

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035861**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.21

(21) Номер заявки
201591973

(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) **61/812,098; 13179241.8**

(32) **2013.04.15; 2013.08.05**

(33) **US; EP**

(43) **2016.04.29**

(86) **PCT/EP2014/057499**

(87) **WO 2014/170257 2014.10.23**

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

(72) Изобретатель:
**Вадиа Джахангир (US), Виллиамсон
Роберт Энтони, Лангедейк Йоханнес
Петрус Мария (NL), Паскуал
Габриель (US), Ван 'Т Ваут 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.2011.00946 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, cited in the application, 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, cited in the application, 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 относится к выделенным антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с G-белком RSV и которые способны нейтрализовать RSV подтипов А и В, и их применению в диагностике, профилактике и/или лечении инфекций, вызванных RSV.

B1

035861

035861

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. Настоящее изобретение также относится к диагностическим, профилактическим и терапевтическим способам, в которых применяют антитела к 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 А и подтип В. RSV реплицируется в верхних дыхательных путях и затем распространяется в нижние дыхательные пути, вызывая бронхолит 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 - ингибитор РНК - 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 соответствующее 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, связанных 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. В публикации Anderson, L. J. et al. (*J. Virol.* (1988) 62:4232-4238) описана нейтрализующая способность смеси из мышинных моноклональных антител к F и G, одно из которых связывается с G-белком RSV (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 А, так и группы В 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 G-белке RSV A2 и имеют нейтрализующую активность по отношению к А и В 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 нейтрализовать RSV. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно способны специфически связываться и нейтрализовать RSV

обоих подтипов А и В. Предпочтительно антитела являются антителами человека. Антитела связываются 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 одним или несколькими антител по настоящему изобретению и/или их антигенсвязывающие фрагменты. Настоящее изобретение также предлагает диагностические, профилактические и терапевтические способы, в которых применяют антитела к RSV. Профилактические и терапевтические способы включают введение людям-субъектам антител к RSV и/или их антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения или лечения инфекции RSV и опосредованных заболеваний RSV или состояний, и/или уменьшение тяжести одного или более симптомов инфекции RSV. Комбинации множества разных антител к RSV и/или их антигенсвязывающих фрагментов и/или с другими антителами к RSV можно применять для комбинированной терапии. Также могут предлагаться композиции, содержащие антитела к RSV и/или их антигенсвязывающие фрагменты в комбинации с другими профилактическими или терапевтическими средствами. 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 А и В, чем любые известные антитела к G RSV, в частности, чем известные ранее моноклональные антитела 3D3 к G RSV, по меньшей мере, в анализе нейтрализации *in vitro*.

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

Согласно определенным вариантам 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. Было проведено исследование IgG с использованием анализов ELISA в отношении их способности связывать эктодомен рекомбинантных Ga- и Gb-белков RSV. Незакрашенные кружки (пунктирная линия) обозначают связывание с Ga (RSV A/Long), а закрашенные кружки (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 кружки (пунктирная линия) обозначают нейтрализацию RSV-A (RSV A/A2), а заретушированные кружки (сплошная линия) обозначают нейтрализацию RSV-B (RSV B/18537).

На фиг. 3 показано связывание моноклональных 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: CB003.1 (закрашенные черные кружки, сплошная линия), CB10.7 (незакрашенные черные кружки, пунктирная линия), или отсутствие моноклональных антител (закрашенные светло-серые кружки).

На 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 А и типа В). Активность связывания с пептидом приведена в виде вертикальной линии пропорционально сигналу PepScan ELISA.

На фиг. 5 анализ полных замен эпитопа CB003.1 и CB010.7 с использованием PepScan. Связывающая активность моноклональных антител CB003.1 и CB010.7 при 100 и 30 нг/мл соответственно с пептидом показана как вертикальная линия, пропорциональная сигналу Pepscan ELISA. Каждая группа из 20 линий соответствует полному замещающему набору для каждого аминокислотного положения в исходном 14-мерном пептиде (FHFEVFNFPVPCISIC). Внутри каждой группы из 20 линий замены расположены в алфавитном порядке, основываясь на коде аминокислоты, состоящем из одной буквы (ACDEFGHI-KLMNPQRSTVWY), а реакционная способность исходного 14-мерного пептида показана в виде столбца серого цвета.

На фиг. 6 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 А (левый график) и типа В (правый график). Аланин в положении 180 типа А был заменен глицином. Реактивность исходных пептидов приведена в сером столбце.

На фиг. 7 показано связывание моноклональных антител с встречающимися в природе вариантами центрального участка G-белка RSV. Связывание mAb CB003.1 и CB010.7 с разными пептидами соответ-

стует доступным вариантам типа А (верхний рисунок) и типа В (нижний рисунок). Активность пептидов дикого типа показана в виде серого столбца.

На фиг. 8 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. 9 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. 10 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 иммуноглобулинов. 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 антигенсвязывающий фрагмент относится к антигенсвязывающим и/или переменным 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, триатело, тетратело, (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 and D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, которая включена в настоящий документ посредством 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 переменные 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 определено, например, для радиоиммунного анализа (RIA), иммуноферментного 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 А и В. Предпочтительно антитела являются моноклональными антителами человека.

В соответствии с настоящим изобретением антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопами в центральном консервативном домене (CCD) G-белка RSV. Центральным консервативным доменом охватывается аминокислотная последовательность, содержащая аминокислоты 153-184 G-белка у штамма А2 RSV (или соответствующие аминокислотные остатки у других штаммов). В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, содержащей аминокислотные остатки 161-169, в частности одну или несколько аминокислот в аминокислотной последовательности, содержащей аминокислотные остатки 162-168 G-белка RSV А2 штамма RSV (нумерация согласно RSV штамму А2).

Таким образом, предложены антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с эпитопом в G-белке, находящемся в сайте, представляющем собой N-конец цистеиновой петли. Согласно изобретению было показано, что несмотря на то, что, по меньшей мере, некоторые из нейтрализующих антител настоящего изобретения связываются с похожим, но не идентичным линейным эпитопом, как, например, ранее описанным моноклональным антителом 3D3 (WO 2009/055711), антитела настоящего изобретения обладают более сильной нейтрализующей активностью согласно результатам количественного анализа нейтрализации *in vitro*. Согласно изобретению было показано, что антитела данного изобретения связываются с линейным эпитопом присущим только им образом. Так, согласно данному изобретению, было показано, что эти антитела имеют отличающуюся специфичность боковой цепи по отношению к эпитопу 161-169 RSV типа А и В (нумерация согласно RSV штамму А2). Это отражено, например, в результатах анализа замен (см. пример 11), которые показывают, что эпитоп антител данного изобретения имеет другие основные остатки по сравнению, например, с 3D3.

Было показано, что антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются более активными против RSV типа А и В, 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 определенных вариантах осуществления IC_{50} (эффективное разведение для 50% нейтрализации бляшкообразования) антител и антигенсвязывающих фрагментов к штамму А/А2 RSV (ATCC № по кат. VR-1540) было ниже 40 нг/мл и/или IC_{50} для штамма В/18537 RSV (ATCC № по кат. VR-1589) было ниже 30 нг/мл.

В одном варианте осуществления антитело не является антителом, выбранным из группы, состоящей из 1F12, 3G12, 1A5, 3D3, 1G1, 2B11, 5D8, 2D10, 3F9, 1D4, 1G8, 6A12, 10C6 (как описано в публика-

ции WO 2009/055711).

В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела по данному изобретению конкурирует за связывание с G-белком RSV с антителом, выбранным из группы, состоящей из 1F12, 3G12, 1A5, 3D3, 1G1, 2B11, 5D8, 2D10, 3F9, 1D4, 1G8, 6A12 и 10C6 (как описано в публикации WO 2009/055711).

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

В определенных вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, содержащую:

- a) 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) CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6,
- c) 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,
- d) CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 12,
- e) 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 или
- f) 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.

В определенных вариантах осуществления антитело включает легкую цепь, содержащую:

- a) CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 13, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 14 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 15,
- b) 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,
- c) CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 19, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 20 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 21,
- d) 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) 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 или
- f) 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.

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: 13, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 14 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 15;
- b) CDR1-участка тяжелой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-участка тяжелой цепи с SEQ ID NO: 5 и CDR3-участка тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6 и CDR1-участка легкой цепи с SEQ ID NO: 16, CDR2-участка легкой цепи с SEQ ID NO: 17 и CDR3-участка легкой цепи с SEQ ID NO: 18;
- c) 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: 19, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 20 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 21;
- d) антитела, содержащего CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 12, 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; и
- 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.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 37, переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 39, переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 41, переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 43, переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 45, или переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 47.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 38, переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 40, переменный участок легкой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 42, переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 44, переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 46, или переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 48.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из

а) антитела, содержащего переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 37, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 38;

б) антитела, содержащего переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 39, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 40;

в) антитела, содержащего переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 41, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 42;

г) антитела, содержащего переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 43, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 44;

д) антитела, содержащего переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 45, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 46; и

е) антитела, содержащего переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 47, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 48.

Согласно определенным вариантам осуществления предложены антигенсвязывающие фрагменты описанных выше антител. Антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно связываются с одним и тем же эпитопом.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с разными эпитопами при сравнении с эпитопами известных антител к G-белку RSV, таких как, например, 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 антителами, 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 *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 RSV. 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 (combination index, CI) было описано у Chou and Talalay (*Adv Enzyme Regul.*, 22:27-55, 1984).

Согласно определенным вариантам осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты предназначены для применения в качестве лекарственного препарата и предпочтительно для применения в диагностике, терапии и/или профилактике инфекции RSV, вызываемой подтипами А и/или В 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, бронхолит, 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 нетоксичным 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 изобретение относится к применению антитела или антигенсвязывающего фрагмента настоящего изобретения 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 нуждающемуся 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, уменьшения интенсивности и/или лечения состояния, возникшего в результате инфекции RSV. Уменьшение интенсивности, используемое в данном документе, может относиться к снижению видимых или заметных симптомов заболевания, вирусемии или любого другого заметного проявления 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. Фармацевтические композиции могут включать одно или несколько антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно данному изобретению. Могут присутствовать дополнительные терапевтические средства, включая одно или несколько антител, которые характеризуются иммунореактивностью в отношении F-белка RSV, или другие терапевтические средства, которые эффективны против 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, гидроксильное, 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 аффинно-

сти 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. 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, Gar 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.

Настоящее изобретение также предлагает 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 прочего, 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 терапевтическое 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, метка(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, но не ограничиваются ими, ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминисцентные материалы, биолюминисцентные материалы, радиоактивные материалы, металлы, испускающие позитроны, 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, тус-метку или flag-метку.

Альтернативно, антитело можно конъюгировать со вторым антителом с получением гетероконъюгата 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 конъюгирования, непосредственно или опосредованно, 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.

Настоящее изобретение кроме того предлагает молекулы 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 нуклеиновых кислот представляют собой выделенные или очищенные молекулы. 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 изобретения 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, Q β , 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, пурамицин, 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 ВНК, 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 иммортализованы 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 г. 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 производным 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 данного изобретения можно получать различными способами. Способ получения антитела согласно настоящему изобретению представляет собой дополнительный аспект настоящего изобретения. Способ включает этапы:

a) культивирование хозяина согласно настоящему изобретению в условиях, приспособленных 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 гибридами, которые получают путем слияния В-клеток, полученных из вышеописанных трансгенных млекопитающих, отличных от человека, с иммортализованными 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, антите-

ло, антигенсвязывающий фрагмент, иммуноконъюгат, функциональный вариант и/или по меньшей мере нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением. Необязательно, вышеописанные компоненты наборов в соответствии с настоящим изобретением запакованы в подходящие контейнеры и промаркированы 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 предлагает способ выявления RSV в образце, где способ предусматривает этапы: (а) 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 (б) сравнение анализируемого уровня антигена RSV с контрольным уровнем; при этом увеличение анализируемого уровня антигена RSV по сравнению с контрольным уровнем указывает на инфекцию, вызванную 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 фрагменты. Предпочтительно антитела или иммуноконъюгаты по настоящему изобретению приводят в контакт с образцом в условиях, которые дают возможность формировать иммунный 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 отличие от белка слияния (RSV F), экспрессируемого на поверхности вирусной мембраны, белок связывания (RSV G) является высоковариабельным, определяя, таким образом, два обширных подтипа RSV (т.е. подтипы А и В). 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 А (RSV A/Long) и подгруппе штамма В (RSV B/B1), экспрессировали рекомбинантно в клетках Freestyle 293, очищенных и меченных для использования в экспериментах 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 Мус-меткой (EQKLISEEDL) и 6Х 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 mM Tris-HCL

при pH 8 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 буфера для промывки, взятого в количестве 2-х объемов колонки и состоящего из 20 мМ Tris-HCl, pH 8, 300 мМ NaCl, 5% глицерина и 20 мМ имидазола. Белок элюировали с помощью 5 мл элюирующего буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl, pH 8, 300 мМ NaCl, 5% глицерина и 50 мМ имидазола. Наконец, элюат подвергали диализу против 4 л фосфатно-солевого буфера (PBS) при 4°C в течение ночи. Полученный в результате диализа белок концентрировали до 0,5-1,0 мл в концентрате 30 K MWCO (Millipore, концентрат Amicon Ultracel) и его определяли количественно при помощи анализа с бидинхониновой 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. После очистки определяли уровень мечения, который составил 1,2 моль 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 микроадабный набор для мечения малых количеств белка (Invitrogen, № по кат. A30006) согласно протоколам производителя, и после завершающей очистки уровень мечения определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop, который составлял приблизительно 2 моль AF 488 на моль белка.

Таблица 1. Используемые последовательности рекомбинантного G-белка RSV

Белок (№ доступа)	Аминокислотная последовательность
RSV G A/Long (P20895)	ANHKVTLTITAIQDATSQIKNTTPTLYLTQDPQLGISFNSLSEITSTTTILASTTPGVKSNLQPTTVKTKNTTTTQT QPSKPTTKQRQNKFPNKNDFHFVFNVPVCSICSNNPICWAI CKRIPNKKPKGKTTTKPTKPTFFKTKKDLKPKQ TTKPKVEVPTTKPTEPTINTTKNITTTLLTNNITGNPKLTSQMETFHSTSSSEGNLSPSQVSTTSEHSPQSSPPNT TRQQAYVEQ KLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO: 49)
RSV G B/B1 (NP_056862)	ANHKVTLTITVTVQTIKNTTEKNITTYLTQVPPERVSSSKQPTTTSPIHTNSATTSPTNKSEHTHTTAQTGRTTST QTNKPS TKPRLKNPPKPKDDYHFVFNVPVCSICGNNQLCKSI CKTI PSNPKPKKPTIKPTNKPTTKTKNRDPKT PAKTTKKTETTNPTKPKPTLTTTERDTSSTQSTVLDTTTLEHTIQQQLSHSTTPENTPNSTQPTPTASEPSTSNSTQNT QSHAQAYVE QKLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO: 50)

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, В-клетки, обогащенные CD22+, окрашивали флуоресцентно меченными антителами к маркерам памяти 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/RSV Gb или CD19/CD27/IgG/SYM-1706 (используемые в определенных сортировочных экспериментах). Положительные клетки сортировали и отдельные клетки помещали в индивидуальные лунки 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 10-25×10⁶ 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).

Аmplификация 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 двух-стадийной 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, использо-

вали в качестве матрицы для амплификации тяжелой, легких каппа- и лямбда-цепей. Использовали пул праймеров, специально сконструированных для лидерных участков тяжелой цепи антитела (праймеры СВ-5'LVH), легкой каппа-цепи (праймеры СВ-5'LVk) и легкой лямбда-цепи (праймеры СВ-5' LVlam) (табл. 2-4). Один обратный праймер, специально сконструированный для для CH1-участка, Ск- и CL-участка тяжелой цепи, легкой каппа-цепи и легкой лямбда-цепи, соответственно, использовали в стадии I реакции ПЦР.

Таблица 2 VH, стадия 1, прямые праймеры (5'-3')

Название	Последовательность
CB-5'LVH1a	ATGGACTGGACCTGGAGGTTCCCTC (SEQ ID NO: 51)
CB-5'LVH1b	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCCTC (SEQ ID NO: 52)
CB-5'LVH1c	ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTC (SEQ ID NO: 53)
CB-5'LVH1d	ATGGACTGGACCTGGAGCATCC (SEQ ID NO: 54)
CB-5'LVH2	GGACATACTTTGTCCACGCTCCTGC (SEQ ID NO: 55)
CB-5'LVH3a	AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGC (SEQ ID NO: 56)
CB-5'LVH3b	AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGC (SEQ ID NO: 57)
CB-5'LVH3c	AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGC (SEQ ID NO: 58)
CB-5'LVH4	GCAGTCCCAGATGGGTCCTG (SEQ ID NO: 59)
CB-5'LVH5	TCAACCGCCATCCTCGCCCTC (SEQ ID NO: 60)
CB-5'LVH6	GTCTGTCTCCTCCTCATCTTCCTGC (SEQ ID NO: 61)
3'CgCH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC (SEQ ID NO: 62)

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

Название	Последовательность
CB-5'LVk1a	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC (SEQ ID NO: 63)
CB-5'LVk1b	ATGAGGGTCCCTGCTCAGCTC (SEQ ID NO: 64)
CB-5'LVk1c	ATGAGAGTCCCTGCTCAGCTC (SEQ ID NO: 65)
CB-5'LVk2	TGGGGCTGCTAATGCTCTGG (SEQ ID NO: 66)
CB-5'LVk3	CCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG (SEQ ID NO: 67)
CB-5'LVk4	TCTCTGTGCTCTGGATCTCTGGTGC (SEQ ID NO: 68)
CB-5'LVk5	CTCCTCAGTTCCTCCTCTTGG (SEQ ID NO: 69)
CB-5'LVk6	AACTCATGGGTTTCTGCTGCTCTGG (SEQ ID NO: 70)
3'Ck-Rev494	GTGCTGTCTCTGCTCTCTGCTC (SEQ ID NO: 71)

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

Название	Последовательность
CB-5' LVlam1	CTCCTCGTCACTGCACAGG (SEQ ID NO: 72)
CB-5' LVlam2	CTCCTCTCACTGCACAGG (SEQ ID NO: 73)
CB-5' LVlam3	CTCCTCACTCGGGACACAGG (SEQ ID NO: 74)
CB-5' LVlam4	ATGGCCTGGACCCCTCTCTG (SEQ ID NO: 75)
CB-5' LVlam5	ATGGCATGGATCCCTCTCTCCTC (SEQ ID NO: 76)
3'Clam-Rev	CAAGCCAACAAGGCCACACTAGTG (SEQ ID NO: 77)

Стадия II. Амплификация

1) 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'SallJH), участка стыка легкой каппа-цепи (праймеры 3'Jk) и специфичный к участку 5'праймер, соответствующий легкой лямбда-цепи (праймеры СВ-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 Sall.

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

Название	Последовательность
CB-VH1a	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 78)
CB-VH1b	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 79)
CB-VH1c	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTTCCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 80)
CB-VH1d	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 81)
CB-VH2a	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTACCTTGAGGGAGTCTGG (SEQ ID NO: 82)
CB-VH2b	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTACCTTGAAGGAGTCTGG (SEQ ID NO: 83)
CB-VH3a	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 84)
CB-VH3b	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTGGAGTC (SEQ ID NO: 85)
CB-VH3c	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 86)
CB-VH3d	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG (SEQ ID NO: 87)
CB-VH4a	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGSTGCAGCTGCAGGAG (SEQ ID NO: 88)
CB-VH4b	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG (SEQ ID NO: 89)
CB-VH5	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 90)
CB-VH6	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG (SEQ ID NO: 91)
CB-VH7	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCATCTG (SEQ ID NO: 92)
3'SalI _{IJH} 1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG (SEQ ID NO: 93)
3'SalI _{IJH3}	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG (SEQ ID NO: 94)
3'SalI _{IJH6}	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG (SEQ ID NO: 95)

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

Название	Последовательность
CB-VK1a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO: 96)
CB-VK1b	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCCAGTTGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO: 97)
CB-VK1c	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCCAGTTGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO: 98)
CB-VK2a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGATRTTGTGATGACTCAGTCTCCACTC (SEQ ID NO: 99)
CB-VK3a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATGTGTTGACGAGTCTCCAG (SEQ ID NO: 100)
CB-VK3b	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATGTGTTGACACAGTCTCCAG (SEQ ID NO: 101)
CB-VK3c	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATAGTGTGATGACGAGTCTCCAG (SEQ ID NO: 102)
CB-Vk4	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCGTGATGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO: 103)
CB-Vk5	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAACGACACTCACGAGTCTCC (SEQ ID NO: 104)
CB-Vk6	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATGTGCTGACTCAGTCTCCAG (SEQ ID NO: 105)
3' Jk1/4 Rev IIa-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATYTCCACSTTGGTC (SEQ ID NO: 106)
3' Jk2 Rev IIb-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATCTCCAGSTTGGTC (SEQ ID NO: 107)
3' Jk3 Rev IIc-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATATCCACTTTGGTC (SEQ ID NO: 108)
3' Jk5 Rev IId-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTAAATCTCCAGTCGTGTC (SEQ ID NO: 109)

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

Название	Последовательность
CB-VL1	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTC (SEQ ID NO: 110)
CB-VL2	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCTCCTATGTGCTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 111)
CB-VL3	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAGTCTGTGCTGACGCAGCC (SEQ ID NO: 112)
CB-VL4	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAGTCTGTCTGCTGACGCAGCC (SEQ ID NO: 113)
CB-VL5	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAGTCTGCCCTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 114)
CB-VL6	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCTTCTGAGCTGACTCAGGACC (SEQ ID NO: 115)
CB-VL7	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACC (SEQ ID NO: 116)
3' Clam- Стадия II	CTCAGAGGAGGGYGGGAACAGAGTGAC (SEQ ID NO: 117)

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 амплифи-

кации 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	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGCTTA AATCTGGAAC TGCCTGTGTGTGCCTTCTAAATAA CTCTATCCC CGTGAGGC CAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTA ACTCCCAGGAGGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTACGC TTAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA GGCCCTCAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACC GCGGAGAGTGTTAATCTAGA AATAAGGAGGATATAATTATGAAATACCTGCTGCCGACCGCAGCCGCTGGTCTGC TGCTGCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCC (SEQ ID NO: 118)
IGLC2	GTCACTCTGTTCCC GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGG TGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCTGGAAGGCAGA TAGCAGCCCCGTCAAGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCCAAACAAAGCAAC AACAAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGAAGTCCC ACAGAAGCTACAGTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGT GGCCCTACAGAATGTTTATAATCTAGAAATAAGGAGGATATAATTATGAAATAC CTGCTGCCGACCGCAGCCGCTGGTCTGCTGCTGCTGCTCGCAGCATAGCCGGCCATGG CC (SEQ ID NO: 119)

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

Название	Последовательность
FabLinker-F	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC (SEQ ID NO: 120)
FabLinker-R	GGCCATGGCCGGCTATGCTGCGAGC (SEQ ID NO: 121)
Lambda-Fab Linker F	GTCACTCTGTTCCRCCTCCTCTGAG (SEQ ID NO: 122)
Overlap-F	CTACCGTGGCCTAGGGCGCC (SEQ ID NO: 123)
Overlap-R	TGCGAAGTCGACGCTGARGAG (SEQ ID NO: 124)

Расщепление и клонирование в бактериальный вектор экспрессии

После очистки продукта ПЦР (Qiagen), полученного в результате ПЦР с перекрывающимися праймерами, фрагмент расщепляли и расщепленный перекрывающийся продукт затем отделяли 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., № № 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 снова тестировали их способность связываться с Ga, Gb RSV, или пептидом, содержащим центральный консервативный домен из G RSV (CCD) (SYM-1706; аминокислотная последовательность: биотин-KQRQNKPPNKNDFHFEVFNFPSCSICSNPTCWAICKR; SEQ ID NO: 125).

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 3D3, т.е. содержащее вариабельные участки тяжелой и легкой цепей 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% NFDМ/PBS/0,05% Tween20. Мышиное антитело к актину (Sigma, № по кат. A3853) использовали в концентрации 1,25

мг/мл как позитивный контроль для планшетов, покрытых бычьим актином. Антитело к НА, 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 мышинному 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 ТМВ:раствора пероксида (Pierce, № по кат. 34021) на протяжении примерно 5 мин. Реакцию сразу же останавливали 50 мкл 2N H₂SO₄ и измеряли поглощение при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA. На позитивное связывание указывало значение при OD₄₅₀, 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, выявляли ближайшие зародышевые линии и определяли 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: 126)
Seq-PelB-Rev	CAGCAGACCAGCGGCTGC (SEQ ID NO: 127)

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.

А. 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 рCP9-каппа (SEQ ID NO: 127) и рCP9-лямбда (SEQ ID NO: 128). 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 рCB-Fab в примере 4) и клонировали в последовательном порядке в вектор экспрессии рCP9.

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 HAVT20 (5'-ATGGCCTGCCCTGGCTTTCTCTGGGCACTTGTGATCTCCACCTGTCTTGAATTTCCATGGCT-3'; MASPGLWALVISTCLEFSMA) 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 цепи (т.е. либо легкой, либо тяжелой цепи, в зависимости от того какую клонировали в первую очередь). Для клонирования фрагмента тяжелой цепи вектор рCP9 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 рCP9 и продукт перекрывания в виде тяжелой цепи разделяли в 1% агарозном геле и экстрагировали из

геля (более ~9,5 т.п.о для вектора рСР9). Реакции лигирования проводили при соотношении вектор-вставка 1:3 и продукты реакции трансформировали в клетки DH5a Max Efficiency (Invitrogen Corp., №№ 18258-012). После подтверждения последовательности клонировали вторую цепь (например, легкую цепь). Для клонирования фрагмента легкой цепи клоны рСР9, 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). Легкие цепи затем лигировали в вектор рСР9, содержащий ген соответствующей тяжелой цепи и трансформировали в клетки DH5a Max Efficiency. Отбирали несколько колоний для сквенирования и анализировали. В табл. 11 и 12 приведены последовательности CDR-участков тяжелой и легкой цепей антитела.

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

Клон	VH Зародышевая линия	CDR1	CDR2	CDR3
СВ002.1	IGHV4-59	SYFWN (25)	YIYGSGSADYNPSLKS (26)	SGFCTNDACYRRGSWFDP (27)
СВ003.1	IGHV1-46	TYIIN (10)	MINTGSGVTSYAQKFQG (11)	MYSGSWYPPDY (12)
СВ010.7	IGHV3-30	THGMH (7)	VMSYDGTKKYHADSVKG (8)	VGELRSFDWLLADGTAYYYYGMDV (9)
СВ028.2	IGHV1-18	TYGIT (31)	WISGSDNTNYAQNQQG (32)	ALAKWYCSSSSCFGGGSCYSYD (33)
СВ048.3	IGHV3-30	NHGMH (4)	VISYDGNKKYADSVKG (5)	TTFYFDDSNYYEYLDY (6)
СВ058.1	IGHV3-23	SYAMS (1)	AIRGSDVNTYYADSVKG (2)	DPALYCSGETCFSDLTD (3)

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

Клон	VK/VL Зародышевая линия	CDR1	CDR2	CDR3
СВ002.1	IGKV1-39	RASQSIDNYLN (28)	AASLQS (29)	QQSYSTLT (30)
СВ003.1	GKV3-20	RASQNINGNYLA (22)	EASSRAT (23)	QQYGTSPF (24)
СВ010.7	IGKV4-1	KSSQSVLYSSNNKNYLA (19)	WASTREF (20)	HQYYSIP (21)
СВ028.2	IGKV1-39	RASQMSNYLN (34)	AASTLQS (35)	QQSFSTP (36)
СВ048.3	IGKV1-9	RASQGIRSYLA (16)	AASTLQS (17)	QQLNTSPP (18)
СВ058.1	IGKV1-16	RASQGINNYLA (13)	AASTLPS (14)	QHYIRYP (15)

В. Экспрессия и очистка IgG

Для экспрессии каждого IgG получали миди-препы плазмидной ДНК (Qiagen) из векторов рСР9, содержащих представляющие интерес гены как тяжелой, так и легкой цепи, и их использовали для трансфекции клеток 293-F, применяя 293fectin согласно протоколам производителя (Invitrogen, № № 51-0031). После трансфекции клетки инкубировали в течение 72 ч, чтобы обеспечить достаточное продуцирование IgG. Клеточную культуру затем собирали и центрифугировали, чтобы удалить клетки. Очистку проводили с помощью колоночной хроматографии, используя колонку с белком А (гранулы сефарозы с белком А; Amersham, № по кат. 17-0963-03). Элюат дважды подвергали диализу против 4 литров, содержащих 20 мМ Tris-HCl pH7,2, 150 мМ NaCl. В заключение, диализованные 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 М⁻¹ см⁻¹. Кроме того, концентрацию IgG подтверждали с помощью ВСА анализа (Thermo Fisher) согласно протоколам производителя, и путем измерений с помощью сенсорных наконечников с иммобилизованным белком А 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 присутствии 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 переменные 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); козьего антитела 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 мышинное антитело к актину (Sigma, № по кат. A3853) использовали в концентрации 1,25 мг/мл как позитивный контроль для планшетов, покрытым бычьим актином. После инкубации планшеты четыре раза промывали с помощью PBS/0,05% Tween20. Каждое вторичное антитело вносили при 1:1000 в 0,4% NFDМ/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. Наконец, козье антитело к мышинному 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 ТМВ:раствора пероксида (Pierce, № по кат. 34021) на протяжении примерно 5 мин. Реакцию сразу же останавливали 50 мкл 2N H₂SO₄ и измеряли поглощение при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Оценочные значения EC₅₀ для связывания (определяемые титрованием каждого IgG) для антител в соответствии с настоящим изобретением изменялись в пределах от 1,0 до 2,0 нг/мл в случае A/Long штамма RSV и от 0,5 до 2,5 нг/мл в случае B/B1 штамма.

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 отношении 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 опорных.

Клетки Vero (ATCC, № по кат. CCL-81; Манассас) использовали как клетки-хозяева при инфицировании. 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% CO₂ 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 9×10⁴ 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, 1,3 мг/мл, 156, 19,5, 2,4 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 повторях. 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-глутамин, 0,75% метилцеллюлозы). 24-Луночные планшеты для культивирования клеток инкубировали при 37°C (с 5% CO₂) на протяжении 96-120 ч. Клеточные планшеты фиксировали с помощью 10% формалином на протяжении 1 ч при комнатной температуре, промывали 10 раз бидистиллированной H₂O и блокировали с помощью 5% обезжиренного молока (NFDМ) в PBS при 37°C на протяжении часа. После инкубирования блокирующий раствор сливали и в каждую лунку добавляли 200 мкл конъюгированного с пероксидазой хрена мышинного антитела к RSV (ab20686, Abcam, разведение 1:750 в 1% NFDМ). Планшеты инкубировали при 37°C на протяжении 2 ч и промывали 10 раз бидистиллированной H₂O. 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 H₂O, высушивали на бумажном полотенце и подсчитывали число голубых бляшек.

IC₅₀ (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 каж-

дом разведении антитела)/(среднее количество бляшек в лунках с вирус-контролем)] \times 100.

В табл. 13 перечислены IC₅₀ для каждого антитела к A/A2 штаммам RSV (ATCC № по кат. VR-1540) и RSV B/18537 (ATCC № по кат. VR-1580).

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

Штамм	RSV А	RSV В
	А/А2	В/18537
Анализ	Нейтрализация	Нейтрализация
	IC ₅₀ (нг/мл)	IC ₅₀ (нг/мл)
CR9514 (3D3)	40,7	33,0
СВ002.1	35,5	23,4
СВ003.1	31,5	24,6
СВ010.7	16,5	14,1
СВ028.2	11,0	19,6
СВ048.3	16,7	8,0
СВ058.1	14,4	4,2

Из табл. 13 видно, что IC₅₀ (эффективное разведение для 50%-ной нейтрализации бляшкообразования) антител и антигенсвязывающих фрагментов к А/А2 штамму RSV (ATCC № по кат. VR-1540) было ниже 40 нг/мл и/или IC₅₀ для штамма В/18537 RSV (ATCC № по кат. VR-1589) был ниже 30 нг/мл. Кроме того, IC₅₀ для антител СВ003.1, СВ010.7 и контрольных антител CR9505 (131-2G) и CR9514 (3D3) в случае А/Long штамма RSV (ATCC № по кат. VR-26) составляли 16, 12, 18 и 17 нг/мл соответственно.

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 глутамин 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, рCP9-каппа (See SEQ ID: 127) и рCP9-гамма (см. SEQ ID: 128). 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	Вариабельный участок, цепь	Мутация	Причина
СВ002.1	Тяжелая цепь	C102S C107S	Свободный цистеин
СВ003.1	Легкая цепь	N30D	Дезаминирование
СВ010.7	Нет данных	Нет данных	Нет данных
СВ028.2	Тяжелая цепь	C105S C110S C112S C117S	Свободный цистеин
СВ048.3	Легкая цепь	N92D	Гликозилирование
СВ058.1	Тяжелая цепь	C104S C109S	Свободный цистеин

Пример 9. Исследования связывания пептида с помощью ELISA и Octet

Подробное эпитопное картирование проводили для выявленных mAb, специфичных к G-белку RSV, таких как 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 аминокислотной 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 А (H₂O+0,05% трифторуксусной кислоты [ТФУ]) и с растворителем В (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 А и В (табл. 15). Покрытые авидином титрационные 96-луночные планшеты промывали и инкубировали с помощью 100 мкл биотинилированного пептида ($2,37 \times 10^{-7}$ М) 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 анти-телом к иммуноглобулину человека, 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 М H₂SO₄. Поглощение считывали при 490 нм.

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

Тип А, центральный участок	
Sym-1705	биотин- ₁₄₅ KQRQNKPPNKFNDHFVEVFNPFVPCISCSNNPTCWAICKRIPNKKPKGKKT ₂₀₁ (SEQ ID NO: 129)
Sym-1706	биотин- ₁₄₅ KQRQNKPPNKFNDHFVEVFNPFVPCISCSNNPTCWAICKR ₁₈₄ (SEQ ID NO: 125)
Тип В, центральный участок	
Sym-1788	биотин- ₁₄₅ KPRPKSPPKPKDDYHFEVFNPFVPCISCGNNQLCKSICKTIPSNKPKKPTIKPTNK ₂₀₁ (SEQ ID NO: 130)
Sym-1789	биотин- ₁₄₅ KPRPKSPPKPKDDYHFEVFNPFVPCISCGNNQLCKSICKT ₁₈₄ (SEQ ID NO: 131)

Примечание: подчеркнутые остатки относятся к негликозилированному центральному консервативному домену

Все mAb, описанные выше, связываются с Gα- и Gβ-белками RSV (пример 6) и с центральным участком пептидов типа А и типа В (данные не показаны). Титрование антител CB003.1 и CB010.7 показало, что эти mAbs имеют IC₅₀, равные ~20 нг/мл для всех четырех пептидов (фиг. 3). Связывание mAbs с RSV G пептидов определяли, используя сенсорные наконечники Streptavidin на Octet Red384 (ForteBio). И снова, mAb показали перекрестную реактивность в отношении пептидов как типа А, так и типа В (табл. 16). CB003.1 показало самую высокую ответную реакцию как к пептиду типа А, так и к пептиду типа В. CB010.7 показало несколько более высокую степень связывания с типом В по сравнению с пептидами типа А.

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

Пептид	CB010.7	CB003.1
Sym-1705	1,25	3,48
Sym-1706	1,74	3,36
Sym-1788	1,94	3,28
Sym-1789	2,96	3,20

RU: единицы ответа

Пример 10. Картирование минимальных эпитопов (PerScan)

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 А и В (остатки 145-201), используя анализ PerScan. Связывание антител с пептидами оценивали в ELISA на основе PerScan. 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 про-

мывки планшеты инкубировали с кроличьим антителом к mAb, конъюгированным с пероксидазой хрена (DakoCytomation) в течение 1 часа 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, соответствующим 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). В то время как все антитела связываются с центральным консервативным доменом, критические для их связывания остатки отличаются. Для двух антител (CB003.1 и CB010.7) минимальный эпитоп сводится к N-концевому CCD участку (сходному с 3D3, раскрытому в публикации WO 2009/055711).

Пример 11. Анализ полных замен (PepScan)

С целью идентификации боковых цепей, критических для связывания, и для исследования широты распознавания для известных штаммов RSV, синтезировали специально предназначенные для этого наборы пептидов. Был выполнен анализ полных замен с использованием специально предназначенного для этого комплекта из 280 вариантных пептидов с одной заменой для каждого положения в последовательности FHFEVFNFPVPCSI (SEQ ID NO: 132), распознаваемого антителами CB003.1 и CB010.7, что выявило остатки, имеющие важное значение для связывания с этими антителами (фиг. 5). Эпитоп этих антител сравним с эпитопом 3D3, но распознается он совершенно другим образом. Это отражено в результатах анализа замен, которые показывают, что эпитоп наших антител имеет совершенно другие основные остатки по сравнению с 3D3. Поэтому процесс распознавания и связывания отличается значительно. Как показано в примере 7, антитела настоящего изобретения обладают более высокой нейтрализующей способностью, чем 3D3.

3D3: ¹⁵⁹FHFEVFNFPVPCSI₁₇₂

CB010.7: ¹⁵⁹FHFEVFNFPVPCSI₁₇₂

CB003.1: ¹⁵⁹FHFEVFNFPVPCSI₁₇₂

Консервативные остатки, имеющие важное значение для связывания, также приведены в табл. 17 (критические остатки выделены жирным шрифтом).

Пример 12. Аланиновое сканирование (PepScan)

Тестировали набор пептидов, у которых каждое положение заменяли остатком аланина (фиг. 6). Боковые цепи критических для связывания четырех mAb приведены в табл. 17 (выделены черным жирным шрифтом).

Пример 13. 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. 7, распознаются практически все встречающиеся в природе вариантные пептиды типа А и В. CB003.1 демонстрирует более низкую степень связывания с пептидами типа А, чем с типом В. CB010.7 в равной степени хорошо связывается с пептидами как типа А, так и типа В. Антитела являются критическими к мутациям в положении 180 в вариантных пептидах типа А. Мутация Ser170Cys не была критичной для CB010.7. Мутация Ile171Thr была критичной для связывания CB003.1, и мутация Gln175Arg была критичной для CB003.1. Двойная мутация Ile181Phe; Ile184Ala также была критичной для CB003.1. Встречающиеся в природе варианты, которые являются критическими для связывания четырьмя антителами, изложены в табл. 17 (обозначены подчеркиванием).

Таблица 17. Эпитопное картирование с использованием моноклональных антител, специфичных к G-белку RSV (PepScan)

mAb	Тип	Критические остатки в центральном консервативном домене	Эпитоп
	RSV-A	¹⁵⁸ DFHFEVFNFPVPCSI ¹⁹² CSNNPTCWAICKRIPNKKPGK ₁₉₂	
	RSV-B	¹⁵⁸ DYHFEVFNFPVPCSI ¹⁹² CGNNQLCKSI ¹⁹² CKTIPSNKPKK ₁₉₂	
3D3	RSV-A	-FHFEVFNFPVPCSI-c-n-n-c- <u>a</u> ick- <u>i</u> ----p--	I
	RSV-B	-YHFEVFNFPVPCSI-g-c-----c-- <u>i</u> c-----	
CB002.1	RSV-A	-FHFEVFNFPVPCSI-c-n-n-c- <u>a</u> ick- <u>n</u> --p--	I
	RSV-B	-YHFEVFNFPVPCSI-g-c-n-n-c-- <u>i</u> ck-----	
CB003.1	RSV-A	-FHFEVFNFPVPCSI-----c----- <u>g</u> -	I
	RSV-B	-YHFEVFNFPVPCSI----- <u>g</u> -----c-----	
CB010.7	RSV-A	---FEVFNFPVPCSIc-----c- <u>a</u> i-----	I
	RSV-B	---FEVFNFPVPCSIc-----c-----	
CB028.2	RSV-A	---FEVFNFPVPCSI-c-----c-----	I
	RSV-B	---FEVFNFPVPCSI-c-----c-----	
CB048.3	RSV-A	-FHFEVFNFPVPCSI-----	I
	RSV-B	-YHFEVFNFPVPCSI-g-n ^g lc--ic- <u>t</u> -----	
CB058.1	RSV-A	--HFEVFNFPVPCSI-----	I
	RSV-B	--HFEVFNFPVPCSIcgnglck-ic- <u>t</u> ip-----	

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

Пример 14. Профилактическая эффективность mAb к G-белку

Для определения того, проявляет ли mAb к G профилактическую эффективность *in vivo*, mAb СВ003.1 и СВ010.7 исследовали 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 массой 60-80 г в день 1, вводили внутримышечно 5 мг/кг СВ003.1, СВ010.7, Synagis® или средо-носитель (n=5 в группе) в верхнюю часть задней конечности (четырёхглавую мышцу). В день 0 хлопковых хомяков заражали $10^{5.4}$ БОЕ штамма RSV-A/Long путем интраназальной инстилляцией 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 по сравнению со средо-носителем уменьшают инфекционные титры вируса в легких и носовых раковинах и нагрузку вирусной РНК (фиг. 8). Инфекционные титры вируса в легких (\log_{10} БОЕ/г) снижались до 2,456 и 1,559 \log_{10} при использовании антител СВ003.1 и СВ010.7, соответственно, тогда как результатом терапевтической обработки с использованием CR9514 (3D3) было уменьшение лишь до 0,801 \log_{10} .

Пример 15. Терапевтическая эффективность mAb к G

Для определения того, проявляет ли mAb к G терапевтическую эффективность *in vivo*, mAb СВ003.1 и СВ010.7 исследовали 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 инстилляцией 100 мкл (50 мкл в каждую ноздрю). Через 1 день после заражения посредством внутрисердечной инъекции вводили 50 мг/кг СВ003.1, СВ010.7, Synagis® (n=14 на группу) или средо-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 по сравнению со средо-носителем уменьшают инфекционные титры вируса в легких и носовых раковинах, но не нагрузку вирусной РНК в легких (фиг. 9). Инфекционные титры вируса в легких (\log_{10} БОЕ/г) снижались до 2,348 и 1,736 \log_{10} при использовании антител СВ003.1 и СВ010.7, 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. 10), тогда как CR9514 (3D3) снижало баллы лишь в отношении интерстициальной пневмонии.

Последовательности

>CB058.1 VH - SEQ ID NO: 37
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIRGSVDNT
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDPALYCSGETCFSDLTDWGQGLT
 VTVSS

>CB058.1 VK - SEQ ID NO: 38
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASTLPSGV
 PSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDSATYFCQHYIRYPHTFGQGTKLEIK

>CB048.3 VH - SEQ ID NO: 39
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNHGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNKK
 YYADSVKGRFTVSRDNKNTLSLQMDSLRAEDTAIYYCAKTTFFYFDDSNYYEYLDYWGQGLT
 TVSS

>CB048.3 VK - SEQ ID NO: 40
 DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGIRSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGV
 PSRFGSGSGTEFTLTISSLPEDSATYYCQQLNTSPPYTFGQGTKLEIK

>CB010.7 VH - SEQ ID NO: 41
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNTHGMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGTGK
 YHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAIYYCAKVGELRSFDWLLADGTAYYYYGMD
 VWGQCTTVTVSS

>CB010.7 VK - SEQ ID NO: 42
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWFQQKPGQPPRLINWAS
 TREFGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYYCHQYYSIPLTFGGGKVEIK

>CB003.1 VH - SEQ ID NO: 43
 QVQLVQSGPELRKPGASVTVSCKASGYTFTTYIHWVRQAPGGGLDWMGMINTGSGVT
 SYAQKQFQGRVAMTRDTSTSTVFMELSSLRFEDTALYYCARMYSGSWYPFDYWGQALVTVSS

>CB003.1 VK - SEQ ID NO: 44
 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNINGNYLAWYQQKPLAPRLLIYEASSRATG
 IPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFGVYYCQYGTSPFFTFGPGTKVDIK

>CB028.2 VH -SEQ ID NO: 45
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYGITWVRQAPGQGLEWGMWISGDSNT
 NYAQNLRVRLTITDISTRAYMELRSLKPDDTAMYYCARALAKWYCSSSSCFGGGSCYSYD
 WGQGLVTVSS

>CB028.2 VK -SEQ ID NO: 46
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGMNLYNLYWYQQKPKAPPELLIYAASTLQSGV
 PSRFGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYFCQSFSTPLTFGGGKVEIK

> CB002.1 VH - SEQ ID NO: 47

QVQLQESGPRLVKPSSETLSLTCTVSGGSTSSYFVNWIRQPPGKLEWIGYIYSGSAD
YNPSLKS RVTISIDTSKTQFSLKLT SVTAADTAVYYCARS GFCTNDACYRRGSWFDPWGQGTL
VTVSS

> CB002.1 VK - SEQ ID NO: 48

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDNYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLVSSLHPEDFATYYCQQSYSTLTWTFGQGTKVEIK

SEQ ID: 127 (pCP9-каппа последовательность)

TACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG
ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACA
ATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCT
GAGTAGTGC GCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAG
AATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTGGCCATTAGCCA
TATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATC
CATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGAT
TATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCCAT
TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT
TATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGC
GGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCC
ACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTC
GTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCTATATAA
GCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCC
ATAGAAGACACGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTAC
CGAGCTCGGATCCTTAATTAACCTCGAGGCCGAGCCGGGCGAGCCAGACACTGGACGCTGA
ACCTCGCGGACAGTTAAGAACCAGGGGCCCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCCACACCG
CGGTACATGGCACACCTCTCTTGACGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCA
CCCTCCTCCAAGACACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCG
GCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGC
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAG
AGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCC
TGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGCTGCCT
CTTACCCGGAGGCTCTGCCCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCC

CCAGGCTCTGGGCAGGCACGGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGG
TGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCACC
CCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCCAGATTCCAGTAAC
TCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC
AGGTAAGCCAGCCCAGGCCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTG
CATCCAGGGACAGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCT
CCCGGACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCC
TCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCCGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGCTAGCGAATTC
ACCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCTCCCGGTGCCTTCTTGGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTCT
TTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGG
TGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC
GGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCCACGC
GCCCTGTAGCGGCGATTAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT
TGCCAGCGCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGC
TTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCAC
CTCGACCCAAAAAATTTGATTAGGGTGTGGTTTACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACG
GTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAATGGA
ACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCC
TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGAATTAATCTGTGGAATGTGT
GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC
TCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGAAA
GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAA
CTCCGCCAGTTCCGCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGG
CCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAG
GTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTTGATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGAT

GAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG
AGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCC
GGCTGTCAAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTG
TGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG
ATCTCCTGTCACTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC
GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC
GAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG
GGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCG
TCGTGACCCATGGCGATGCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTG
ATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCG
CTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCT
GGGGTTCGGTGCTACGAGATTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAA
TCGTTTTCCGGGACGCGGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGTGGAGTTCTTCG
CCCACCCCAACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATT
TCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT
CTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
TTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGGCTCACTGCCCG
CTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTT
TTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCAATGGTTATATAGC
ATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTA
TATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA
ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
CGGTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAG
TTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTGAC
GCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATC
CAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGGCGCGCCAGAT
CTGCGGCCGCTAGGAAGAACTCAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGC

TATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCG
CAAACAACACACCCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCTC
AGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT
CTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
AGAGTGTTAGTTAACGGATCGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAG
CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTC
TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCA
GCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGC
TTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAA
AGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACG
CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
CGTTCAGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA
CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACCTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTAT
CTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACA
AACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGG
ATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACG
TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATAAAA
ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT
AATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACC
GCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGA
GCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGC
TAGAGTAAGTAGTTCCGCGTAAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGT
GGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGT
TACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAG
AAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCCTTACTGT

CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA
GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAG
CAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTT
ACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTT
TACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAAT
AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA

SEQ ID: 128 (pCP9-лямбда последовательность)

ТАСТТТСТТТТТСААТАТТАТГААГСАТТТАТСАГГГТТАТТГТСТСАТГАГСГГ
АТАСАТАТТГААТГАТТТАГАААААТАААСАААТАГГГГТТССГСГСАТТТССССГАА
АГТСССАСТГАСГТСГАСГГАТССГГАГАТСТССГАТССССТАТГГТГСАСТСТСАГТАСА
АТСТГСТГТГАТСССГАТАГТТААГССАГТАТСТГСТСССТГСТТГТГТТГГАГГТСГСТ
ГАГТАГТГСГСГАСГААААТТААГСТАСААСААГГААГГТТАСГСАСААТТГАТГААГ
ААТСТГСТТАГГГТТАГГСГТТТТГСГСТГСТТСГТАГГТГТСААТАТТГССАТТАГССА
ТАТТАТТАТТГАТТТАТАТАГАСАААТАСААТАТТГГСТАТТГССАТТГСАТАСГТТГТАТ
САТАТСААТАТГАТАТТАТАТТГГСТСАТГТССАСАТАТАСССГАТГТГАСАТТГАТ
ТАТТАГТАГТАТТААТАГАТААТАСААТАТАСГГГГТСАТТАГТТСАТАСГСАТАТАТГАГ
ТСССГГТТАСАТААСТТАСГГТАААТГСССГССТГГСТГАССССААСГАССССГСССАТ
ТГАСГТСААТААТГАСГТАТГТТССАТАГТААСГСААТАГГГАСТТТССАТТГАСГТСААТ
ГГГТГГАГТАТТАСГГТААСТГСССАСТТГСАГТАСАТААГТГАТСАТАТГССААГТА
СГССССТАТТГАСГТСААТГАСГГТАААТГСССГССТГГСАТТАТГСССАГТАСАТАСГСТ
ТАТГГГАСТТТСТТАСТТГСАГТАСАТСТТАСГТАТТАГТСАТСГСТАТТАСАТГГТГАТГС
ГГТТТТГСАГТАСАТАСААТГГСГТГГАТАСГГТТТАСГТТАСГГГГАТТТССААГТСТС
АСССАТТГАСГТСААТГГГАГТТТГТТТТГСАССАААТАСАСГГГАСТТТССАААТГТ
ГТААСАСТСГССССАТТГАСГСААТГГСГГТАГГСГТТАСГГТГГГАГГТТАТАТАА
ГСАГАГТСГТТТАГТГААССГТАГАТСГССТГГАГАСГСАТАСССАСГТТТТАССТС
АТАГААГАСАСССГГАССГАТССАГССТСГСГСГСГГГААССГТГАТТГААГСТТГГТАС
СГАГТСГГАТССТТААТТААСТСГАГСССГАСССГГГГАСССГАСАСТТГГАСГТГА
АСТСГСГГАСГАТТААГААССАГГГССТТТГСГССТТГГССАСГТСТГТСССАССС
СГГТСАТАТГСАССАСТСТТТГСАСГСТТССААААГГССАТСГГТТТССССТТГСА
ССТССТССААГАСАСТСТТГГГГСАСАСГСГССТТГГГТГССТТГТГААГАСТТАСТТ
СССААССГТГАСГГТГТСГТГГААСТСАСГСГССТТГАССАСГСГТГСАСАСТТССС
ГСТГТСТТАСГТСТТАСГТАСТТАСТССТТАСГАСГТГГТГАССГТСССТТАСГАС
ТТГГСАССАСГАСТТАСАТТГСААСГТААТТАСАААААААААААААААААААААААААААА
АГАГТТГГТГАГАГССАСГАА
ТГССТТГАСГАТСССГСТАТГАСГТССАГТССААААААААААААААААААААААААААААА
СТТАСССГААА

CCAGGCTCTGGGCAGGCACGGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGG
TGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCACC
CCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCCAGATTCCAGTAAC
TCCCAATCTTCTCTGACAGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCC
AGGTAAGCCAGCCCAGGCCCTCGCCCTCAGCTCAAGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTG
CATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT
CCCGGACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCGACCCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGCCACATGGACAGAGCCGGCTCGGCCACCC
TCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGCTAGCGAATTC
ACCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCTTACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTCT
TTCCTAATAAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCATTCTGGGGG
TGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC
GGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCCACGC
GCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT
TGCCAGCGCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCCGGC
TTTCCCCGTCAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCAC
CTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACG
GTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGA
ACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCC
TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATCTGTGGAATGTGT
GTCAGTTAGGGTGTGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC
TCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA
GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCCCCCCTAACCTCCGCCATCCCCGCCCTAA
CTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATGCAGAGG
CCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAG
GCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGAT

GAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG
AGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGGTGTTCC
GGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTG
TGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG
ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGGC
GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC
GAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG
GGCTCGGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCG
TCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTG
ATATTGCTGAAGAGCTTGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCG
CTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGACGGGACTCT
GGGGTTCGGTGCTACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAA
TCGTTTTCCGGGACCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG
CCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAGCAATAGCATCACAAATT
TCACAAAATAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT
CTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
TTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG
CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTT
TTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTTCATTGGTTATATAGC
ATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTA
TATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA
ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
CGGTAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG
TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGAC
GCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATC
CAGCCTCCGCGCCGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGGCGCGCCAGAT
CTGCGGCCGCTAGGAAGAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGC

TATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCG
 CAAACAACACACCCCAAGGGCAGAACTTTGTACTTAAACACCATCTGTTTGTCTTTCTC
 AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGC
 CAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG
 GAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCTCCAAACAAGCAA
 CAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAG
 CTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATG
 TTCATAGAGTTAACGGATCGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGC
 CTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGAC
 CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCT
 GAGTAGGTGTCATTTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGA
 AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAAGAACAG
 CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGCGGTTTGCATTTGGGCGCTTCCGCT
 TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA
 AAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
 GGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
 CCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTA
 TAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCG
 CTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGC
 TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
 GTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
 GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT
 GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATC
 TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA
 ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGA
 TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGT
 TAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAA
 TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTA
 ATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
 GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCGAGTGTGCAATGATACCG
 CGAGACCCACGCTCACCGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
 CGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
 AGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTAAAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG
 GTGTCAGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTT
 ACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGA
 AGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTG
 ATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTTGAGAATAG
 TGATGCGCGGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC
 AGAACTTTAAAGTGTCTCATCTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTA
 CCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTT
 ACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATA
 AGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, способное специфично связываться с G-белком респираторного синцитиального вируса (RSV) и способное нейтрализовать А и В штаммы RSV, где антитело связывается с эпитопом в центральном консервативном домене G-белка RSV и где указанный эпитоп содержит одну или более аминокислот из аминокислот 161-169, в частности аминокислот 162-168 G-белка RSV A2 штамма RSV, где антитело содержит 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: 13, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 14 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 15.

2. Антитело, способное специфично связываться с G-белком респираторного синцитиального вируса (RSV) и способное нейтрализовать А и В штаммы RSV, где антитело связывается с эпитопом в цен-

тральном консервативном домене G-белка RSV и где указанный эпитоп содержит одну или более аминокислот из аминокислот 161-169, в частности аминокислот 162-168 G-белка RSV A2 штамма RSV или соответствующие аминокислоты других штаммов, где антитело содержит CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6, CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 16, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 17 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 18.

3. Антитело, способное специфично связываться с G-белком респираторного синцитиального вируса (RSV) и способное нейтрализовать А и В штаммы RSV, где антитело связывается с эпитопом в центральном консервативном домене G-белка RSV и где указанный эпитоп содержит одну или более аминокислот из аминокислот 161-169, в частности аминокислот 162-168 G-белка RSV A2 штамма RSV или соответствующие аминокислоты других штаммов, 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: 19, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 20 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 21.

4. Антитело, способное специфично связываться с G-белком респираторного синцитиального вируса (RSV) и способное нейтрализовать А и В штаммы RSV, где антитело связывается с эпитопом в центральном консервативном домене G-белка RSV и где указанный эпитоп содержит одну или более аминокислот из аминокислот 161-169, в частности аминокислот 162-168 G-белка RSV A2 штамма RSV или соответствующие аминокислоты других штаммов, где антитело содержит CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1 и CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 12, 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.

5. Антитело, способное специфично связываться с G-белком респираторного синцитиального вируса (RSV) и способное нейтрализовать А и В штаммы RSV, где антитело связывается с эпитопом в центральном консервативном домене G-белка RSV и где указанный эпитоп содержит одну или более аминокислот из аминокислот 161-169, в частности аминокислот 162-168 G-белка RSV A2 штамма RSV или соответствующие аминокислоты других штаммов, где антитело содержит 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.

6. Антитело, способное специфично связываться с G-белком респираторного синцитиального вируса (RSV) и способное нейтрализовать А и В штаммы RSV, где антитело связывается с эпитопом в центральном консервативном домене G-белка RSV и где указанный эпитоп содержит одну или более аминокислот из аминокислот 161-169, в частности аминокислот 162-168 G-белка RSV A2 штамма RSV или соответствующие аминокислоты других штаммов, где антитело содержит 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.

7. Антитело по любому из пп.1-6, где антитело представляет собой антитело человека.

8. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-7.

9. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп.1-7 или антигенсвязывающий фрагмент по п.8 и по меньшей мере одно терапевтическое средство и/или выявляемое средство.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по любому из пп.1-7 или антигенсвязывающий фрагмент по п.8.

11. Экспрессионный вектор, содержащий по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты по п.10.

12. Клетка-хозяин для получения антитела по любому из пп.1-7 или антигенсвязывающего фрагмента по п.8, содержащая по меньшей мере один вектор по п.11.

13. Способ получения антитела по любому из пп.1-7 или антигенсвязывающего фрагмента по п.8, где способ предусматривает следующие этапы:

а) культивирование клетки-хозяина по п.12 в условиях, способствующих экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и

б) выделение экспрессированного антитела и/или антигенсвязывающего фрагмента.

14. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения инфекции RSV, содержащая антитело по любому из пп.1-7 или антигенсвязывающий фрагмент по п.8 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

15. Применение антитела по любому из пп.1-7 в профилактике или лечении инфекции RSV.

16. Применение антигенсвязывающего фрагмента по п.8 в профилактике или лечении инфекции RSV.

17. Применение фармацевтической композиции по п.14 в профилактике или лечении инфекции RSV.

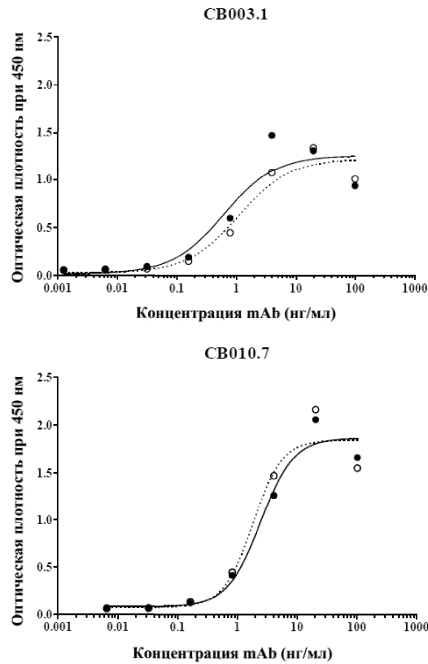
18. Набор для профилактики или лечения инфекции RSV, содержащий по меньшей мере одно анти-

тело по любому из пп.1-7, или антигенсвязывающий фрагмент по п.8, или фармацевтическую композицию по п.14, или их комбинацию и инструкции по применению.

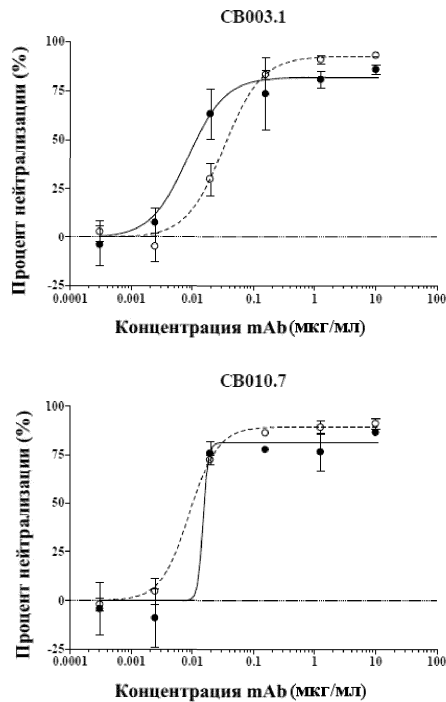
19. Способ выявления инфекции RSV, предусматривающий:

(а) анализ в образце уровня антигена RSV путем приведения образца в контакт с диагностически эффективным количеством антитела по любому из пп.1-7, антигенсвязывающего фрагмента по п.8 и/или иммуноконъюгата по п.9 и

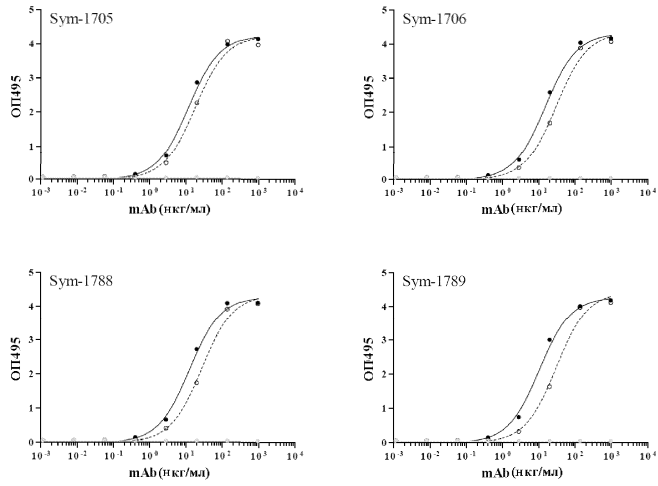
(б) сравнение анализируемого уровня антигена RSV с контрольным уровнем, где увеличение анализируемого уровня антигена RSV по сравнению с контрольным уровнем указывает на инфекцию RSV.



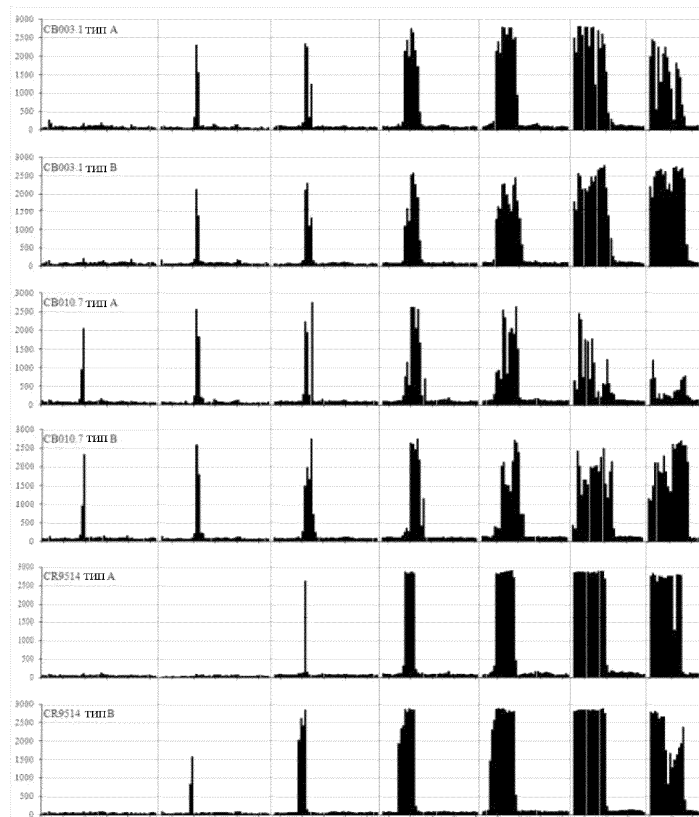
Фиг. 1



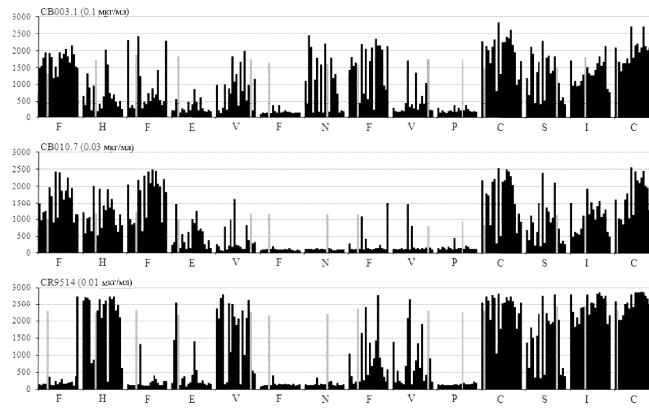
Фиг. 2



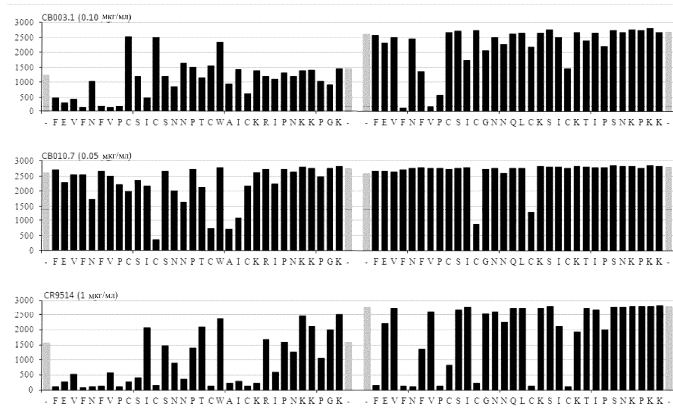
Фиг. 3



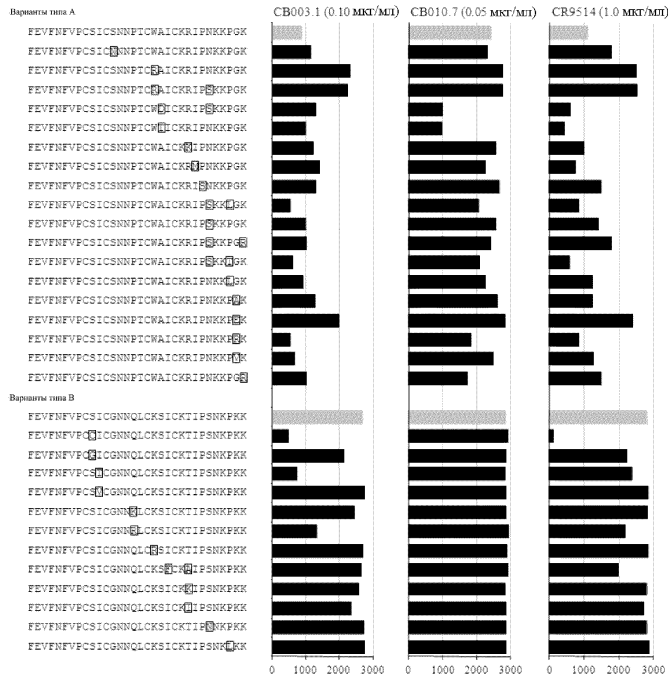
Фиг. 4



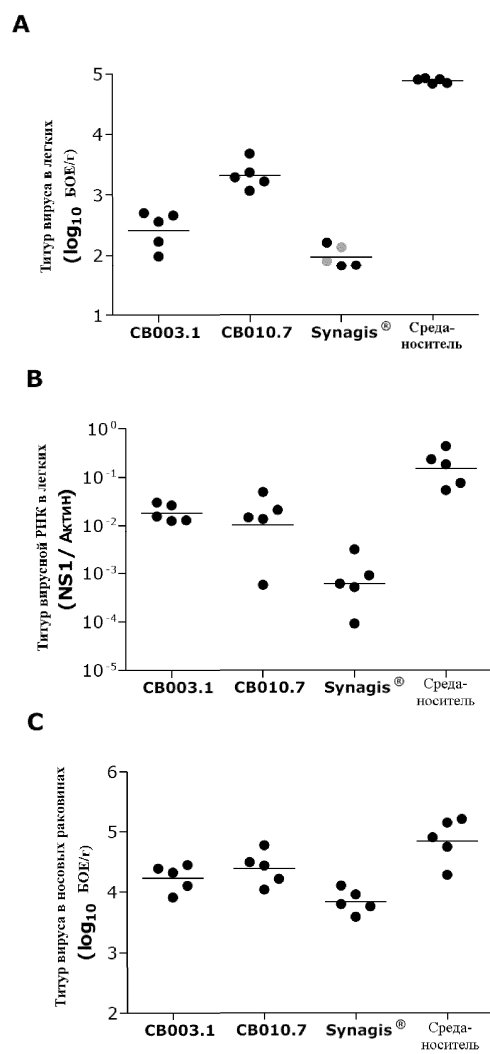
Фиг. 5



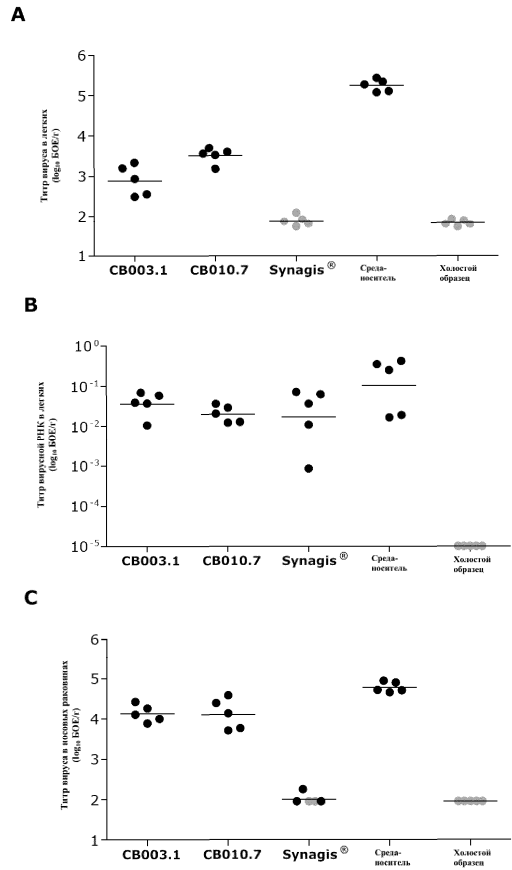
Фиг. 6



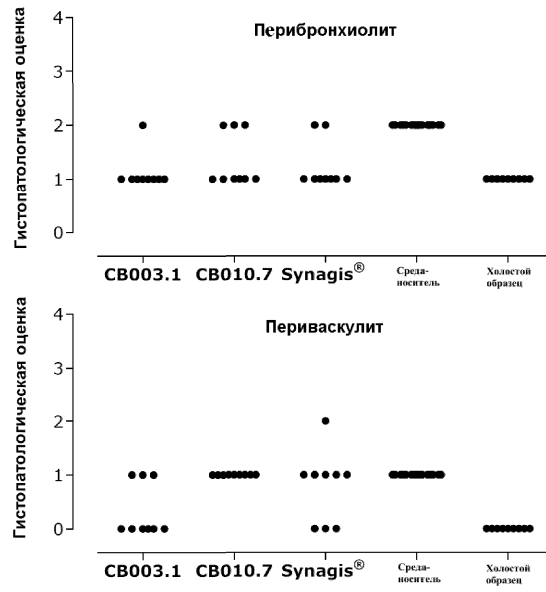
Фиг. 7

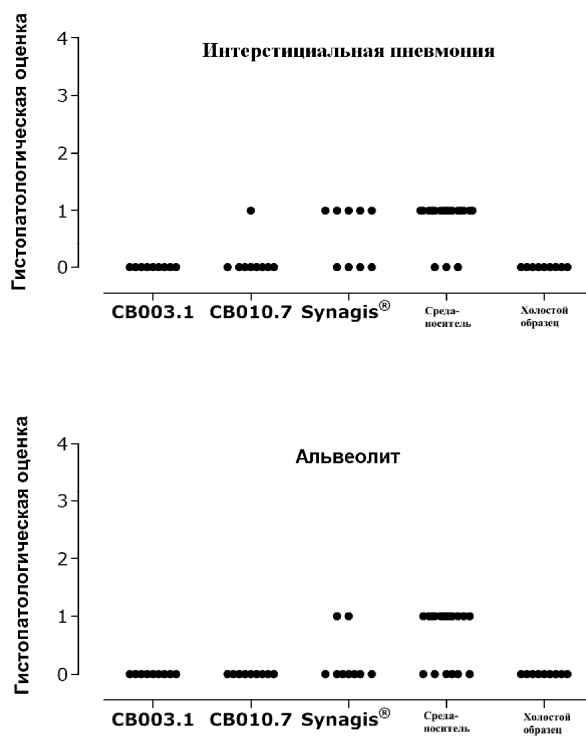


Фиг. 8



Фиг. 9





Фиг. 10

