иммуноконъюгатов химическим способом путем коньюгирования, непосредственно или опосредовано, посредством, например, линкера, иммуноконъюгаты можно получить в виде белков слияния, содержащих антитела по настоящему изобретению и подходящую метку. Белки слияния можно получить с помощью способов, известных из уровня техники, таких как, например, рекомбинантные способы, путем конструирования молекул нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, в рамке с нуклеотидными последовательностями, кодирующими подходящую метку (метки), а затем экспрессии молекул нуклеиновых кислот.

Другой аспект настоящего изобретения заключается в получении молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, антигенсвязывающий фрагмент или функциональный вариант согласно настоящему изобретению. Такие молекулы нуклеиновых кислот можно применять в качестве промежуточных продуктов с целью клонирования, например, в описанном выше процессе созревания аффинности. Согласно предпочтительному варианту осуществления молекулы нуклеиновой кислоты являются выделенными или очищенными. Специалист в данной области поймет, что функциональные варианты данных молекул нуклеиновых кислот также предусмотрены как часть настоящего изобретения. Функциональные варианты представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, которые могут непосредственно транслироваться с помощью стандартного генетического кода с получением аминокислотной последовательности, идентичной транслированной с исходных молекул нуклеиновых кислот.

Предпочтительно молекулы нуклеиновых кислот кодируют антитела, содержащие описанные выше CDR-участки. В дополнительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот кодируют антитела, которые содержат два, три, четыре, пять или даже шесть CDR-участков антител по настоящему изобретению.

Другим аспектом настоящего изобретение является обеспечение векторов, т.е. конструкций на основе нуклеиновых кислот, содержащих одну или несколько молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Векторы могут быть получены из плазмид, таких как, помимо прочих, F, R1, RP1, Col, pBR322, TOL, Ti и т.д.; космид, фагов, таких как лямбда, лямбдоидный, M13, Mu, P1, P22, Qβ, T-even, T-odd, T2, T4, T7 и т.д.; растительных вирусов. Векторы можно применять для клонирования и/или для экспрессии антител по настоящему изобретению и даже можно применять для генной терапии. Также

настоящим изобретением охватываются векторы, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, функционально связанные с одной или несколькими регулирующими экспрессию молекулами нуклеиновых кислот. Выбор вектора зависит от соблюдаемых процедур рекомбинации и используемого хозяина. Введение векторов в клетки-хозяева может быть произведено с помощью, помимо прочего, трансфекции с использованием фосфата кальция, вирусной инфекции, трансфекции, опосредованной DEAE-декстраном, трансфекции с использованием липофектамина или электропорации. Векторы могут автономно реплицироваться или могут реплицироваться вместе с хромосомой, в которую они были интегрированы. Предпочтительно векторы содержат один или несколько маркеров для отбора. Выбор маркеров может зависеть от выбранных клеток хозяев, хотя это не является решающим для настоящего изобретения, что хорошо известно специалистам в данной области. Они включают без ограничения канамицин, неомицин, пуромицин, гигромицин, зеоцин, ген тимидин-киназы из вируса простого герпеса (HSV-TK), ген дигидрофолат-редуктазы из мыши (dhfr). Векторы, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитела человека, которые описаны выше, функционально связанные с одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими белки или пептиды, которые можно использовать для выделения антител человека, также охватываются настоящим изобретением. Эти белки или пептиды включают без ограничения глутатион-S-трансферазу, мальтоза-связывающий белок, металл-связывающий полигистидин, зеленый флуоресцентный белок, люциферазу и бета-галактозидазу.

Настоящее изобретение также предоставляет клетки хозяина, содержащие одну или несколько копий векторов, упоминающихся ранее. Клетки-хозяева включают без ограничения клетки, происходящие из млекопитающего, растения, насекомого, клетки грибного или бактериального происхождения. Бактериальные клетки включают без ограничения клетки из грамположительных бактерий или грамотрицательных бактерий, таких как некоторые виды из рода Escherichia, как например, E. coli, и Pseudomonas. В группе грибных клеток предпочтительно используют клетки дрожжей. Экспрессии в дрожжах можно достичь при использовании штаммов дрожжей, таких как, помимо прочего, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae и Hansenula polymorpha. Более того, в качестве клеток-хозяев можно использовать клетки насекомых, такие как клетки из Drosophila и Sf9. Кроме того, клетки хозяева могут представлять собой растительные клетки, такие как, помимо прочего, клетки из сельскохозяйственных растений, таких как лесные растения, или клетки из растений, обеспечивающих пищевые и сырьевые материалы, таких как зерновые растения, или лекарственных растений, или клеток из декоративных растений, или клеток из цветочных луковичных культур. Трансформированные (трансгенные) растения или растительные клетки получают с помощью известных способов, например, опосредованного Agrobacterium переноса генов, трансформации листовых дисков, трансформации протопластов с помощью индуцированного полиэтиленгликолем переноса ДНК, электропорации, обработки ультразвуком, микроинъекции или биолистического переноса генов. Кроме того, подходящая система экспрессии может представлять собой бакуловирусную систему. Системы экспрессии, использующие клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки COS, клетки BHK, клетки NSO или клетки меланомы Боуэса, являются предпочтительными в настоящем изобретении. Клетки млекопитающих обеспечивают экспрессируемые белки с посттрансляционными модификациями, которые являются наиболее подобными природным молекулам, происходящим из млекопитающих. Поскольку настоящее изобретение касается молекул, которые можно вводить людям, особенно предпочтительной будет человеческая система экспрессии. Таким образом, даже более предпочтительно, клетки-хозяева представляют собой клетки человека. Примерами клеток человека являются, помимо прочего, клетки HeLa, 911, AT1080, A549, 293 и HEK293. Согласно предпочтительным вариантам осуществления человеческие клетки-продуценты содержат, по меньшей мере, функциональную часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аденовирусный участок E1 в экспрессируемом формате. Согласно еще более предпочтительным вариантам осуществления указанные клетки-хозяева являются полученными из сетчатки человека и иммортализированны нуклеиновыми кислотами, содержащими последовательности из аденовируса E1, такими как клетки 911 или клеточная линия, депонированная в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), CAMR, Солсбери, Уилтшир SP4 OJG, Великобритания, 29 февраля 1996 года под номером 96022940 и представленная на рынке под торговым названием PER.C6® (PER.C6 является зарегистрированным торговым названием Crucell Holland B.V.). В контексте данной заявки "клетки PER.C6" относятся к клеткам, депонированным под номером 96022940, или к их предкам, более ранним или более поздним пассажам, а также к потомкам предков депонированных клеток, а также к производных любого из следующего. Получение рекомбинантных белков в клетках-хозяевах можно осуществлять согласно способам, известным из уровня техники. Применение клеток, представленных на рынке под торговым названием PER.C6®, в качестве платформы для получения белков, представляющих интерес, было описано в документе WO 00/63403, раскрытие которого включено в данный документ с помощью ссылки в полном объеме.

Антитела могут быть получены с помощью различных средств. Способ получения антитела согласно настоящему изобретению представляет собой дополнительный аспект настоящего изобретения. Способ включает этапы: a) культивирование хозяина согласно настоящему изобретению в условиях, приспо-

собленных для экспрессии антитела, и b) необязательно выделение экспрессированного антитела. Экспрессированные антитела можно выделять из бесклеточных экстрактов, но предпочтительно их выделяют из среды культивирования. Вышеописанный способ получения также можно использовать для создания функциональных вариантов антител и/или иммуноконъюгатов согласно настоящему изобретению. Способы извлечения белков, таких как антитела, из бесклеточных экстрактов или среды культивирования хорошо известны специалисту в данной области.

В качестве альтернативы, после экспрессии в хозяевах, таких как клетки-хозяева, антитела и иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению можно получать путем синтеза с использованием общепринятых синтезаторов пептидов или в бесклеточных трансляционных системах с использованием нуклеиновой кислоты РНК, полученной из молекул ДНК согласно настоящему изобретению. Антитела согласно настоящему изобретению можно получать с помощью трансгенных млекопитающих, отличных от человека, таких как, например, трансгенные мыши или кролики, которые экспрессируют гены иммуноглобулинов человека. Предпочтительно трансгенные млекопитающие, отличные от человека, имеют геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи человека, кодирующий все антитела или их часть, которые описаны выше. Трансгенные млекопитающие, отличные от человека, можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом с RSV или его фрагментом. Протоколы иммунизации млекопитающих, отличных от человека, хорошо известны из уровня техники. См., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Edited by: E. Harlow, D. Lane (1998), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, и Current Protocols in Immunology, Edited by: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober (2001), John Wiley & Sons Inc., New York, раскрытия которых включены в данный документ с помощью ссылки. Протоколы иммунизации часто включают несколько иммунизаций либо с адъювантами, либо без адъювантов, таких как полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда, но могут также включать иммунизации "оголенной" ДНК. Согласно другим вариантам осуществления человеческие антитела продуцируются В-клетками, плазматическими клетками и/или клетками памяти, полученными из трансгенных животных. Согласно еще одному варианту осуществления человеческие антитела продуцируются гибридомами, которые получают путем слияния В-клеток, полученных из вышеописанных трансгенных млекопитающих, отличных от человека, с иммортализированными клетками. В-клетки, плазматические клетки и гибридомы, которые можно получать из вышеописанных трансгенных млекопитающих, отличных от человека, и человеческие антитела, которые можно получать из вышеописанных трансгенных млекопитающих, отличных от человека, В-клеток, плазматических клеток и/или клеток памяти и гибридом, также являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает наборы, содержащие по меньшей мере антитело, иммуноконъюгат и/или по меньшей мере нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением. Необязательно, вышеописанные компоненты наборов в соответствии с настоящим изобретением являются запакованными в подходящие контейнеры и маркированными для диагностики, профилактики и/или лечения указанных состояний. Вышеупомянутые компоненты можно хранить в однодозных или многодозных контейнерах в виде водного, предпочтительно стерильного раствора или в виде лиофилизированного, предпочтительно стерильного состава для восстановления. Набор может дополнительно содержать больше контейнеров, содержащих фармацевтически приемлемый буфер. Он может дополнительно включать другие материалы, желаемые с коммерческой или пользовательской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы, среду культивирования для одного или нескольких из подходящих хозяев и, возможно, даже по меньшей мере одно другое терапевтическое, профилактическое или диагностическое средство. К набору могут прилагаться инструкции, обычно включенные в коммерческие упаковки терапевтических, профилактических или диагностических продуктов, которые содержат информацию например, о показаниях, по применению, дозировке, производстве, введению, противопоказаниям и/или предупреждению, относящиеся к применению таких терапевтических, профилактических или диагностических продуктов.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением можно также преимущественно применять в качестве диагностического средства в in vitro способе обнаружения RSV. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу выявления RSV в образце, где способ предусматривает этапы: (a) анализирование в образце уровня антигена RSV, т.е. приведение образца в контакт с диагностически эффективным количеством антитела (или его фрагментов) или иммуноконъюгата в соответствии с настоящим изобретением, и (b) сравнение анализируемого уровня антигена RSV с контрольным уровнем; при этом увеличение анализируемого уровня антигена RSV по сравнению с контрольным уровнем указывает на инфекцию RSV. Образец может представлять собой биологический образец, включая без ограничения кровь, сыворотку, кал, мокроту, смывы с носоглотки, бронхиальный лаваж, мочу, ткань или другой биологический материал от (потенциально) инфицированных субъектов, образец, не являющийся биологическим, такой как вода, напиток и т.д. Образец можно сперва обработать, чтобы сделать его более подходящим для способа выявления. Обработка означает, помимо прочего, воздействие на образец, который, предположительно, содержит и/или содержащий вирус, таким образом, что вирус будет распадаться на антигенные компоненты, такие как белки, (поли)пептиды или другие антигенные фраг-

менты. Предпочтительно антитела или иммуноконъюгаты по настоящему изобретению приводят в контакт с образцом в условиях, которые дают возможность формировать иммуннный комплекс между антителом и вирусом или его антигенными компонентами, которые могут присутствовать в образце. Образование иммунного комплекса, если это имеет место, указывающее на присутствие вируса в образце, затем обнаруживают и измеряют с помощью подходящих средств. Такие способы включают, помимо прочего, гомогенный и гетерогенный иммунологические анализы связывания, такие как радиоиммунологические анализы (RIA), ELISA, иммунофлуоресцентный анализ, иммуногистохимический анализ, FACS, BIACORE и вестерн-блоттинг. Предпочтительными методиками анализа, особенно для крупномасштабного клинического скрининга сывороток крови и крови пациентов, и продуктов, получаемых из крови пациентов, являются методики ELISA и вестерн-блоттинг. ELISA-тесты являются особенно предпочтительными.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах, которые не предназначены для ограничения изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение и мечение антигена

В отличии от белка слияния (RSV F) экспрессируемого на поверхности вирусной оболочки, белок связывания (RSV G) является высоковариабельным, определяя, таким образом, два обширных подтипа RSV (т.е. подтипы A и B). Несмотря на вариабельность последовательности, G RSV содержит центральный и высококонсервативный участок. С целью получения моноклональных антител с широким спектром активности RSV G, соответствующий репрезентативной подгруппе A (RSV A/Long) и подгруппе штамма B (RSV B/B1), экспрессировали рекомбинантно. В следующем примере рекомбинантный белок связывания (G-белок) RSV экспрессировали в клетках Freestyle 293, очищенных и меченных для использования в эксперименте по сортировке отдельных клеток.

Экспрессия Ga и Gb RSV

Рекомбинантный белок связывания (G-белок) RSV, который аналогичен RSV A/Long (№ доступа P20895) и RSV B/B1 (№ доступа NP_056862), указанных в данном документе Ga и Gb RSV, экспрессировали путем использования предназначенного для трансфекции клеток млекопитающих вектора экспрессии с промотором CMV (Invitrogen Corp., pcDNA3.1) с Myc-меткой (EQKLISEEDL) и 6X гистидиновой меткой (табл. 1). Лидерную последовательность, соответствующую V каппа I сигнальному пептиду человека, встраивали в аминоконцы для содействия секреции. Как Ga, так и Gb RSV экспрессировались без трансмембранного домена и содержали аминокислоты 65-288 и 65-299 из Ga и Gb RSV, соответственно.

Ga и Gb RSV трансфицировали в соответствии с протоколами производителя. Рекомбинантно экспрессируемые Ga- и Gb-белки RSV очищали при помощи хроматографии на Nickel NTA. Через 72 ч после трансфекции собирали супернатант и подвергали его диализу в течение ночи против 20 мМ Tris-HCL при pH8 и 300 мМ NaCl. На следующий день диализ повторяли со свежим буфером в течение дополнительных 6 ч. Супернатант после диализа дополняли 5% глицерином и 10 мМ имидазолом (VWR, № по кат. EM-5720) и загружали в колонку, заполненную 2 мл гранул агарозы Ni-NTA (Qiagen, № по кат. 30310). Связанный белок затем промывали с помощью 12,5 мМ буфера для промывки, состоящего из 20 мМ Tris-HCl, pH8, 300 мМ NaCl, 5% глицерина и 20 мМ имидазола. Белок элюировали с помощью 5 мл элюирующего буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl, pH8, 300 мМ NaCl, 5% глицерина и 50 мМ имидазола. Наконец, элюат подвергали диализу против четырех литров фосфатно-солевого буфера (PBS) при 4°C в течение ночи. Полученный в результате диализа белок концентрировали до 0,5-1,0 мл в концентраторе 30K MWCO (Millipore, концентратор Amicon Ultracel) и его определяли количественно при помощи анализа с бицинхониновой кислотой (анализ BCA; Thermo Fisher, по протоколам производителя). Кроме того, качество очищенных белков контролировали с помощью SDS-PAGE/Coomassie.

Проводили флуоресцентное мечение Ga RSV при помощи Alexa Fluor 647 (AF 647), используя набор Alexa Fluor 647 microscale protein labelling kit (Invitrogen № по кат. A30009) согласно протоколам производителя. Вкратце, провели мечение 100 мг Ga RSV с приблизительным уровнем мечения 3 моль красителя на молекулу белка. После 15-минутного периода инкубации с красителем меченый белок очищали с использованием шариков Biogel, поставляемых с набором. После очистки определяли фактический уровень мечения, который составил 1,2 моля AF 647 на моль белка, используя УФ-спектрофотометр NanoDrop (производственный). Аналогичным образом провели мечение Gb-белка RSV при помощи Alexa Fluor 488 (AF 488), используя набор микромаштабный набор для мечения малых количеств белка (Invitrogen, № по кат. A30006). Проводили мечение ста мкг белка согласно протоколам производителя, и после завершающей очистки уровень мечения определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop, который составлял приблизительно 2 молекулы AF 488 на моль белка.

Таблица 1. Используемые последовательности рекомбинантного G-белка RSV

Белок (№ доступа)	Аминокислотная последовательность
RSV G A/Long (P20895)	ANHKVTLTTAIIQDATSQIKNTTPTYLTQDPQLGISFSNLSEITSQTTTILASTTPGVKS NLQPTTVKTKNTTTTQTQPSKPTTKQRQNKPPNKPNNDFHFEVFNFVPCSICSNNPTCWA ICKRIPNKKPGKKTTTKPTKKPTFKTTKKDLKPQTTKPKEVPTTKPTEEPTINTTKTNIT TTLLTNNTTGNPKLTSQMETFHSTSSEGNLSPSQVSTTSEHPSQPSSPPNTTRQQAYVEQ KLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO: 97)
RSV G B/B1 (NP_056862)	ANHKVTLTTVTVQTIKNHTEKNITTYLTQVPPERVSSSKQPTTTSPIHTNSATTSPNTKS ETHHTTAQTKGRTTTSTQTNKPSTKPRLKNPPKKPKDDYHFEVFNFVPCSICGNNQLCKS ICKTIPSNKPKKKPTIKPTNKPTTKTTNKRDPKTPAKTTKKETTTNPTKKPTLTTTERDT STSQSTVLDTTTLEHTIQQQSLHSTTPENTPNSTQTPTASEPSTSNSTQNTQSHAQAYVE QKLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO: 98)

Пример 2. Идентификация антител, специфичных к G-белку RSV

Нейтрализующие моноклональные антитела с широким спектром активности к G-белку RSV получали из В-клеток памяти (CD19+CD27+IgG+), выделенных мононуклеаров периферической крови (PBMC), полученных через банк крови в Сан Диего (the San Diego Blood Bank). Вкратце, CD22+ В-клетки окрашивали флуоресцентно меченными антителами к маркерам поверхности В-клеток и инкубировали с Ga, Gb RSV (меченые Alexa Fluor 647 и 488, соответственно, как описано в примере 1), или пептидом (SYM-1706) центрального консервативного домена (CCD) G-белка RSV, конъюгированным с биотином. CD19/CD27/IgG/RSVGa/RSVGb или CD19/CD27/IgG/SYM-1706 (используемые в некоторых экспериментах по сортировке) позитивные клетки подвергали сортировке и одиночные клетки иммобилизировали в отдельных лунках 96-луночного планшета, используя FACSAria II (BD Biosciences) или MoFlo XDP (Beckman Coulter). Планшеты хранили при -80°C до проведения анализа. В среднем исследовали примерно $10\text{-}25\times10^6$ В-клеток с донора.

Пример 3. Выделение генов из тяжелой и легкой цепи из одиночных В-клеток, специфичных к RSV Ga и Gb

Как описано в примере 2, нейтрализующие моноклональные антитела с широким спектром активности к RSV выделяли из В-клеток памяти (CD19+CD27+IgG+) с реактивностью к Ga- и Gb-белкам RSV или к пептиду (SYM-1706) центрального консервативного домена (CCD) G-белка RSV, конъюгированному с биотином. Гены тяжелой и легкой цепи выделяли при помощи подхода на основе двух-стадийной ПЦР из отдельных В-клеток, клонировали и экспрессировали in vitro, в виде Fab-фрагментов антител.

Синтез первой цепи кДНК

Комплементарную ДНК (кДНК) получали из отдельных подвергнутых сортировке клеток, используя набор Invitrogen's Superscript III First Strand Synthesis (набор Superscript III, № по кат. 18080-051).

Амплификация тяжелой и легкой цепи IgG с помощью гнездовой ПЦР

Вариабельные участки тяжелой и легкой цепи IgG (и каппа, и лямбда цепей) амплифицировали из ранее полученной кДНК, используя подход на основе двухстадийной гнездовой ПЦР. Далее ПЦР-фрагменты тяжелой и легкой цепи подвергали сборке в одну кассету для облегчения последующего клонирования, используя ПЦР с перекрывающимися праймерами.

Стадия I. Амплификация

Для стадии I 2,5 мкл ранее полученной кДНК, синтезированной как упоминалось выше, использовали в качестве матрицы для амплификации тяжелой, легких каппа- и лямбда-цепей. Использовали пул праймеров, специально сконструированных для лидерных участков тяжелой цепи антитела (праймеры CB-5'LVH), легкой каппа-цепи (праймеры CB-5'LVk) и легкой лямбда-цепи (праймеры CB-5' LVlam) (табл. 2-4). Один обратный праймер, специально сконструированный для для CHI-участка, Ck- и CL-участка тяжелой цепи, легкой каппа-цепи и легкой лямбда-цепи, соответственно, использовали в стадии I реакции ПЦР.

Таблица 2. VH, стадия I, прямые праймеры (5'-3')

Название	Последовательность
CB-5'LVH1a	ATGGACTGGACCTGGAGGTTCCTC (SEQ ID NO: 99)
CB-5'LVH1b	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTC (SEQ ID NO: 100)
CB-5'LVH1c	ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTC (SEQ ID NO: 101)
CB-5'LVH1d	ATGGACTGGACCTGGAGCATCC (SEQ ID NO: 102)
CB-5'LVH2	GGACATACTTTGTTCCACGCTCCTGC (SEQ ID NO: 103)
CB-5'LVH3a	AGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGC (SEQ ID NO: 104)
CB-5'LVH3b	AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGC (SEQ ID NO: 105)
CB-5'LVH3c	AGGTGTCCAGTGTCAGGTACAGC (SEQ ID NO: 106)
CB-5'LVH4	GCAGCTCCCAGATGGGTCCTG (SEQ ID NO: 107)
CB-5'LVH5	TCAACCGCCATCCTCGCCCTC (SEQ ID NO: 108)
CB-5'LVH6	GTCTGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGC (SEQ ID NO: 109)
3'CgCH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC (SEQ ID NO: 110)

Таблица 3 Vk, стадия I, прямые праймеры (5'-3')

Название	Последовательность
CB-5'LVk1a	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC (SEQ ID NO: 111)
CB-5'LVk1b	ATGAGGGTCCCTGCTCAGCTC (SEQ ID NO: 112)
CB-5'LVk1c	ATGAGAGTCCTCGCTCAGCTC (SEQ ID NO: 113)
CB-5'LVk2	TGGGGCTGCTAATGCTCTGG (SEQ ID NO: 114)
CB-5'LVk3	CCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG (SEQ ID NO: 115)
CB-5'LVk4	TCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGC (SEQ ID NO: 116)
CB-5'LVk5	CTCCTCAGCTTCCTCCTCCTTTGG (SEQ ID NO: 117)
CB-5'LVk6	AACTCATTGGGTTTCTGCTGCTCTGG (SEQ ID NO: 118)
3'Ck-Rev494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCTC (SEQ ID NO: 119)

Таблица 4 VL, стадия I, прямые праймеры (5'-3')

Название	Последовательность
CB-5' LVlam1	CTCCTCGCTCACTGCACAGG (SEQ ID NO: 120)
CB-5' LVlam2	CTCCTCTCTCACTGCACAGG (SEQ ID NO: 121)
CB-5' LVlam3	CTCCTCACTCGGGACACAGG (SEQ ID NO: 122)
CB-5' LVlam4	ATGGCCTGGACCCCTCTCTG (SEQ ID NO: 123)
CB-5' LVlam5	ATGGCATGGATCCCTCTCTTCCTC (SEQ ID NO: 124)
3'Clam-Rev	CAAGCCAACAAGGCCACACTAGTG (SEQ ID NO: 125)

Стадия II. Аплификация

Для стадии II 2,5 мл продукта ПЦР стадии I ПЦР, синтезированного в результате реакции как было описано выше, использовали в качестве матрицы для амплификации генов тяжелой, легкой каппа- и лямбда-цепей. Использовали пул прямых праймеров, специально сконструированных для рамки 1 участка тяжелой цепи, легкой каппа-цепи и легкой лямбда-цепи (табл. 5-7). Использовали пул обратных праймеров, специально сконструированных для участка стыка тяжелой цепи (праймеры 3'SalIJH), участка стыка легкой каппа-цепи (праймеры 3'Jk) и специфичный к участку 5'праймер, соответствующий легкой лямбда-цепи (праймеры CB-VL). Кроме того, прямые праймеры стадии II сконструировали для введения сайта рестрикции SfiI, тогда как обратные праймеры стадии II для тяжелых цепей сконструировали для введения сайта рестрикции SalI.

Таблица 5. VH, стадия II, праймеры (5'-3')

Название	Последовательность
CB-VH1a	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 126)
CB-VH1b	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 127)
CB-VH1c	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTTCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 128)
CB-VH1d	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTTGTGCAGTC (SEQ ID NO: 129)
CB-VH2a	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGG (SEQ ID NO: 130)
CB-VH2b	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGG (SEQ ID NO: 131)
CB-VH3a	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 132)
CB-VH3b	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTC (SEQ ID NO: 133)
CB-VH3c	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 134)
CB-VH3d	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG (SEQ ID NO: 135)
CB-VH4a	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGSTGCAGCTGCAGGAG (SEQ ID NO: 136)
CB-VH4b	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG (SEQ ID NO: 137)
CB-VH5	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 138)
CB-VH6	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG (SEQ ID NO: 139)

CB-VH7	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTG (SEQ ID NO: 140)
3'SalIJH1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG (SEQ ID NO: 141)
3'SalIJH3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG (SEQ ID NO: 142)
3'SalIJH6	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG (SEQ ID NO: 143)

Таблица 6. VK, стадия II, праймеры (5'-3')

Название	Последовательность
CB-VK1a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO: 144)
CB-VK1b	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCCAGTTGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO: 145)
CB-VK1c	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO: 146)
CB-VK2a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGATRTTGTGATGACTCAGTCTCCACTC (SEQ ID NO: 147)
CB-VK3a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG (SEQ ID NO: 148)
CB-VK3b	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG (SEQ ID NO: 149)
CB-VK3c	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAG (SEQ ID NO: 150)
CB-Vk4	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCGTGATGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO: 151)
CB-Vk5	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAACGACACTCACGCAGTCTCC (SEQ ID NO: 152)
CB-Vk6	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAG (SEQ ID NO: 153)
3'Jk1/4 Rev IIa-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATYTCCACCTTGGTC (SEQ ID NO: 154)
3'Jk2 Rev IIb-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATCTCCAGCTTGGTC (SEQ ID NO: 155)
3'Jk3 Rev IIc-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATATCCACTTTGGTC (SEQ ID NO: 156)
3'Jk5 Rev IId-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTAATCTCCAGTCGTGTC (SEQ ID NO: 157)

Таблица 7. VL стадия II праймеры (5'-3')

Название	Последовательность
CB-VL1	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTC (SEQ ID NO: 158)
CB-VL2	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCTCCTATGTGCTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 159)
CB-VL3	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCAGTCTGTGCTGACGCAGCC (SEQ ID NO: 160)
CB-VL4	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCAGTCTGTCGTGACGCAGCC (SEQ ID NO: 161)
CB-VL5	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 162)
CB-VL6	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACC (SEQ ID NO: 163)
CB-VL7	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACC (SEQ ID NO: 164)
3'Clam-стадия II	CTCAGAGGAGGGYGGGAACAGAGTGAC (SEQ ID NO: 165)

Стадия III. Амплификация: ПЦР с перекрывающимися праймерами

Для стадии III ПЦР-фрагменты тяжелых и легких цепей (продукты стадии II) соединяли в одну кассету с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами, используя: 1) Fab-линкер (каппа или лямбда; табл. 8), амплифицированный как описано ниже, который отжигается на 3'-конце фрагмента легкой цепи из стадии II и на 5'-конце фрагмента тяжелой цепи из стадии II и содержит константные участки как каппа-, так и лямбда-легкой цепи, 2) прямой перекрывающийся праймер с сайтом рестрикции SfiI, который отжигается на 5'-конце легкой цепи, и 3) обратный праймер с сайтом рестрикции SalI, который отжигается на 3'-конце фрагмента тяжелой цепи из стадии II (табл. 9). Результатом данной реакции является фрагмент в 1200 п.о. (т.е., кассета), состоящий из легкой цепи-линкера-тяжелой цепи. После амплификации продукт реакции ПЦР с линкером или продукт ПЦР с перекрывающимися праймерами разделяли в 1% агарозном геле и экстрагировали из геля согласно протоколам производителя (набор Qiagen Gel Extraction; № № 28706).

Таблица 8. Нуклеотидная последовательность каппа- и лямбда-линкера

Ген	Последовательность
IGKC	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGCTTA AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTTCTAAATAACTTCTATCCCCGTGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTTACGC TTAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA GGGCCTCAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGTTAATCTAGA AATAAGGAGGATATAATTATGAAATACCTGCTGCCGACCGCAGCCGCTGGTCTGC TGCTGCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCC (SEQ ID NO: 166)
IGLC2	GTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGG TGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGA TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAAC AACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCC ACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGT GGCCCCTACAGAATGTTCATAATCTAGAAATAAGGAGGATATAATTATGAAATAC CTGCTGCCGACCGCAGCCGCTGGTCTGCTGCTGCTCGCAGCATAGCCGGCCATGG CC (SEQ ID NO: 167)

Таблица 9. Линкерные праймеры для (5'-3')

Название	Последовательность
FabLinker-F	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC (SEQ ID NO: 168)
FabLinker-R	GGCCATGGCCGGCTATGCTGCGAGC (SEQ ID NO: 169)
Lambda-Fab Linker F	GTCACTCTGTTCCCRCCCTCCTCTGAG (SEQ ID NO: 170)
Overlap-F	CTACCGTGGCCTAGGCGGCC (SEQ ID NO: 171)
Overlap-R	TGCGAAGTCGACGCTGARGAG (SEQ ID NO: 172)

Расщепление и клонирование в бактериальный вектор экспресии

После очистки продукта ПЦР (Qiagen), полученного в результате ПЦР с перекрывающимися праймерами, фрагмент расщепляли и перекрывающийся продукт затем разделяли в 1% агарозном геле. Полосу, соответствующую перекрывающейся кассете (~1,1 т.п.о.), очищали путем экстрагирования из геля (Qiagen). В конце, расщепленный перекрывающийся продукт лигировали и клонировали в бактериальный вектор экспрессии pCB-Fab. Все трансформации проводились с использованием клеток Max Efficiency DH5a (Invitrogen Corp., № по кат. 18258-012). Примерно 100 мкл выделенных клеток высевали на чашки, содержащие 100 мкг/мл карбенициллина и дополненные 20 мМ глюкозы. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C для обеспечения роста колонии.

Пример 4. Связывание Fab-фрагмента с G RSV и создание моноклональных антител

Fab-фрагменты антител, клонированных в примере 3, экспрессировали в бактериях и тестировали в отношении их способности связываться с Ga, Gb RSV, или пептидом, содержащим центральный консервативный домен из G RSV (CCD) (SYM-1706: аминокислотная последовательность: биотин-KQRQNKPPNKPNNDFHFEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKR; SEQ ID NO: 173).

Бактериальный супернатант вносили в планшеты, лунки которых покрывали Ga, Gb RSV, содержащим CCD пептидом, актином в качестве негативного контроля и антителом к $F(ab)_2$ человека и инкубировали в течение 2 ч при 37°C (за исключением содержащего CCD пептида, который инкубировали в планшете, покрытом стрептавидином, в течение 2 ч при комнатной температуре). CR9514 (антитело на основе антитела 3D3, как раскрыто в WO 2009/055711) использовали в качестве позитивного контроля

для Ga, Gb RSV, содержащего CCD пептида и антитела к $F(ab)_2$ человека, и вносили в планшет в разведении 0,1 мг/мл в 0,4% NFDM/PBS/0,05% Tween20. Мышиное антитело к актину (Sigma, № по кат. A3853) использовали в концентрации 1,25 мг/мл как позитивный контроль для планшетов, покрытым бычьим актином. Антитело к HA, конъюгированное с пероксидазой хрена (Roche, № по кат. 12013819001), использовали как вторичное антитело для бактериальных супернатантов. Антитела к Fab человека (Jackson Labs, № по кат. 109-036-097) использовали для контрольных лунок с CR9514 (содержащее вариабельные участки из 3D3). Наконец, козье антитело к мышиному IgG, конъюгированное с пероксидазой хрена (Jackson Labs, № по кат. 115-035-072), использовали для позитивного контроля в виде актина. После инкубации планшеты промывали четыре раза в PBS/0,05% Tween20 и проявляли 50 мкл 1:1 объем/объем TMB:раствора пероксида (Pierce, № по кат. 34021) на протяжении примерно 5 мин. Реакцию сразу же останавливали 50 мкл 2N H_2SO_4 и измеряли поглощение при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA. На позитивное связывание указывало значение при OD_{450}, составлявшее более 0,5 (0,5-0,9 указывает на умеренное связывание, >1 указывает на сильное связывание), и сигнал превышал более чем в 3 раза фоновое значение.

Исходя из результатов ELISA, отбирали в среднем приблизительно шесть клонов, характеризовавшихся реактивностью к антигенам-мишеням. Поскольку каждый Fab-фрагмент антител исходно клонировали с использованием пула праймеров, специфичных к рамке 1 и специфичных к участку стыка, потенциал для перекрестной реакции между праймерами, особенно для праймеров с высокой степенью подобия, был высоким. По этой причине для секвенирования выбрали несколько бактериальных клонов, представляющих каждый продукт перекрывания. Плазмидную минипреп ДНК выделяли согласно протоколам производителя (Набор Qiagen Miniprep Kit № по кат. 27106). Тяжелые и легкие цепи, соответствующие каждому выбранному клону, секвенировали с праймерами, вынесенными в табл. 10. Последовательности анализировали, выявили ближайшие зародышевые линии, и определили CDR и каркасные участки. Эту информацию в дальнейшем использовали для конструирования праймеров для клонирования и преобразования антител-кандидатов в IgG.

Таблица 10. Праймеры для секвенирования Fab из бактериальных клонов (5'-3')

Ген	Последовательность
SeqpCBFab-HCF	TGAAATACCTGCTGCCGACC (SEQ ID NO: 174)
Seq-PelB-Rev	CAGCAGACCAGCGGCTGC (SEQ ID NO: 175)

Пример 5. Клонирование, секвенирование и очистка IgG

Fab-фрагменты антител, характеризующихся реактивностью к Ga, Gb RSV и CCD пептиду, выявленной у бактериальных клонов посредством ELISA, описанного в примере 4, клонировали и экспрессировали в виде IgG в клетках почки эмбриона человека (клетки 293-F). IgG в дальнейшем очищали и контролировали их качество путем определения концентрации, SDS-PAGE и с помощью гель-проникающей хроматографии.

A. Информация по клонированию и секвенированию IgG

Fab-фрагменты антител, выявленные у бактериальных клонов посредством ELISA (описан в примере 4), в дальнейшем превращали в IgG путем клонирования вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи (каппа и лямбда) с помощью рестрикционного расщепления в векторы экспрессии pCP9-каппа (SEQ ID NO: 176) и pCP9-лямбда (SEQ ID NO: 177). Учитывая возможность перекрестной реакции между праймерами (упомянутыми в примере 4), первичные аминокислоты из FR1 и конечные аминокислоты из участка стыка для каждого бактериального клона, выбранные для превращения в IgG, часто отличаются от таковых соответствующих им в последовательности зародышевого типа. По этой причине сконструировали праймеры, являющиеся специфичными для каждого антитела, чтобы восстановить участки FR1 и стыка для генов как тяжелой, так и легкой цепи у каждого выбранного бактериального клона. Тяжелую и легкую цепи амплифицировали с использованием соответствующего бактериального клона (экспрессировавшегося с вектора pCB-Fab в примере 4) и клонировали в последовательном порядке в вектор экспрессии pCP9.

Результатом амплификации тяжелой цепи был фрагмент со средним размером 370 п.о., который разделяли в 1% агарозном геле и экстрагировали из геля согласно протоколам производителя (Qiagen). Фрагмент тяжелой цепи затем использовали для присоединения лидерной последовательности HAVT2 0 (5'-ATGGCCTGCCCTGGCTTTCTCTGGGCACTTGTGATCTCCACCTGTCTTGAATTTTCCATGGCT-3'; MACPGFLWALVISTCLEFSMA) посредством ПЦР с перекрывающимися праймерами.

Соответствующий продукт перекрывания HAVT20-тяжелая цепь в дальнейшем очищали посредством ПЦР согласно протоколам производителя (Qiagen). Лигирования проводили последовательно; то есть, либо сперва легкую цепь расщепляли и лигировали, либо расщепляли и встраивали соответствующую тяжелую цепь. Как только посредством секвенирования подтверждали встраивание либо легкой, либо тяжелой цепи, отбирали репрезентативный бактериальный клон, выделяли и использовали минипреп для клонирования второй цепь (т.е. либо легкой, либо тяжелой цепи, в зависимости от того какую клонировали в первую очередь). Для клонирования фрагмента тяжелой цепи вектор pCP9 и очищенный

продукт ПЦР с перекрывающимися праймерами в виде тяжелой цепи расщепляли рестрикционными ферментами BamHI HF (NEB, № по кат. R3136L) и XhoI (NEB, № по кат. R0146L). Расщепленный вектор pCP9 и продукт перекрывания в виде тяжелой цепи были разделяли в 1% агарозном геле и экстрагировали из геля (более ~9,5 т.п.о для вектора pCP9). Реакции лигирования проводили при соотношении вектор-вставка 1:3 и продукты реакции трансформировали в клетки DH5a Max Efficiency (Invitrogen Corp., № по кат. 18258-012). После подтверждения последовательности клонировали вторую цепь (например, легкую цепи). Для клонирования фрагмента легкой цепи клоны pCP9, содержащие соответствующие продукты в виде тяжелой и легкой цепи, полученные в результате ПЦР, расщепляли с помощью NotI HF (NEB, № по кат. R3189L) и XbaI (NEB, № по кат. R0145L. Легкую цепь затем лигировали в вектор pCP9 с ее лидерной последовательностью HAVT20 через сайт для XbaI и NotI с сохранением рамки считывания. Субклонирование проводили с использованием клона, содержащего соответствующие гены тяжелой цепи. Затем продуктами лигирования трансформировали клетки DH5a Max Efficiency. Несколько колоний отбирали для секвенирования и анализа (в табл. 11 и 12 представлены последовательности тяжелой и легкой цепей антител соответственно с примечанием для каркасного участка и участка CDR участки).

Таблица 11. Аминокислотные последовательности вариабельных участков тяжелой цепи (SEQ ID NO:)

Клон	VH Зародышевая линия	CDR1	CDR2	CDR3
CB017.3L	IGHV3-33	VYAIH (1)	VIWHDGSNKYYADSVKG (2)	DPIVGSKTDGMDV (3)
CB017.5L	IGHV3-33	VYAMH (7)	IIWYDGSNKYYADSVKG (8)	DPIVGHTRDGLDV (9)
CB028.1	IGHV1-18	SYGIS (13)	WISTHIGTTNYAQKLQG (14)	DLAKWYCSGDTCFCSGGRCYSDH (15)
CB030.1	IGHV1-69	TFAIN (19)	GVIPGFDSANYAQKFQG (20)	NSGYCSGDSCAPN (21)
CB047.1	IGHV3-23	NYAMS (25)	DISGSGNSTNFADSVKG (26)	FRVPTYCVNGICYQGLPGFDI (27)
CB047.2	IGHV3-23	NYAMS (31)	DISSSGKTTNSADSVKG (32)	FRVPTYCVNGICYQGLPGFDI (33)
CB065.1	IGHV3-30	NYGMH (37)	IISYDESTTLYADSVKG (38)	DHFDPSGYFWYFDL (39)
CB071.1L	IGHV1-69	RYVIT (43)	GSIPIIDTSTYAQKFQD (44)	VFFFSNSSGPPTEGPAFDV (45)
CB072.1L	IGHV4-39	SNIHYWA (49)	YMFYGGVAFYNPSLKS (50)	VLVASTNWFDP (51)
CB073.1L	IGHV3-30-3	NYAVH (55)	VISHDGVNKDYADSVKG (56)	DRSYYFGGSVFHLYFDY (57)
CB076.2L	IGHV1-69	NYVVS (61)	GIIPMFGTTNYAQRFQG (62)	DRYYEVRAGGKVLNTYYYMDV (63)
CB079.1	IGHV3-64	SYSFH (67)	SVSADGGSTYYADSVRG (68)	QPSLLWFGDLRS (69)

Таблица 12. Аминокислотные последовательности вариабельных участков легкой цепи (SEQ ID NO:)

Клон	VK/VL Зародышевая линия	CDR1	CDR2	CDR3
CB017.3L	IGLV3-25	SGDALADQYAY (4)	KDNERPS (5)	QSVDSSGTY (6)
CB017.5L	IGLV3-25	SGDAMAEQYTY (10)	KDTERPS (11)	QSTDSSGTS (12)
CB028.1	IGKV1D-39	RASQSINDCLN (16)	AASNLQS (17)	QQSFSTP (18)
CB030.1	IGKV2D-28	RSSQSLVHSNGYSYLD (22)	LGSNRPS (23)	MQNLQT (24)
CB047.1	IGKV1D-33	QASQDISDYLN (28)	DASNLET (29)	QHYHNLP (30)
CB047.2	IGKV1D-33	QASQDISDYLN (34)	DASNLET (35)	QHYHNLP (36)
CB065.1	GKV2-29	KSSQSLLQRDGKTYLY (40)	EVSSRFS (41)	MQGIRLP (42)
CB071.1L	IGLV3-1	SGHELGDKYVS (46)	QDTNRPA (47)	QAWDNSH (48)
CB072.1L	IGLV3-21	GGDNIGTKGVH (52)	YNSDRPT (53)	HVWDSSGSDHV (54)
CB073.1L	IGLV1-40	TGSSSNIGAGHDVH (58)	ANTNRPS (59)	QSHDSSLSG (60)
CB076.2L	IGLV3-19	QGDSLRSYYTN (64)	EDNRPS (65)	NSRDSSGNL (66)
CB079.1	IGKV2D-28	RSSQSLLHSNGYNYLD (70)	LSSNRAS (71)	MQSLQT (72)

B. Экспрессия и очистка IgG

Для экспрессии каждого IgG получали миди-препы плазмидной ДНК (Qiagen) из векторов pCP9, содержащих представляющие интерес гены как тяжелой, так и легкой цепи, и их использовали для трансфицирования клеток 293-F, применяя 293fectin согласно протоколам производителя (Invitrogen, № № 51-0031).

Продолжительность трансфекций составляла 72 ч, чтобы обеспечить достаточное продуцирование IgG. Через 72-часовой трансфекции культуральную среду собирали и центрифугировали для удаления клеток. Очистку проводили с помощью колоночной хроматографии, используя колонку с белком A (гранулы сефарозы с белком A; Amersham, № по кат. 17-0963-03). Элюат дважды подвергали диализу против 4 л, содержащих 20 мМ Tris-HCl pH7,2, 150 мМ NaCl. В заключение, диализированные образцы концентрировали до приблизительно 1 мл с помощью 10 кДа-колонки Amicon Ultra (Millipore).

Серии стадий проведения контроля качества проводили для каждого IgG для определения концентрации и чистоты, а также определения размера. Исходно концентрацию IgG определяли посредством

считывания показаний на NanoDrop, используя молярный коэффициент экстинкции для IgG с 210000 M^{-1} $см^{-1}$. Кроме того, концентрацию IgG подтверждали с помощью BCA анализа (Thermo Fisher) согласно протоколам производителя, и путем измерений с помощью сенсорных наконечников с иммобилизованным белком A на Octet Red384 (ForteBio). В качестве дополнительной стадии контроля качества проводили SDS-PAGE при невосстанавливающих и восстанавливающих условиях (т.е., ±DTT) с последующим окрашиванием Bio-Safe Coomassie (Biorad) для визуального контроля на присутствие интактного IgG или уменьшения полипептидов тяжелых и легких цепей. И наконец, качество IgG контролировали с использованием гель-проникающей хроматографии на колонке для гель-фильтрации Superdex 200 10/300 GL (Pharmacia).

Пример 6. Анализ связывания с IgG

Получали IgG и контролировали их количество, как описано выше в примере 5, и антитело CR9514 к G RSV (содержащие вариабельные участки 3D3) тестировали в анализах ELISA в отношении их способности связываться с рекомбинантными Ga- и Gb-белками RSV. Вкратце, 96-луночные планшеты с половинным объемом лунки для ELISA (Costar) покрывали 50 мкл антигена в 1X PBS в течение ночи [RSV Ga: 0,5 мг/мл; RSV Gb: 0,5 мг/мл; бычьего актина: 1 мг/мл (Sigma); козье антитело к $F(ab)_2$-фрагменту человека, очищенное аффинной хроматографией: 2 мг/мл (Jackson Immunoresearch). Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C и блокировали на следующий день с помощью 135 мкл 4% обезжиренного сухого молока (NFDM, Biorad) в PBS и инкубировали на протяжении 2 ч при 37°C. Затем mAb разбавляли в 0,4% NFDM/PBS/0,05% Tween20, начиная со 100 нг/мл, и титровали с уменьшением концентрации в 5-кратных разведениях и добавляли в планшеты, инкубируя в течение 2 ч при 37°C. MAb CR9514 (3D3) использовали в качестве позитивного контроля к Ga и Gb RSV и титровали аналогичным образом. Дополнительно использовали мышиное антитело к актину (Sigma, № по кат. A3853) при 1,25 мг/мл в качестве позитивного контроля для планшетов, покрытых бычьим актином. После инкубации планшеты четыре раза промывали с помощью PBS/0,05% Tween20. Каждое вторичное антитело вносили при 1:1000 в 0,4% NFDM/PBS/0, 05% Tween20 и инкубировали в течение 40 мин при 37°C. Антитело к Fc HRP (Jackson Labs, № по кат. 109-035-008) использовали в качестве вторичного антитела к mAb. И наконец, козье антитело к мышиному иммуноглобулину, конъюгированному с пероксидазой хрена (Jackson Labs, № по кат. 115-035-072), использовали для актинового позитивного контроля. После инкубации планшеты промывали четыре раза в PBS/0,05% Tween20 и проявляли 50 мкл 1:1 объем/объем TMB:раствора пероксида (Pierce, № по кат. 34021) на протяжении примерно 5 мин. Реакцию сразу же останавливали 50 мкл 2N H_2SO_4 и измеряли поглощение при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Расчетные значения EC_{50} для связывания (определяется по титрованию каждого IgG) mAb в соответствии с настоящим изобретением варьировали в диапазоне от 1,0 до 2,0 нг/мл. На фиг. 1 приведены профили связывания для Ga и Gb RSV с антителами CB017.5L и CB030.1 соответственно.

Пример 7. Анализ нейтрализации с IgG

Антитела к RSV анализировали в отношении их способности связывать и нейтрализовать RSV в растворе, что оценивали посредством анализа подавления бляшкообразования. В данном эксперименте вирус и антитела предварительно инкубировали в отсутствие клеток-мишеней. Затем смесь добавлялась к клеткам и вирусную инфекцию измеряли посредством стандартного анализа подавления бляшкообразования, описанного в данном документе. Антитела к RSV анализировали в отношение их способности нейтрализовать несколько штаммов RSV, в том числе RSV A/A2 (ATCC № по кат. VR-1540), RSV B/18537 (ATCC № по кат. VR-1580) и RSV A/Long (ATCC № по кат. VR-26). Антитела CR9514 (3D3) и CR9505 (антитело на основе 131-2G, т.е. содержащее вариабельный участок тяжелой и легкой цепей из 131-2G, как раскрывается в WO 2009/055711) использовали в качестве референтных.

Клетки Vero (ATCC, № по кат. CCL-81; Манассас, Вайоминг) использовали клеток-хозяев для инфицирования. Клетки Vero выращивали в DMEM (HyClone, № по кат. SH 30285.01) с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (HyClone, № по кат. SH30070.03), дополненной 1% L-глутамином (HyClone, № SH30034.01) и 1% раствором пенициллина со стрептомицином (HyClone, № по кат. SV30010). Клетки Vero поддерживали при 37°C в термостате с 5% CO_2, и пассажировали их дважды в неделю.

В день 1 эксперимента клетки Vero культивировали в 24-луночных планшетах для культуры клеток. Клетки высевали при плотности (примерно 9×10^4 клетки на лунку), что позволило сформировать клеточный монослой (конфлюентность >80%) ко 2 дню. В день 2 каждое антитело серийно разводили в простой минимальной поддерживающей среде Игла без добавок (EMEM, ATCC, № по кат. 30-2003), которая содержала 10% кроличьей сыворотки (AbD Serotec, № по кат. C12CAX). Конечные концентрации тестируемых антител составляли: 10 мг/мл, 1,3 мг/мл, 156 нг/мл, 19,5 нг/мл, 2,4 нг/мл и 0,3 нг/мл (за исключением CB010.7, которое использовали в следующих концентрациях: 2,5 мг/мл, 312,5, 39,1, 4,9, 0,61 и 0,08 нг/мл). Вирус также разбавляли в EMEM без добавок до концентрации 2000-3000 БОЕ/мл (100-150 БОЕ/50 мкл) и 85 мкл разведенного RSV добавляли к 85 мкл раствора каждого разведенного антитела и перемешивали пипетированием. Для контрольного образца вируса добавляли 85 мкл разведенного вируса добавляли к 85 мкл EMEM без добавок. Смеси антитело-вирус или вирус-контроль инкубировали при 37°C на протяжении 2 ч. После инкубации культуральную среду сливали из 24-луночных планшетов для

культивирования клеток, содержащих клетки-хозяева Vero и 150 мкл предварительно инкубированной смеси вирус-антитело или смеси вирус-контроль вносили затем в каждую лунку. Каждый тестовый и контрольный образец готовили в трех повторах. Затем клетки инкубировали при 37°C на протяжении часа, перемешивая каждые 15 мин.

После периода инкубирования в каждую лунку добавляли 1 мл покрывающей среды (покрывающая среда содержала EMEM, 2% FBS, 1% L-глутамина, 0,75% метилцелюллозы). 24-Луночные планшеты для культивирования клеток инкубировали при 37°C (с 5% CO_2) на протяжении 96-120 ч. Клеточные планшеты фиксировали с помощью 10% формалином на протяжении 1 часа при комнатной температуре, промывали 10 раз бидистиллированной H_2O и блокировали с помощью 5% обезжиренного молока (NFDM) в PBS при 37°C на протяжении часа. После инкубирования блокирующий раствор сливали и в каждую лунку добавляли 200 мкл конъюгированого с пероксидазой хрена мышиного антитела к RSV (ab20686, Abcam, разведение 1:750 в 1% NFDM). Планшеты инкубировали при 37°C на протяжении 2 ч и промывали 10 раз бидистиллированной H_2O. После промывания в каждую лунку добавляли 200 мкл субстрата TrueBlue® для пероксидазы (KPL № кат. 50-78-02). Планшеты проявляли в течение 10 мин при комнатной температуре. Планшеты дважды промывали бидистиллированной H_2O и высушивали на бумажном полотенце и подсчитывали число голубых бляшек. IC_{50} (эффективное разведение для 50% нейтрализации бляшкообразования) рассчитывали с использованием SPSS для Windows. Уровень подавления бляшкообразования рассчитывали по следующей формуле: Уровень подавления бляшкообразования (в процентах)=1-[(среднее количество бляшек в каждом разведении антитела)/(среднее количество бляшек в лунках с вирус-контролем)]×100. В табл. 13 перечислены IC_{50} (нг/мл) для каждого антитела со штаммами A/A2 RSV (ATCC № по кат. VR-1540) и RSV B/18537 (ATCC № по кат. VR-1580). Значения IC_{50}, представленные в табл. 13, для анализов нейтрализации вируса, определяли с использованием SPSS. На фиг. 2 показаны профили нейтрализации вируса для антител антител CB017.5L и CB030.1, соответственно, при тестировании с A2 и B-18537 RSV. IC_{50} (эффективное разведение для 50% нейтрализации бляшкообразования) антител и антигенсвязывающих фрагментов к штамму A/A2 RSV (ATCC № по кат. VR-1540) было ниже 40 нг/мл и/или IC_{50} для штамма B/18537 RSV (ATCC № по кат. VR-1589) было ниже 30 нг/мл.

Дополнительно, IC_{50} для антител CB017.5, CB030.1 и контрольных антител CR9505 (131-2G) и CR9514 (3D3) для штамма A/Long RSV (ATCC № VR-26) составляли 3,5, 37, 18 и 17 нг/мл соответственно.

Таблица 13. Результаты анализа нейтрализации для mAb с наивысшей специфичностью к G-белку RSV

	RSV A	RSV B
Штамм	A/A2	B/18537
Анализ	Нейтрализация	Нейтрализация
	IC50 (нг/мл)	IC50 (нг/мл)
CR9514 (3D3)	40,7	33,0
CB017.3L	4,2	2,0
CB017.5L	15,2	3,8
CB028.1	12,1	16,3
CB030.1	35,6	18,3
CB047.1	19,4	4,7
CB047.2	15,6	8,9
CB065.1	25,4	5,1
CB071.1L	9,0	5,4
CB072.1L	15,8	2,7
CB073.1L	17,6	2,9
CB076.2L	25,1	5,6
CB079.1	21,8	4,4

Пример 8. Конструирование молекул полностью человеческих иммуноглобулинов (человеческие моноклональные антитела), включая оптимизацию кодонов и анализ рисков возникновения мутаций

Вариабельные участки тяжелой и легкой цепи (VH и VL) для каждого клона антител, выделенных в примере 5 выше, исследовали на присутствие свободных остатков цистеина и сайтов потенциальных пост-трансляционных модификаций, включая сайты гликозилирования, дезамидирования и окисления. Для удаления этих сайтов использовали мутации в аминокислотах, включающие структурно консервативные замены и/или замены в зародышевой линии (табл. 14). Неконсервативные цистеины в вариабельных участках мутировали в серин. Для сайтов гликозилирования можно использовать несколько мутаций, включая замену аспарагина на консервативный глютамин или мутации в зародышевой линии. Модификации в сайтах дезамидирования включают замену аспарагиновой кислоты на аспарагин и серина

или аланина на глицин. Сайты потенциального окисления не подвергали модификации. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности получали из каждого VH и VL клона антитела, и оптимизировали их кодоны для экспрессии в клетках человека в GeneArt/Invitrogen. Вариабельные участки этих функциональных вариантов в дальнейшем непосредственно клонировали путем расщепления рестриктазами для экспрессии в векторах, экспрессирующих IgG, pCP9-каппа (See SEQ ID: 143) и pCP9-гамма (смотри SEQ ID: 144). BamHI, XhoI и/или SrfI использовали для клонирования вариабельных участков тяжелых цепей и NotI и AscI использовали для клонирования вариабельных участков легких цепей. Нуклеотидные последовательности для всех конструкций проверяли согласно стандартным методикам, известным специалистам в данной области.

Таблица 14. Анализ рисков возникновения мутаций в моноклональных антителах, специфичных к G-белку RSV

Идентификация IgG	Вариабельный участок, цепь	Мутация	Причина
CB017.3L	Нет данных	Нет данных	Нет данных
CB017.5L	Нет данных	Нет данных	Нет данных
CB028.1	Тяжелая цепь Легкая цепь	C105S C110S C112S C117S C32S	Свободный цистеин Свободный цистеин
CB030.1	Тяжелая цепь Легкая цепь Легкая цепь Легкая цепь	C103S C108S N33D G34A G34S	Свободный цистеин Дезаминирование Дезаминирование Дезаминирование
CB047.1	Тяжелая цепь Тяжелая цепь Тяжелая цепь Тяжелая цепь Тяжелая цепь Тяжелая цепь	N56G N56Q C105S C110S N107D G108A G108S	Гликозилирование Гликозилирование Свободный цистеин Дезаминирование Дезаминирование Дезаминирование
CB047.2	Тяжелая цепь Тяжелая цепь Тяжелая цепь Тяжелая цепь Тяжелая цепь Тяжелая цепь	N28T N28Q C105S C110S N107D G108A G108S	Гликозилирование Гликозилирование Свободный цистеин Дезаминирование Дезаминирование Дезаминирование
CB065.1	Нет данных	Нет данных	Нет данных
CB071.1L	Тяжелый	N104Q	Гликозилирование
CB072.1L	Нет данных	Нет данных	Нет данных
CB073.1L	Нет данных	Нет данных	Нет данных
CB076.2L	Нет данных	Нет данных	Нет данных
CB079.1	Легкая цепь Легкая цепь Легкая цепь	N33D G34A G34S	Дезаминирование Дезаминирование Дезаминирование

Пример 9. Исследования связывания пептида с помощью ELISA и Octet

Подробное эпитопное картирование проводили для ряда mAb, специфичных к G-белку RSV, описанных выше под названием CB017.5 и CB030.1. Пептиды синтезировали с помощью химического состава на основе Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил), и очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (HPLC). Для исследования пептид-пептидных взаимодействий некоторые пептиды подвергали биотинилированию по N-концу посредством спейсера на основе аминогексановой кислоты (Ahx). Пептиды анализировали в отношении идентичности с помощью масс-спектрометрии с электрораспылением. Образцы анализировали с помощью сверхвысокоэффективной

жидкостной хроматографии (UPLC, Alliance, Waters, Милфорд, Массачусетс, США) с колонкой C18 для хроматографии обращенной фазой, и детектирование проводили с помощью диодно-матричного детектора и массочувствительного детектора. Использовали градиент, составлявший 25%/мин, для 25-100% ацетонитрила (ACN) с растворителем A (H_2O+0,05% трифторуксусной кислоты [ТФУ]) и с растворителем B (ACN+0,05% TFA). Все растворители были со степенью очистки, по меньшей мере, для HPLC.

Тестировали mAb в отношении связывания с биотинилированными пептидами, которые содержат центральный консервативный участок RSV-G типа A и B (табл. 15). Покрытые авидином титрационные 96-луночные планшеты промывали и инкубировали с помощью 100 мкл биотинилированного пептида (2,37×10-7 M) в буфере для ELISA (PBS+1% FBS+0,05% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем после промывки вносили в лунки по 180 мкл блокирующего буфера (PBS+10% FBS) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. В дальнейшем планшеты промывали и инкубировали с антителом к иммуноглобулину человеку, конъюгированным с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания в каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата о-фенилендиамина для пероксидазы хрена (Thermo Scientific). Реакцию останавливали через 10 мин с помощью 100 мкл 1 M H_2SO_4. Поглощение считывали при 490 нм.

Таблица 15. Пептиды RSV-G, используемые для изучения связывания антител

Тип A, центральный участок	
Sym-1705	биотин-$_{145}$KQRQNKPPNKPNNDFHFEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKTTTKPTKK$_{201}$ (SEQ ID NO:178)
Sym-1706	биотин-$_{145}$KQRQNKPPNKPNNDFHFEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKR$_{184}$ (SEQ ID NO: 173)

Тип B, центральный участок	
Sym-1788	биотин-$_{145}$KPRPKSPPKKPKDDYHFEVFNFVPCSICGNNQLCKSICKTIPSNKPKKKPTIKPTNK$_{201}$ (SEQ ID NO:179)
Sym-1789	биотин-$_{145}$KPRPKSPPKKPKDDYHFEVFNFVPCSICGNNQLCKSICKT$_{184}$ (SEQ ID NO:180)

Примечание: подчеркнутые остатки относятся к негликозилированному центральному консервативному домену Все mAb, описанные выше, связываются с Ga- и Gb-белками RSV (пример 6) и с центральным участком пептидов типа A и типа B (данные не показаны). Титрирование антител CB017.5 и CB030.1 показало, что эти mAb имеют IC_{50} ~20 нг/мл для всех четырех пептидов (фиг. 3). Только mAb CB017.5 характеризовался более низким максимум сигнала с усеченными пептидами (Sym-1706 и Sym-1789), указывая на то, часть эпитопа для mAb CB017.5 представляет собой участок с цистеиновой петлей на C-конце.

Связывание mAb с пептидами из G RSV также определяли с использованием покрытых стрептавидином биосенсоров на Octet Red 384 (ForteBio). И снова, mAb показали перекрестную реактивность в отношении пептидов как типа A, так и типа B (табл. 16). CB030.1 показало незначительное более высокую степень связывания с типом B по сравнению с пептидами типа A. В противоположность этому, CB017.5 демонстрировали повышенный на пептид типа A и отсутствие ответа с более короткими пептидами, усеченными с C-конца, в соответствии с результатами ELISA.

Таблица 16. Связывание mAb, специфичных к G RSV, с пептидам RSV-G (октет) [RU]

Пептид	CB017.5	CB030.1
Sym-1705	3,17	0,47
Sym-1706	-0,02	0,53
Sym-1788	2,30	0,73
Sym-1789	0,05	1,36

RU: единицы ответа

Пример 10. Картирование минимальных эпитопов (PepScan)

С целью картирования минимального эпитопа, распознаваемого mAb, тестировали реакционность в отношении пептидов разной длины (5, 8, 10, 14, 18, 25, или 32-мерные), соответствующих центральному участку RSV-G типа A и B (остатки 145-201), используя анализ PepScan. Связывание антител с пептидами оценивали в ELISA на основе PepScan. Каждое mAb титровали с тем, чтобы удостовериться в достижении оптимального связывания, и что неспецифическое связывание было устранено. Каждый из полипропиленовых планшетов размером с кредитную карту содержали ковалентно связанные пептиды, которые инкубировали в течение ночи при 4°C с mAb, от 1 до 10 нг/мл в PBS, содержащем 5% лошадиной сыворотки (объем/объем), 5% OVA (мас./об.) и 1% (об./об.) Tween 80 или в альтернативном блокирующем буфере PBS, содержащем 4% лошадиной сыворотки (об./об.) и 1% (об./об.) Tween 80. После промывки планшеты инкубировали с кроличьим антителом к mAb, конъюгированным с пероксидазой хрена (DakoCytomation) в течение 1 ч при 25°C. После дополнительной промывки активность пероксидазы оценивали с помощью субстрата ABTS и количественно оценивали проявление цвета, используя камеру на базе прибора с зарядовой связью и систему обработки изображений.

С помощью данного анализа выявили минимальный пептид, который связывается с антителом, со-

ответствуя энергичному ядру эпитопа, и пептид с наивысшей степенью связывания, содержащий дополнительные прилегающие остатки, которые также способствуют связыванию, и содержит полный эпитоп. Реактивность антител по отношению к пептидам изложена в табл. 17 (остатки изображены в виде заглавных букв).

Пример 11. Аланиновое сканирование (PepScan)

Тестировали набор пептидов, у которых каждое положение заменяли остатком аланин (фиг. 5). Боковые цепи критических для связывания четырех mAb изложены в табл. 17 (выделенные черным жирным шрифтом).

Пример 12. Связывание с вариантными пептидами (PepScan)

Далее антитела тестировали с панелью из 31 пептида, которые охватывают полное разнообразие центрального домена RSV-G, как это представлено в базе GenBank на 1 января 2012 г. Как показано на фиг. 6, распознаются практически все встречающиеся в природе вариантные пептиды типа A и B. CB030.1 демонстрирует более низкую степень связывания с пептидами типа A, чем типа B. CB017.5 в равной степени хорошо связывается с пептидами как типа A, так и типа B. CB017.5-связывание является чувствительным к мутациям в положениях 190 и 192 в случае с вариантами типа A и к мутации Pro90Leu в случае с вариантами типа B. Мутации в Ser170Cys являются критическими. Мутация Gln175Arg являлась критической для CB030.1-связывания, и двойная мутация Ile181Phe; Ile184Ala также являлась критической для CB030.1-связывания. Встречающиеся в природе варианты, которые являются критическими для связывания четырьмя антителами, изложены в табл. 17 (обозначены подчеркиванием).

Таблица 27. Эпитопное картирование с использованием моноклональных антител, специфичных к G-белку RSV (PepScan)

mAb	Тип	Критические остатки в центральном консервативном домене	Эпитоп
	RSV-A	DFHFEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGK	
	RSV-B	DYHFEVFNFVPCSICGNNQLCKSICKTIPSNKPKK	
3D3	RSV-A	-FHFEVFNFVPcs-c--n--c-aick-i----p--	I
	RSV-B	-YHFEVFNF*VPc*s-c-----c--ic----------	
CB017.3L	RSV-A	---FEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGK	III
	RSV-B	---FEVFNFVPCSICGNNQLCKSICKTIPSNKPKK	
CB017.5 CB028.1	RSV-A RSV-B RSV-A	---FEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGK ---FEVFNFVPCSICGNNQLCKSICKTIPSNKPKK ----------NPTCWAICKRIPNK----	III
	RSV-B	---FEVFNFVPCSICGNNQLCKSICKTIPS-----	
CB030.1	RSV-A	---FEVFNFVPCS*ICSNNPTCWAICK*---------	III
	RSV-B	----EVFNFVPCS*ICGNNQLCK*----------	
CB047.1	RSV-A	---FEVFNFVPCSICSNNPT*CWAICK*---------	III
	RSV-B	----EVFNFVPCSICGNNQLCK*SICK*---------	

CB047.2	RSV-A	---FEVFNFVPCSICSNNPT*CWAICK*---------	III
	RSV-B	----EVFNFVPCSICGNNQLCK*SICK*---------	
CB071.1L	RSV-A	---FEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGK	III
	RSV-B	---FEVFNFVPCSICGNNQLCKSICKTIPSNKPKK	
CB072.1L	RSV-A	----e---FVPCSICSNNPTCWAICK---n--p--	III
	RSV-B	----------VPCSICGNNQLCKSIC---p------	
CB073.1L	RSV-A	---FEVFN-v----c-n------i-k---------	III
	RSV-B	---*FEVFN*FVPCSICGNNQLCKSICKTIPS-----	
CB079.1	RSV-A	*DFH*FEVFN*FVPc*-ic-nn--c-aic----------	III
	RSV-B	---FEVFN*FVPCSICGNNQLCKSICKTIPS*-----	

Пояснение: ЗАГЛАВНЫЕ БУКВЫ=минимальный эпитоп (наиболее короткий реактивный пептид), ЗАГЛАВНЫЕ БУКВЫ КУРСИВОМ=дополнительные остатки которые способствуют связыванию, BOLD WHITE=критические остатки, идентифицированные с помощью анализа полных замен, буквы жирным шрифтом черного цвета=(дополнительные) критические остатки, идентифицированные с использованием аланинового сканирования, подчеркивание=(дополнительные) критические остатки, идентифицированные с использованием доступных центральных участков вариантных пептидов.

Пример 13. Профилактическая эффективность mAb к G-белку

Чтобы определить, проявляет ли mAb к G-белку профилактическую эффективность in vivo, mAb CB017.5L и CB030.1 тестировали на модели хлопкового хомяка с заражением штаммом RSV-A/Long. За 24 ч до заражения инбредным самцам хлопкового хомяка, серонегативным по парамиксовирусам, возрастом 6-8 недель, с диапазоном массы 60-80 г в день 1, вводили внутримышечно 5 мг/кг CB017.5L,

CB030.1, Synagis® или среду-носитель (n=5 в группе) в верхнюю часть задней конечности. В день 0 хлопковых хомяков заражали $10^{5,4}$ БОЕ штамма RSV-A/Long путем интраназальной инстилляции 100 мкл (50 мкл в каждую ноздрю). Через 96 ч животных умерщвляли для отбора легких и носовых раковин: язычковый сегмент доли легкого использовали для выделения общей РНК для определения нагрузки общей вирусной РНК с использованием кПЦР, остальные легкие и носовые раковины использовали для определения инфекционную вирусной нагрузки с помощью теста БОЕ. Образцы крови отбирали в день 0 перед заражением (24 ч после введения mAb), и при завершении исследования (на 96 день или 6 день после заражения), чтобы эффективность дозирования. MAb к G уменьшают в легких и носовых раковинах инфекционные титры вируса и нагрузку вирусной РНК в по сравнению со средой-носителем (фиг. 7). Инфекционные титры вируса в легких (log_{10} БОЕ/г) снижались до 1,694 и 1,820 log_{10} при использовании антител CB017.5 и CB030.1, соответственно, тогда как результатом профилактической обработки с использованием CR9514 (3D3) было уменьшение до 0,801 log_{10}.

Пример 14. Терапевтическая эффективность mAb к G

Для определения, проявляет ли mAb к G in vivo терапевтическую эффективность, mAb CB017.5L и CB030.1 тестировали на модели хлопкового хомяка с заражением штаммом RSV-A/Long. В день 0 инбредных самцов хлопкового хомяка, серонегативных по парамиксовирусам, возрастом 6-8 недель, с диапазоном массы 60-80 г в день 1, заражали $10^{6,1}$ БОЕ штамма RSV-A/Long путем интраназальной инстилляции 100 мкл (50 мкл в каждую ноздрю). Через 1 день после заражения посредством внутрисердечной инъекции вводили 50 мг/кг CB017.5L, CB030.1, Synagis® (n=14 на группу) или среды-носителя (n=23 на группу). В день 4 отбирали в случайном порядке 5 животных в группе, умерщвляли для отбора легких и носовых раковин: язычковый сегмент доли легкого использовали для выделения общей РНК для определения нагрузки общей вирусной РНК с использованием кПЦР, остальные легкие и носовые раковины использовали для определения инфекционную вирусной нагрузки с помощью теста БОЕ. В день 6 всех оставшихся животных (n=9 или 18 в группе) умерщвляли для отбора легких для гистопатологического исследования легких. Образцы крови отбирали во 2 день после заражения (24 ч после введения mAb), и при завершении исследования (в день 4 или день 6 после заражения), чтобы подтвердить эффективность дозирования. MAb к G уменьшают в легких и носовых раковинах инфекционные титры вируса, но не нагрузку вирусной РНК в легких по сравнению со средой-носителем (фиг. 8). Инфекционные титры вируса в легких (log_{10} БОЕ/г) снижались до 2,356 и 2,477 log_{10} при использовании антител CB003.1 и CB010.7, соответственно, тогда как результатом терапевтической обработки с использованием CR9514 (3D3) было уменьшение лишь до 1,369 log_{10}. Кроме того, новые mAb к G снижали баллы гистопатологической оценки перибронхиолита, периваскулита, интерстициальной пневмонии и альвеолита (фиг. 9), тогда как CR9514 (3D3) снижало баллы лишь в отношении интерстициальной пневмонии.

Последовательности

>CB017.3L VH - SEQ ID NO: 73

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCEASGFMFSVYAIHWVRQAPGKGLEWVAVIWHDGSNK
YYADSVKGRFTISRDNSKDTMYLQMKTLRVDDTAVYYCARDPIVGSKTDGMDVWGQGTTVTVS
S

>CB017.3L VL - SEQ ID NO: 74

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALADQYAYWYQQKPGQAPVMVIFKDNERPSGIP
ERFSGSSSGTTVTLTVSGVQSEDEADYYCQSVDSSGTYWMFGGGTKLTVL

>CB017.5L VH - SEQ ID NO: 75

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSVYAMHWVRQAPGQGLEWVAIIWYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDNSKETLYLQMNSLRVEDTAVYYCARDPIVGHTRDGLDVWGQGTTVTVS
S

>CB017.5L VL - SEQ ID NO: 76

SYELTQPPSVSVSPGQTARVTCSGDAMAEQYTYWYQQKPGQAPVLIIFKDTERPSGIP
ERFSGSSSGTTVTLTISGVQTEDEADYYCQSTDSSGTSWVFGGGTKLTVL

>CB028.1 VH - SEQ ID NO: 77

QVQLVQSGAEVKKPGASVQVSCKTSGYTFSSYGISWVRQAPGQGPEWMGWISTHIGTT
NYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLAKWYCSGDTCFCSGGRCYSDH
WGQGTLVTVSS

>CB028.1 VK - SEQ ID NO: 78

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINDCLNWYQQKPGQAPKLLISAASNLQSGV
PSRFSGSGSETDFTLTISSLQPEDFAAYYCQQSFSTPLTFGGGTKVEIK

>CB030.1 VH - SEQ ID NO: 79

QVQLVQSGAEMKRPGSSVKVSCKASGGTFSTFAINWVRQAPGQGFEWMGGVIPGFDSA
NYAQKFQGRLTMSADESTSTVYMELSSLRSDDTAVYYCAGNSGYCSGDSCAPNWGPGTLVTVS
S

>CB030.1 VK - SEQ ID NO: 80

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGYSYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSN
RPSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCMQNLQTPTFGGGTKVEIK

>CB047.1 VH - SEQ ID NO: 81

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISGSGNST
NFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKFRVPTYCVNGICYQGLPGFDIWG
QGTMVTVSS

>CB047.1 VK - SEQ ID NO: 82

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISDYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGV
PSRFSASGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQHYHNLPPLFGGGTKVEIK

>CB047.2 VH - SEQ ID NO: 83

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISSSGKTT
NSADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMSSLRADDTAVYYCAKFRVPTYCVNGICYQGLPGFDIWG
QGTMVTVSS

>CB047.2 VK - SEQ ID NO: 84

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISDYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGV
PSRFSASGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQHYHNLPPLFGGGTKVEIK

>CB065.1 VH - SEQ ID NO: 85

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVTIISYDESTT
LYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCARDHFDPSGYFWYFDLWGRGTLVTV
SS

>CB065.1 VK - SEQ ID NO: 86

DIVMTQSPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLQRDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSS
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIRLPRTFGQGTKVEIK

>CB071.1L VH - SEQ ID NO: 87

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSRYVITWVRQAPGQGLEWMGGSIPIIDTS
TYAQKFQDRVTITADKSTSTVYLELSSLRPEDTAIYYCAKVFFFSNSSGPPTEGPAFDVWGQG
TMVTVSS

>CB071.1L VL - SEQ ID NO: 88

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHELGDKYVSWYQQKPGQSPVLLIYQDTNRPAGIP
ERFSGSNSGSTAFLTISATQAMDEADYYCQAWDNSHVVFGGGTKLTVL

>CB072.1L VH - SEQ ID NO: 89

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNIHYWAWIRQTPGKGLEWIGYMFYGGV
AFYNPSLKSRVAISVDTSKNQFSLRLTSASAADTAVYYCARVLVASTNWFDPWGQGTLVTVSS

>CB072.1L VL - SEQ ID NO: 90

SYVLTQPPSVSVAPGGTARITCGGDNIGTKGVHWYQQKPGQAPVLVMYYNSDRPTGVP
ERFSGSNSGNTATLTISRLEAGDEADYYCHVWDSSGSDHVEVFGGGTKLTVL

>CB073.1L VH - SEQ ID NO: 91

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFYNYAVHWVRQAPGKGLEWVAVISHDGVNK
DYADSVKGRITLSRDNSKNTVYLQLNSLRPEDTAVYYCARDRSYYFGGSVFHLYFDYWGQGTL
VTVSS

>CB073.1L VL - SEQ ID NO: 92

QSVLTQPPSVSGAPGQRVIISCTGSSSNIGAGHDVHWYQQLPGTAPRLLIYANTNRPS
GVPDRFSASKSGNSASLVITGLQAEDEADYFCQSHDSSLSGVLFGGGTKLTVL

>CB076.2L VH - SEQ ID NO: 93

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSNYVVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTT

NYAQRFQGRVTISADESTSTAYMEMSSLKSEDTAVYYCARDRYYEVRAGGKVLNTYYYMDVWG
KGTTVTVSS

>CB076.2L VL - SEQ ID NO: 94

SSELTQDPAVSVALGHTVRITCQGDSLRSYYTNWYQQKPGQAPVLVIFGEDNRPSGIP
DRFSGSSSGDTASLTITGTQAEDEADYYCNSRDSSGNLWVFGGGTKLTVL

>CB079.1 VH - SEQ ID NO: 95

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCSASGFVFTSYSFHWVRQAPGKGLEYVSSVSADGGST
YYADSVRGRFLISRDNSKNTLSLQMSSLRPDDTALYYCVPQPSLLWFGDLRSWGQGTLVTVSS

>CB079.1 VK - SEQ ID NO: 96

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLSSN
RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGIYYCMQSLQTLTFGQGTRLEIK

SEQ ID:176 (pCP9-каппа последовательность)

TACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG
ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACA
ATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCT
GAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAG
AATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTGGCCATTAGCCA
TATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATC
CATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGAT
TATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT
TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT
TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGC
GGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCC
ACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTC
GTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCC
ATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTAC
CGAGCTCGGATCCTTAATTAACTCGAGGCCCGAGCCCGGGCGAGCCCAGACACTGGACGCTGA
ACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACACCG
CGGTCACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA
CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG

GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCC
TGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCT
CTTCACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCC
CCAGGCTCTGGGCAGGCACGGGCTAGGTGCCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGG
TGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACC
CCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAAC
TCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC
AGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTG
CATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCACCC
TCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCTAGCGAATTC
ACCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCT
TTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGG
TGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC
GGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGC
GCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT
TGCCAGCGCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGC
TTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCAC
CTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACG
GTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGA
ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCC
TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGT
GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC

TCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA
GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA
CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGG
CCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGGATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGAT
GAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG
AGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCC
GGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTG
TGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG
ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC
GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC
GAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG
GGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCG
TCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTG
ATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCG
CTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCT
GGGGTTCGGTGCTACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAA
TCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG
CCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATT
TCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT
CTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
TTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG
CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTT
TTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGC
ATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTA
TATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA
ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAG

TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGAC
GCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATC
CAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGGCGCGCCAGAT
CTGCGGCCGCTAGGAAGAAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGC
TATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCG
CAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCTC
AGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT
CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
AGAGTGTTAGTTAACGGATCGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAG
CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC
TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCA
GCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGC
TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAA
AGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
CCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACG
CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
CGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA
CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTAT
CTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACA
AACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGG
ATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACG
TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAA
ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT
AATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC
GCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGA

GCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGC
TAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGT
GGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGT
TACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGT
CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA
GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAG
CAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTT
ACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTT
TACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAAT
AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA

SEQ ID: 177 pCP9-лямбда последовательность

TACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG
ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACA
ATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCT
GAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAG
AATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTGGCCATTAGCCA
TATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATC
CATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGAT
TATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT
TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT
TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGC
GGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCC
ACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTC
GTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCC
ATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTAC
CGAGCTCGGATCCTTAATTAACTCGAGGCCCGAGCCCGGGCGAGCCCAGACACTGGACGCTGA
ACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACACCG
CGGTCACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA
CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG

GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCC
TGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCT
CTTCACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCC
CCAGGCTCTGGGCAGGCACGGGCTAGGTGCCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGG
TGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACC
CCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAAC
TCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC
AGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTG
CATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCACCC
TCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCTAGCGAATTC
ACCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCT
TTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGG
TGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC
GGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGC
GCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT
TGCCAGCGCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGC
TTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCAC
CTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACG
GTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGA
ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCC
TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGT
GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC

TCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA
GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA
CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGG
CCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGGATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGAT
GAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG
AGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCC
GGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTG
TGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG
ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC
GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC
GAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG
GGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCG
TCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTG
ATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCG
CTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCT
GGGGTTCGGTGCTACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAA
TCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG
CCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATT
TCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT
CTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
TTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG
CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTT
TTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGC
ATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTA
TATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA
ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAG

TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGAC
GCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATC
CAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGGCGCGCCAGAT
CTGCGGCCGCTAGGAAGAAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGC
TATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCG
CAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCTC
AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGC
CAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG
GAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAA
CAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAG
CTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATG
TTCATAGAGTTAACGGATCGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGC
CTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGAC
CCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT
GAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA
AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAG
CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCT
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA
AAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTA
TAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCG
CTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC
TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCC
GTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT
GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATC
TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA
ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGA
TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGT
TAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAA
TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTA
ATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG
CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
CGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
AGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG
GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTT
ACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGA
AGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTC
ATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAG
TGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC
AGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTA
CCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTT
ACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATA
AGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, способное специфично связываться с G-белком респираторного синцитиального вируса человека (RSV) и способное нейтрализовывать RSV штаммы A и B, где антитело содержит CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 9, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 12.

2. Антитело по п.1, где антитело представляет собой антитело человека.

3. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по п.1 или 2.

4. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по п.1 или 2 или антигенсвязывающий фрагмент по п.3, и по меньшей мере одно терапевтическое средство или выявляемое средство.

5. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по п.1 или 2 или антигенсвязывающий фрагмент по п.3.

6. Экспрессионный вектор, содержащий по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты по п.5.

7. Клетка-хозяин для получения антитела по п.1 или 2 или антигенсвязывающего фрагмента по п.3, содержащая по меньшей мере один вектор по п.6.

8. Способ получения антитела по п.1 или 2 или антигенсвязывающего фрагмента по п.3, где способ предусматривает следующие этапы:

a) культивирование клетки-хозяина по п.7 в условиях, способствующих экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и

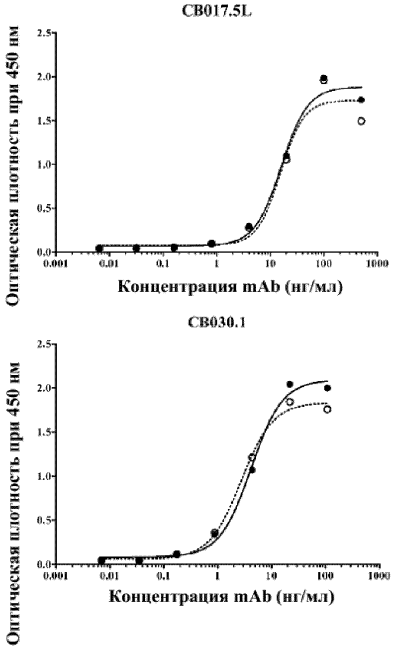
b) выделение экспрессированого антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

9. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения инфекции RSV, содержащая антитело по п.1 или 2 или антигенсвязывающий фрагмент по п.3 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

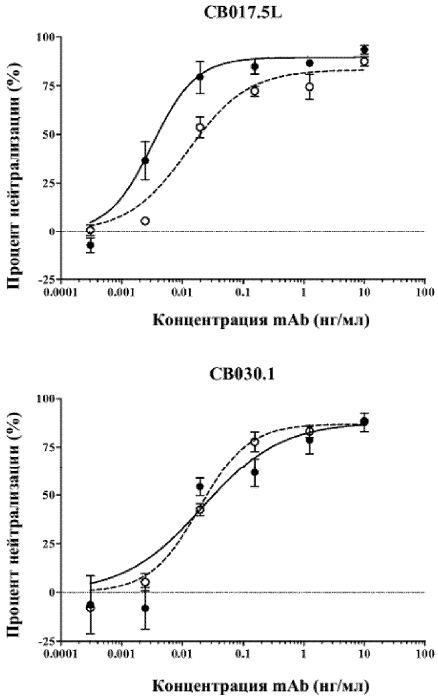
10. Применение антитела по п.1 или 2 в профилактике или лечении инфекции RSV.

11. Применение антигенсвязывающего фрагмента по п.3 в профилактике или лечении инфекции RSV.

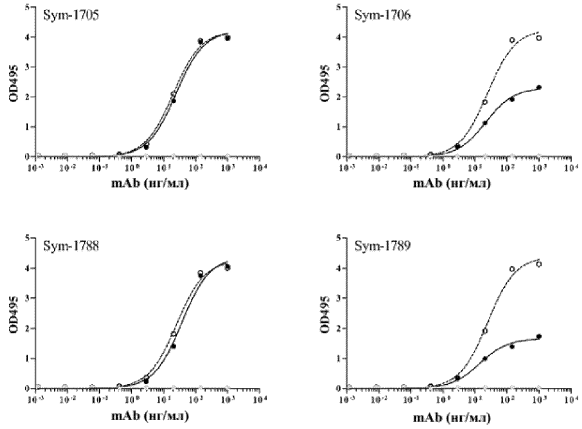
12. Применение фармацевтической композиции по п.9 в профилактике или лечении инфекции RSV.



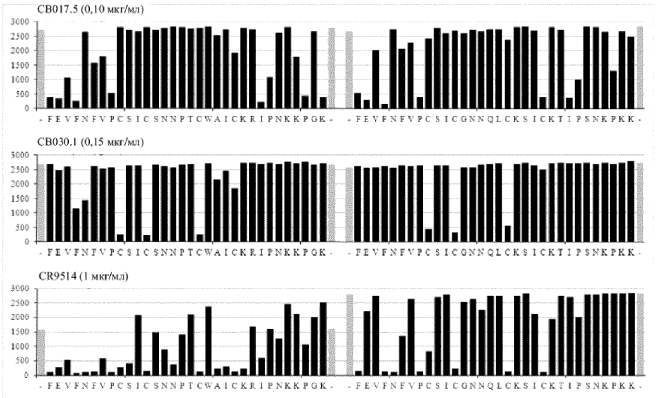
Фиг. 1



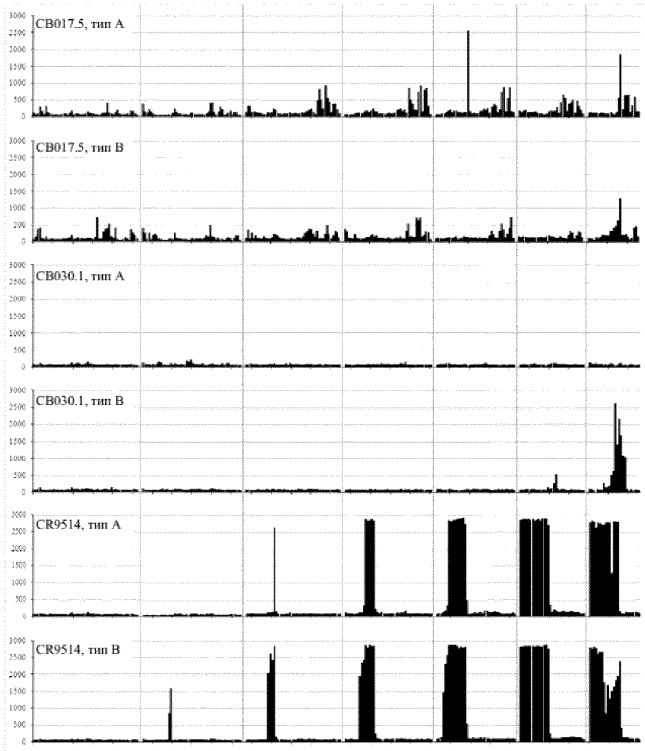
Фиг. 2



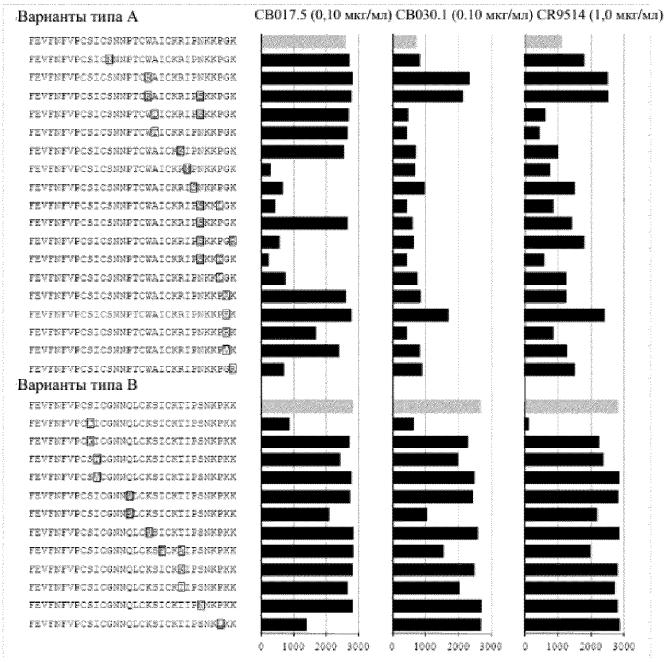
Фиг. 3



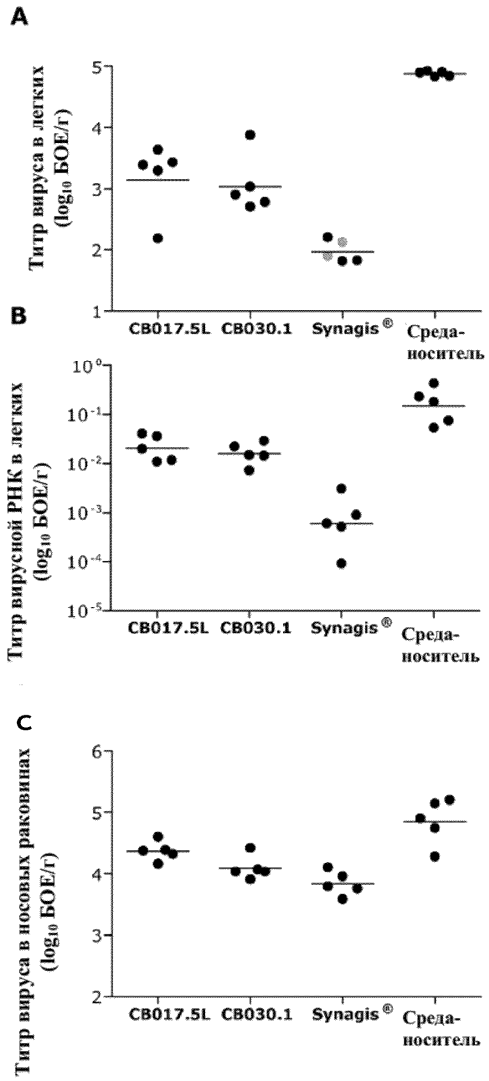
Фиг. 4


CB017.5, тип A
CB017.5, тип B
CB030.1, тип A
CB030.1, тип B
CR9514, тип A
CR9514, тип B

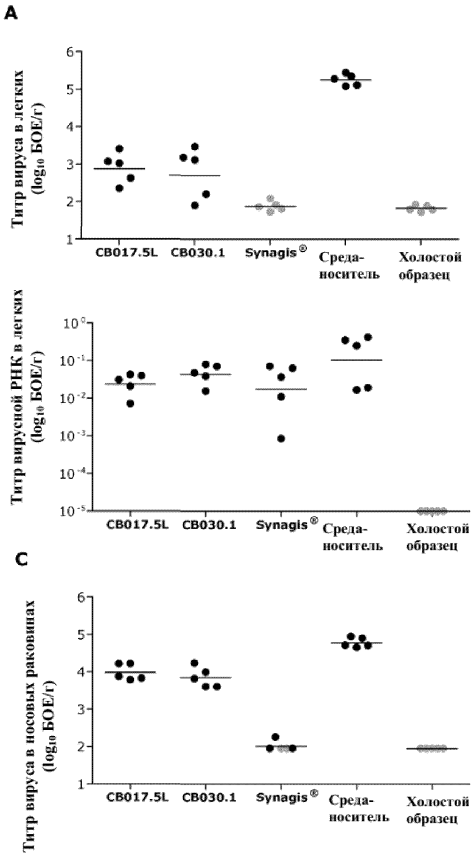
Фиг. 5


Варианты типа A
CB017.5 (0,10 мкг/мл)
CB030.1 (0.10 мкг/мл)
CR9514 (1,0 мкг/мл)
Варианты типа B
0
1000
2000
3000

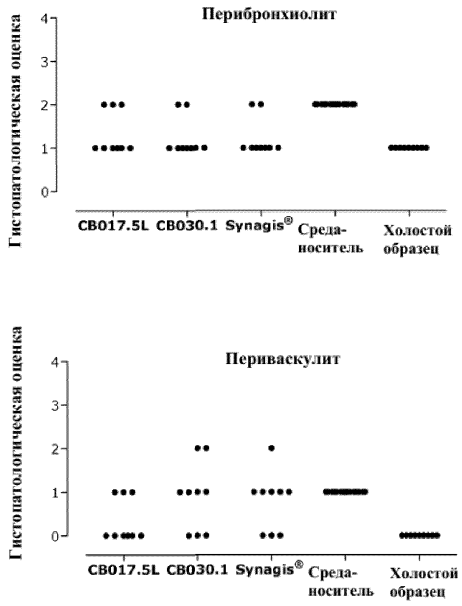
Фиг. 6

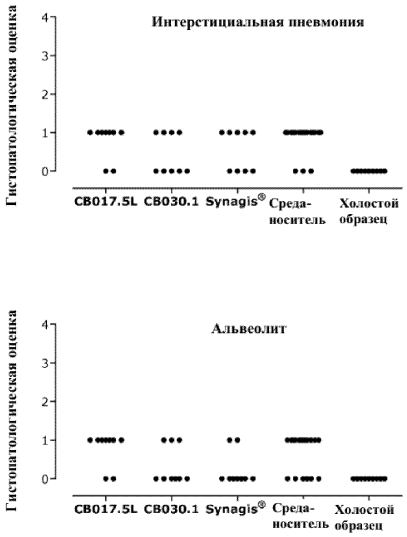

A
Титр вируса в легких
(log_{10} БОЕ/г)
5
4
3
2
1
CB017.5L
CB030.1
Synagis®
Среда-носитель
B
Титр вирусной РНК в легких
(log_{10} БОЕ/г)
10^{0}
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
CB017.5L
CB030.1
Synagis®
Среда-носитель
C
Титр вируса в носовых раковинах
(log_{10} БОЕ/г)
6
5
4
3
2
CB017.5L
CB030.1
Synagis®
Среда-носитель

Фиг. 7


A
Титр вируса в легких
(log_{10} БОЕ/г)
CB017.5L
CB030.1
Synagis®
Среда-носитель
Холостой образец
Титр вирусной РНК в легких
(log_{10} БОЕ/г)
C
Титр вируса в носовых раковинах
(log_{10} БОЕ/г)

Фиг. 8


Перибронхиолит
Гистопатологическая оценка
CB017.5L
CB030.1
Synagis®
Среда-носитель
Холостой образец
Периваскулит
Гистопатологическая оценка


Интерстициальная пневмония
Гистопатологическая оценка
0
1
2
3
4
CB017.5L
CB030.1
Synagis®
Среда-носитель
Холостой образец
Альвеолит
Гистопатологическая оценка
0
1
2
3
4
CB017.5L
CB030.1
Synagis®
Среда-носитель
Холостой образец

Фиг. 9