(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 037060 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.01

(21) Номер заявки
201792220

(22) Дата подачи заявки
2016.04.14

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(54) ОПОСРЕДУЕМАЯ АНТИТЕЛОМ НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ ВИРУСА ЧИКУНГУНЬЯ

(31) **62/147,354**
(32) **2015.04.14**
(33) **US**
(43) **2018.03.30**
(86) **PCT/US2016/027466**
(87) **WO 2016/168417 2016.10.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВАНДЕРБИЛТ ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
Кроу Джеймс Э., Смит Скотт А., Дермоди Теренс, Силва Лори (US)

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

(56) WO-A1-2015010125
US-A1-20130189279
CHUA et al. "Characterisation of mouse monoclonal antibodies targeting linear epitopes on Chikungunya virus E2 glycoprotein," Journal of Virological Methods, 14 October 2013 (14.10.2013), Vol. 195, Pgs. 126-133, entire document
GOH et al. "Neutralizing monoclonal antibodies to the E2 protein of chikungunya virus protects against disease in a mouse model", Clinical Immunology, 12 October 2013 (12.10.2013), Vol. 149, Iss. 3, Pgs. 487-497, entire document
SELVARAJAH et al. "A Neutralizing Monoclonal Antibody Targeting the Acid-Sensitive Region in Chikungunya Virus E2 Protects from Disease," PLoS Neglected Tropical Diseases, 12 September 2013 (12.09.2013), Vol. 7, Iss. 9, Pgs. 1-11, entire document

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, связывающим и нейтрализующим вирус чикунгунья (CHIKV), и к способам их применения.

037060 B1

037060 B1

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявке США с серийным номером № 62/147354, поданной 14 апреля 2015 года, полное содержание которой включено в настоящее описание путем ссылки.

Уровень техники

Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства в форме грантов с номерами K08 AI103038, F32 AI096833 и U54 AI057157, выданных National Institutes of Health. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится главным образом к областям медицины, инфекционных заболеваний и иммунологии. Более конкретно изобретение относится к антителам, которые нейтрализуют вирус чикунгунья.

Уровень техники

Вирус чикунгунья (CHIKV) представляет собой оболочечный вирус с положительной смысловой РНК рода альфавирусов семейства Togaviridae, и он передается комарами Aedes. Зрелый вирион CHIKV содержит два гликопротеина: E1 и E2, которые образуются из белка-предшественника p62-E1 посредством протеолитического расщепления. E2 функционирует при прикреплении вируса, в то время как E1 опосредует слияние мембран для обеспечения вхождения вируса (Kielian et al., 2010). У человека инфекция CHIKV вызывает лихорадку и боль в суставах, которая может быть тяжелой и в некоторых случаях длится годами (Schilte et al., 2013; Sissoko et al., 2009; Staples et al., 2009). CHIKV вызывал вспышки в большинстве регионов Африки южнее Сахары, а также в частях Азии, Европы и Индийского и Тихого океанов. В декабре 2013 года произошла первая передача CHIKV в Западном полушарии, причем аутохтонные случаи были идентифицированы на острове Святого Мартина (CDC 2013). Вирус быстро распространился практически на все острова Карибского моря, а также на Центральную, Южную и Северную Америку. Сообщалось о более миллиона предполагаемых случаев CHIKV в Западном полушарии менее чем за год, и была документально подтверждена эндемическая передача более чем в 40 странах, в том числе в США (CDC 2014). В настоящее время не существует лицензированной вакцины или противовирусной терапии для предупреждения или лечения инфекции CHIKV.

Хотя механизмы защитного иммунитета против инфекции CHIKV понятны не до конца, гуморальный ответ контролирует инфекцию и ограничивает повреждение тканей (Chu et al., 2013; Hallengard et al., 2014; Hawman et al., 2013; Kam et al., 2012b; Lum et al., 2013; Pal et al., 2013). Иммунный γ-глобулин человека нейтрализует инфекционность в культивируемых клетках и препятствует заболеваемости у мышей при введении через вплоть до 24 ч после инокуляции вируса (Couderc et al., 2009). Описано несколько моноклональных антител (mAb) мыши, которые нейтрализуют инфекцию CHIKV (Brehin et al., 2008; Goh et al., 2013; Masrinoul et al., 2014; Pal et al., 2013; Pal et al., 2014), причем некоторые обладали эффективностью при использовании в комбинации для лечения мышей или не являющихся человеком приматов после заражения CHIKV (Pal et al., 2013; Pal et al., 2014). Для сравнения, было описано ограниченное количество mAb человека против CHIKV, широкое большинство из которых демонстрируют умеренную нейтрализующую активность (Fong et al., 2014; Fric et al., 2013; Lee et al., 2011; Selvarajah et al., 2013; Warter et al., 2011).

Сущность изобретения

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предусматривается способ обнаружения инфекции вирусом чикунгунья у субъекта, включающий (a) приведение в контакт образца от указанного субъекта с антителом или фрагментом антитела, имеющим последовательности CDR парных тяжелой и легкой цепей клонов из табл. 3 и 4 соответственно; и (b) обнаружение гликопротеина E2 вируса чикунгунья в указанном образце по связыванию указанного антитела или фрагмента антитела с E2 в указанном образце. Образец может представлять собой жидкость организма, такую как кровь, мокрота, слезная жидкость, слюна, слизь или сыворотка, моча или кал. Выявление может включать ELISA, RIA или вестерн-блоттинг. Кроме того, способ может включать выполнение стадий (a) и (b) второй раз и определение изменения уровней E2 по сравнению с первым анализом. Антитело может кодироваться парными вариабельными последовательностями клонов, как указано в табл. 1, или может кодироваться вариабельными последовательностями легкой и тяжелой цепей, обладающими 70, 80, 90 или 95% идентичностью с парными вариабельными последовательностями клонов, как указано в табл.1, или может иметь вариабельные последовательности легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся парными последовательностями клонов, как указано в табл. 2, или обладающие 70, 80, 90 или 95% идентичностью с парными последовательностями клонов из табл.2. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное антитело ScFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab-фрагмент, $F(ab')_2$-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой IgG-антитело и/или химерное антитело.

В другом варианте осуществления предусматривается способ лечения субъекта, инфицированного вирусом чикунгунья, или уменьшения вероятности инфицирования субъекта, имеющего риск контактирования с вирусом чикунгунья, включающий доставку указанному индивидууму антитела или фрагмента антитела, имеющих последовательности CDR парных тяжелой и легкой цепей клонов из табл. 3 и 4 соответственно. Антитело может кодироваться парными вариабельными последовательностями клонов, как

указано в табл.1, или может кодироваться вариабельными последовательностями легкой и тяжелой цепей, обладающими 70, 80, 90 или 95% идентичностью с парными вариабельными последовательностями клонов, как указано в табл.1, или может иметь вариабельные последовательности легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся парными последовательностями клонов, как указано в табл.2, или обладающие 70, 80, 90 или 95% идентичностью с парными последовательностями клонов из табл. 2. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное антитело ScFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab-фрагмент, $F(ab')_2$-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой IgG-антитело и/или химерное антитело. Антитело или фрагмент антитела можно вводить до инфицирования или после инфицирования. Доставка может включать введение антитела или фрагмента антитела или генетическую доставку посредством последовательности РНК или ДНК или вектора, кодирующих антитело или фрагмент антитела.

В следующем варианте осуществления предусматривается моноклональное антитело, где антитело характеризуется последовательностями CDR парных тяжелой и легкой цепей клонов из табл.3 и 4 соответственно. Антитело может кодироваться парными вариабельными последовательностями клонов, как указано в табл. 1, или может кодироваться вариабельными последовательностями легкой и тяжелой цепей, обладающими 70, 80, 90 или 95% идентичностью с парными вариабельными последовательностями клонов, как указано в табл.1, или может иметь вариабельные последовательности легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся парными последовательностями клонов, как указано в табл.2, или обладающие 70, 80, 90 или 95% идентичностью с парными последовательностями клонов из табл. 2. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное антитело ScFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab-фрагмент, $F(ab')_2$-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой химерное антитело или биспецифическое антитело, которое нацелено на антиген вируса чикунгунья, отличный от гликопротеина. Антитело может представлять собой IgG. Кроме того, антитело или фрагмент антитела содержит проникающий в клетку пептид и/или представляет собой интраантитело.

Также предусматривается гибридома или сконструированная клетка, кодирующая антитело или фрагмент антитела, где антитело или фрагмент антитела характеризуется последовательностями CDR парных тяжелой и легкой цепей клонов из табл.3 и 4 соответственно. Антитело или фрагмент антитела может кодироваться парными вариабельными последовательностями клонов, как указано в табл.1, или может кодироваться вариабельными последовательностями легкой и тяжелой цепей, обладающими 70, 80, 90 или 95% идентичностью с парными вариабельными последовательностями клонов, как указано в табл.1, или может иметь вариабельные последовательности легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся парными последовательностями клонов, как указано в табл. 2, или обладающие 70, 80, 90 или 95% идентичностью с парными последовательностями клонов из табл. 2. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное антитело ScFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab-фрагмент, $F(ab')_2$-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой химерное антитело и/или IgG. Кроме того, антитело или фрагмент антитела может содержать проникающий в клетку пептид и/или представлять собой интраантитело.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит пары вариабельных последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53/54, 55/56, 57/58, 59/60, 61/62, 63/64, 65/66, 67/68, 70/71, 72/73, 74/75, 76/77, 81/82, 83/84, 85/86, 87/88, 89/90, 91/92, 93/94, 95/96 и 97/98.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 103, 104 и 105 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 187, 188 и 189 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 106, 107 и 108 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 190, 191 и 192 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 109, 110 и 111 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 193, 194 и 195 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 196, 197 и 198 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 115, 116 и 117 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 199, 200 и 201 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 118, 119 и 120 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 202, 203 и 204 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 121, 122 и 123 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 205, 206 и 207 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 124, 125 и 126 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 208, 209 и 210 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 130, 131 и 132 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 211, 212 и 213 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 133, 134 и 135 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 214, 215 и 216 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 136, 137 и 138 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 217, 218 и 219 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 139, 140 и 141 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 220, 221 и 222 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 151, 152 и 153 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 223, 224 и 225 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 154, 155 и 156 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 226, 227 и 228 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 157, 158 и 159 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 229, 230 и 231 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 160, 161 и 162 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 232, 233 и 234 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит

аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 163, 164 и 165 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 235, 236 и 237 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 166, 167 и 168 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 238, 239 и 240 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 169, 170 и 171 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 241, 242 и 243 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 244, 245 и 246 соответственно.

В одном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 SEQ ID NO: 175, 176 и 177 соответственно и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 SEQ ID NO: 247, 248 и 249 соответственно.

Использование формы единственного числа совместно с термином "содержащий" в формуле изобретения и/или описании может означать "один", но также оно соответствует значению "один или несколько", "по меньшей мере один" и "один или более одного". Слово "приблизительно" означает плюс или минус 5% от указанной величины.

Предусматривается, что любой способ или композиция, описанные в настоящем описании, могут быть осуществлены с помощью любого другого способа или композиции, описанных в настоящем описании. Другие задачи, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на конкретные варианты осуществления изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации, являющиеся частью сущности и объема изобретения, станут понятны специалистам в данной области из настоящего подробного описания.

Краткое описание чертежей

Следующие чертежи являются частью настоящего описания и включены для дальнейшей демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может стать более понятным с помощью одного или нескольких из этих чертежей в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, описанных в настоящем описании.

Фиг. 1A-C. Структурный анализ остатков E2, важных для связывания mAb. Фиг. 1A. Выравнивание последовательностей E2 из штаммов CHIKV, использованных в этом исследовании. Название штамма указано слева (S27, SEQ ID NO: 1, номер доступа AF369024.2; SL15649, номер доступа GU189061; LR2006_OPY1, номер доступа DQ443544.2; 99659, номер доступа KJ451624; RSU1, номер доступа HM045797.1; N1 64 IbH35, номер доступа HM045786.1). Номера над последовательностями соответствуют положению аминокислот в зрелом белке E2. Аминокислоты, идентичные аминокислотам штамма S27, указаны пунктирной линией. Домены E2, определенные из кристаллической структуры гетеродимера E2/E1 CHIKV (Voss et al., 2010), представлены на диаграмме над выравниванием последовательностей и кодируются цветом (синий: домен A, фиолетовый: β-ленточный соединительный элемент, зеленый: домен B, розовый: домен C, темно-серый: области, не присутствующие в кристаллической структуре). Положение остатков, в которых замена на аланин нарушает связывание mAb, как определяют посредством аланин-сканирующего мутагенеза, обозначены кодируемыми цветом точками над выравниванием для каждого конкретного антитела. Остатки, которые влияют на связывание множества антител, указаны квадратами, затененными серым цветом, причем чем более темной является тень серого цвета, тем на большее количество антител влияет замена на аланин данного остатка. Фиг. 1B. Положение остатков, требуемых для связывания mAb, картированных на кристаллической структуре зрелого гликопротеинового комплекса оболочки (PDB ID 3N41). Показан вид сбоку ленточного чертежа одного гетеродимера E1/E2, причем E1 окрашен голубым цветом, а домены E2 окрашены так, как на панели A. Боковые цепи аминокислот, требуемых для связывания антитела, показаны в качестве заполняющих пространство форм и кодируются цветом для каждого из 20 индивидуальных антител согласно легенде на панели A. Остатки, которые влияют на связывание множества антител, представлены в виде теней серого цвета, причем чем более темной является тень, тем на большее количество антител влияет замена на аланин в

данном остатке (легенда, показанная слева). Фиг. 1C. Вид сверху гетеродимера E1/E2, повернутого на 90° относительно структуры на фиг. 1B.

Фиг. 2A, B. Механизм нейтрализации посредством mAb человека против CHIKV. Фиг. 2A. Анализы нейтрализации до и после прикрепления. VRP SL15649 (i) инкубировали с указанными mAb (включая CHK-152, положительное контрольное mAb) при 4°C в течение 1 ч перед добавлением к предварительно охлажденным клеткам Vero, а затем не связавшийся вирус удаляли посредством трех промываний (до прикрепления; закрашенный круг), или (ii) им позволяли адсорбироваться на предварительно охлажденные клетки Vero при 4°C в течение 1 ч, а затем добавляли указанные mAb при 4°C в течение 1 ч (после прикрепления; незакрашенные круги). Фиг. 2B. Анализ FFWO. VRP SL15649 адсорбировали на предварительно охлажденные клетки Vero при 4°C в течение 1 ч, а затем добавляли указанные mAb (включая CHK-152, положительное контрольное mAb мыши) на 1 ч. Не связавшийся вирус удаляли и клетки подвергали воздействию среды с низким содержанием pH (pH 5,5; закрашенные круги) при 37°C в течение 2 мин для запуска слияния вируса с плазматической мембраной. В качестве отрицательного контроля клетки подвергали воздействию среды с нейтральным значением pH (pH 7,4; незакрашенные круги) при 37°C в течение 2 мин. Как для фиг. 2A, так и для фиг. 2B клетки инкубировали при 37°C до 18 ч после инфицирования и GFP-положительные клетки количественно определяли с использованием флуоресцентной микроскопии. Данные объединены для двух независимых экспериментов, каждый из которых проводился в трех экземплярах.

Фиг. 3A-D. Терапия посредством mAb человека против летальной инфекции CHIKV у мышей $Ifnar^{-/-}$. Фиг. 3A. Мышам вводили 50 мкг указанного специфичного к CHIKV или контрольного mAb посредством внутрибрюшинной инъекции за 24 ч до летального заражения CHIKV (n=3-6 мышей на исследуемое mAb). Фиг. 3B. Мышам вводили 50 мкг указанного специфичного к CHIKV или контрольного mAb посредством внутрибрюшинной инъекции через 24 ч после летального заражения CHIKV (n=4-6 мышей на исследуемое mAb). Фиг. 3C. Мышам вводили 250 мкг указанного специфичного к CHIKV или контрольного mAb посредством внутрибрюшинной инъекции через 48 ч после летального заражения CHIKV (n=7-10 мышей на исследуемое mAb). Фиг. 3D. Мышам вводили 250 мкг указанной пары специфичных к CHIKV mAb или контрольное mAb посредством внутрибрюшинной инъекции через 60 ч после летального заражения CHIKV (n=8 мышей на исследуемую комбинацию mAb, за исключением 4J21+2H1, для которой n=3). Для монотерапии посредством 4J21 или 4N12 вводили однократную дозу 500 мкг (n=4-5 мышей на исследуемое mAb).

Фиг. 4. Папулезная сыпь в период острого проявления. Индивидуум поступил к участковому терапевту с лихорадкой (102°F) длительностью трое суток с одновременным развитием билатеральной боли в суставах локтей и пальцев и сыпью. Врач отметил выступающую, незудящую, угасающую папулезную сыпь (фотография представлена на фигуре) на спине, груди и животе.

Фиг. 5. Идентификация групп конкурирующих mAb. Для отнесения mAb к группам конкуренции использовали количественное конкурентное связывание с использованием биослойной инферометрии на основе Octet. Наконечники биосенсора с антителами против пента-His, покрытые иммобилизованным эктодоменом E2 CHIKV-LR2006, погружали в лунки, содержавшие первичное mAb, а затем погружали в лунки, содержавшие конкурирующие mAb. Показанные величины представляют собой процентное связывание конкурирующего mAb в присутствии первого mAb (определенное посредством сравнения максимального сигнала конкурирующего mAb, внесенного после первого комплекса mAb, с максимальным сигналом конкурирующего mAb отдельно). MAb считали высоко конкурирующим за связывание с одним участком, если максимальное связывание конкурирующего mAb снижалось до <30% от его связывания без конкуренции (черные квадраты) или демонстрирующим частичную конкуренцию, если связывание конкурирующего mAb снижалось до <70% от его связывания без конкуренции (серые квадраты). Mab считали неконкурирующими, если максимальное связывание конкурирующего mAb составляло >70% от его связывания без конкуренции (белые квадраты). Было идентифицировано четыре группы конкурентного связывания, указанных цветными рамками. Соответствующие основные антигенные участки для mAb, обнаруженные посредством аланин-сканирующего мутагенеза (табл.1 и фиг. 1A-C), обобщенно представлены в столбцах справа от матрицы конкуренции. DA указывает на домен A; DB указывает домен B, e указывает как на дугу 1, так и на дугу 2; NT означает, что тестирование не проводили; "не реагирует" указывает на то, что mAb не реагировало с белками оболочки дикого типа; "без снижения" указывает на то, что mAb связывалось с белками E дикого типа, однако ни для какого мутанта не было отмечено воспроизводимого снижения. Данные объединены для одного эксперимента, причем для каждого mAb отдельно было несколько результатов считывания и для mAb в комбинации с каждым конкурирующим антителом был один результат считывания.

Фиг. 6A-F. Картирование эпитопов mAb против CHIKV высокого разрешения. (A) Конструировали библиотеку аланин-сканирующих мутаций для белка оболочки CHIKV, охватывающую 910 мутаций E2/E1, где каждую аминокислоту индивидуально подвергали мутации на аланин. Каждая лунка каждого планшета, являющегося матрицей мутаций, содержит один мутант с определенной заменой.

Представлены репрезентативные результаты реактивности в 384-луночном планшете. В каждый

планшет было включено восемь положительных (E2/E1 дикого типа) и восемь отрицательных (имитирующая трансфекция) контрольных лунок. (B) Для картирования эпитопов клетки HEK-293T человека, экспрессирующие библиотеку мутаций оболочки CHIKV, исследовали в отношении иммунореактивности с использованием представляющего интерес MAb (MAb 4G20, представленное в настоящем описании) и количественно определяли с использованием высокопроизводительного проточного цитометра Intellicyt. Первоначально идентифицировали клоны с реактивностью <30% относительно E2/E1 CHIKV дикого типа, но в то же время с >70% реактивностью в отношении отличающегося MAb против E2/E1 CHIKV в качестве ключевых для связывания MAb. (C) Мутация четырех индивидуальных остатков снижала связывание 4G20 (красные столбики), но не влияла в значительной степени на связывание других зависимых от конформации MAb (серые столбики) или поликлонального антитела кролика (rPAb, подарок от IBT Bioservices). Столбики соответствуют среднему значению и диапазону для по меньшей мере двух повторяющихся точек данных.

(D) Эпитопы нейтрализующих MAb с PRNT50 <1000 нг/мл картированы на трехмерных кристаллических структурах E2/E1 (PDB Entry 2XFC). Все нейтрализуемые эпитопы картируются на открытых дистальных относительно мембраны доменах E2/E1. Для ясности каждая индивидуальная гетеродимерная субъединица E2/E1 показана отличающимся цветом. Высокоиммуногенные области в доменах A и B E2, которые содержат ключевые остатки эпитопов для множества MAb, изображены красным цветом на единичной субъединице E2.

Фиг. 7. Структурный анализ остатков E2, важных для связывания mAb, для антител, картированных на группах конкуренции. Положение остатков, требуемых для связывания mAb человека или мыши из различных групп конкуренции (фиг. 1A-C), картированное на кристаллической структуре E1/E2 (PDB ID 2XFB). Пространственная модель тримера E1/E2, в которой E1 окрашен белым цветом и каждый мономер E2 окрашен светло-серым, темно-серым или черным. Остатки, требуемые для связывания антитела, кодируются цветом в соответствии с группой(ми) конкуренции, к которой они относятся. Красным цветом указаны остатки D117 и I121, которые требуются для связывания 5N23 и принадлежат к группе конкуренции 1. Синим цветом указаны остатки R80 и G253, которые требуются для связывания посредством 106 или 5M16 и принадлежат к группе конкуренции 2. Зеленым цветом указаны Q184, S185, I190, V197, R198, Y199, G209, L210, T212, и I217, которые требуются для связывания посредством CHK-285, CHK-88 или 3A2 и принадлежат к группе конкуренции 3. Оранжевым цветом указан остаток H18, который требуется для связывания 5F19 и принадлежит к группе конкуренции 4. Фиолетовым цветом указаны остатки E24, A33, L34, R36, V50, D63, F100, T155, которые требуются для связывания посредством 5N23, CHK-84 или CHK-141 и принадлежат к группам конкуренции 1 и 2. Сине-зеленым цветом указаны остатки T58, D59, D60, R68, I74, D77, T191, N193 и K234, которые требуются для связывания посредством 1H12 и принадлежат к группам конкуренции 2 и 3. Коричневым цветом указаны остатки D71, которые требуются для связывания посредством CHK-84 и 1H12 и принадлежат к группам конкуренции 1, 2 и 3. Желтым цветом указаны остатки (T58, D71, N72, I74, P75, A76, D77, S118 и R119), которые составляют предполагаемый связывающий рецептор домен (RBD), за исключением остатка D71, который принадлежит к группам конкуренции 1, 2 и 3. На верхней панели показан общий вид тримера, на средней панели показан вид сбоку тримера под углом 45° по оси x относительно структуры на верхней панели, и на нижней панели показан вид сбоку тримера под углом 45° по оси x относительно структуры на средней панели.

Фиг. 8. Механизм нейтрализации посредством двух mAb человека против CHIKV, 2H1 или 4N12. Анализы нейтрализации до и после связывания. Репликонные частицы вируса (VRP) CHIKV штамма SL15649 (1) инкубировали с указанными mAb (2H1 или 4N12) перед добавлением к предварительно охлажденным клеткам Vero, а затем не связавшийся вирус удаляли посредством трех промываний (до прикрепления; закрашенный круг), или (2) им позволяли адсорбироваться на предварительно охлажденные клетки Vero, а затем добавляли указанные mAb (после прикрепления; незакрашенные круги). Эти mAb осуществляли нейтрализацию при добавлении до или после прикрепления.

Фиг. 9. Модель острого заболевания на мышах B6.

Продуцированные CHO рекомбинантный антитела, введенные на 1 сутки, снижают уровень вируса в голеностопном суставе по сравнению с введением контрольного антитела на D+3. Эксперименты проводили на мышах WT в возрасте 4 недель после подкожной инокуляции 10^3 ФОЕ CHIKV-LR. Антитела вводили на D+1 и ткани собирали на D+3 для титрования посредством анализа подавления фокусообразования.

Фиг. 10. Модель острого заболевания на мышах B6. mAb 4N12 против CHKV, продуцированное в клетках CHO, введенное системно на 3 сутки, снижает титр вируса в голеностопных суставах. Эксперименты проводили у мышей WT в возрасте 4 недель после подкожной инокуляции 10e3 ФОЕ CHIKV-LR. Антитела вводили на D+3 и ткани собирали на D+5 для титрования посредством анализа подавления фокусообразования.

Фиг. 11. Модель хронического заболевания на мышах B6. mAb против CHKV, продуцированные в CHO, введенные системно на 3 сутки, снижают уровень геномных эквивалентов вируса на 28 сутки в голеностопных суставах. Эксперименты проводили у мышей WT в возрасте 4 недель после инокуляции

10e3 ФОЕ CHIKV-LR. Антитела (300 мкг) вводили D+3 и ткани собирали на D+28 для анализа посредством кОТ-ПЦР.

Фиг. 12. Модель летального заболевания на мышах с нокаутом INFNAR. mAb против CHKV, продуцированные в клетках CHO, введенные системно через 60 ч после инфицирования, усиливают выживаемость. Эксперименты проводили у мышей $IFNAR^{-/-}$ в возрасте 4-5 недель после подкожной инокуляции 10e3 ФОЕ CHIKV-LR. Антитела вводили через 60 ч после инфицирования и наблюдали за смертностью в течение 21 суток.

Фиг. 13. Кривые нейтрализации для продуцированных гибридомой ("старых") или рекомбинантных ("новых") специфичных к CHIKV mAb. Кривые нейтрализации строили для клеток BHK21. 100 ФОЕ CHIKV-LR смешивали с указанными mAb в течение 1 ч при 37°C, а затем добавляли к клеткам BHK21. Инфицирование определяли посредством анализа подавления фокусообразования.

Фиг. 14. Полумаксимальная эффективная ингибиторная концентрация (EC50; нг/мл) для продуцированных гибридомой против продуцированных рекомбинантными клетками CHO антител. Данные являются сходными для продуцированных гибридомой относительно рекомбинантных антител.

Фиг. 15. Выравнивание аминокислот и нуклеотидов для генов, которые кодируют белки как E1, так и E2. Номер доступа Genbank для белков приведен с штаммом вируса. Представлены три штамма для вирусов из прототипных групп: Восточной, Центральной, Южной Африки (ECSA), два для Азии и один западно-африканский штамм. Эти антитела перекрестно-реагируют со всеми штаммами.

Описание иллюстративных вариантов осуществления

Авторы изобретения выделили большую панель mAb человека, которые нейтрализуют инфекционность CHIKV в клеточной культуре и успешно лечили мышей $Ifnar^{-/-}$ (лишенных рецепторов интерферона типа I), которым была инокулирована летальная доза CHIKV, даже при введении только через 60 ч после инфицирования. Они идентифицировали домен A E2 в качестве основного антигенного центра для распознавания посредством mAb, которые широко нейтрализуют инфекцию CHIKV со сверхвысокой активностью, и продемонстрировали, что основным механизмом ингибирования является предотвращение слияния. Эти и другие аспекты изобретения описаны более подробно.

I. Чикунгунья и вирус чикунгунья.

Болезнь чикунгунья представляет собой инфекцию, вызываемую вирусом чикунгунья. Она характеризуется внезапной лихорадкой, обычно длящейся от двух до семи суток, и болью в суставах, обычно длящейся недели или месяцы, но иногда годы. Уровень смертности составляет немного меньше 1 на 1000, причем пожилые люди имеют большую вероятность погибнуть. Вирус передается людям двумя видами комаров рода Aedes: A. albopictus и A. aegypti. Животные, являющиеся резервуаром вируса, включают обезьян, птиц, крупный рогатый скот и грызунов. Это отличает его от денге, для которого хозяевами являются только приматы.

Наилучшим средством предупреждения является общий контроль комаров и избегание укусов какими-либо инфицированными комарами. Отсутствует известное специфическое лечение, однако можно использовать медикаментозную терапию для уменьшения симптомов. Также могут быть полезны покой и введение жидкостей.

Инкубационный период заболевания чикунгунья составляет от двух до двенадцати суток, обычно от трех до семи. Симптомы развиваются у от 72 до 97% инфицированных индивидуумов. Симптомы включают внезапное начало, иногда двухфазную лихорадку, обычно длящуюся от нескольких суток до недели, иногда вплоть до десяти суток, обычно выше 39°C (102°F) и иногда достигающую 41°C (104°F), и выраженную боль или скованность в суставах, обычно длящуюся недели или месяца, но иногда длящуюся годы. Также могут присутствовать сыпь (обычно макулопапулезная), мышечная боль, головная боль, усталость, тошнота или рвота. Может присутствовать воспаление глаз в форме иридоциклита или увеита, и могут встречаться очаги повреждения в сетчатке. Как правило, лихорадка длится в течение двух суток, а затем резко внезапно прекращается. Однако головная боль, бессонница и чрезвычайная степень слабости длятся в течение варьирующего периода, обычно приблизительно от пяти до семи суток.

Наблюдения последних эпидемий показали, что чикунгунья может вызывать длительные симптомы после острой инфекции. В ходе вспышки La Reunion в 2006 году более 50% индивидуумов в возрасте выше 45 лет сообщали о длительной боли в скелетных мышцах, причем вплоть до 60% человек описывали длительную боль в суставах через три года после первоначального инфицирования. В исследовании привезенных случаев во Франции сообщалось, что 59% людей все еще страдали артралгией через два года после острой инфекции. После локальной эпидемии чикунгунья в Италии 66% человек сообщали о мышечной боли, боли в суставах или астении через один год после острой инфекции. Длительные симптомы не являются полностью новым наблюдением; длительный артрит наблюдали после вспышки в 1979 году. Обычными прогностическими факторами длительных симптомов является более высокий возраст и предшествующее ревматологическое заболевание. Причина этих хронических симптомов в настоящее время не полностью известна. Маркеры аутоиммунного или ревматоидного заболевания не были обнаружены у людей, сообщавших о хронических симптомах. Однако, некоторые данные, полученные для человека и из моделей на животных, указывают на то, что вирус чикунгунья может быть спо-

собен вызывать хронические инфекции у хозяина. Вирусный антиген был обнаружен в биоптате мышц людей, страдавших рецидивирующим эпизодом заболевания через три месяца после первоначального возникновения. Кроме того, вирусный антиген и РНК были обнаружены в синовиальных макрофагах одного человека в ходе рецидива скелетно-мышечного заболевания через 18 месяцев после первоначального инфицирования. Несколько моделей на животных также показали, что вирус чикунгунья может приводить к персистирующим инфекциям. В модели на мышах вирусная РНК обнаруживалась специфически в ассоциированной с суставами ткани в течение по меньшей мере 16 недель после инокуляции и ассоциировалась с хроническим синовитом. Аналогично в другом исследовании сообщалось об обнаружении репортерного гена вируса в суставной ткани мышей в течение недель после инокуляции. В модели на не являющихся человеком приматах было обнаружено, что вирус чикунгунья персистирует в селезенке в течение по меньшей мере шести недель.

Вирус чикунгунья представляет собой альфавирус с геномом в виде положительной одноцепочечной РНК размером приблизительно 11,6 т.п.н. Он является представителем комплекса вирусов леса Семлики и является близкородственным вирусу реки Росс, вирусу о'Нъонг-нъонг и вирусу леса Семлики. В США он классифицируется как патоген с категорией приоритета С, и работа с ним требует мер предосторожности, соответствующих уровню биологической безопасности III. Эпителиальные и эндотелиальные клетки человека, первичные фибробласты и происходящие из моноцитов макрофаги являются пермиссивными для вируса чикунгунья in vitro, и репликация вируса является высоко цитопатической, однако чувствительной к интерферону типа I и II. In vivo вирус чикунгунья по-видимому реплицируется в фибробластах, клетках-предшественниках скелетных мышц и мышечных волокнах.

Вирус чикунгунья представляет собой альфавирус, как и вирусы, которые вызывают восточный энцефалит лошадей и западный энцефалит лошадей. Чикунгунья обычно распространяется через укусы комаров A. aegypti, однако недавнее исследование в Pasteur Institute в Париже показало, что штаммы вируса чикунгунья при вспышке Reunion Island 2005-2006 года приобрели мутацию, которая способствовала передаче азиатскими тигровыми комарами (A. albopictus).

Инфекция вирусом чикунгунья A. albopictus была вызвана точковой мутацией в генах оболочки вируса (E1). Усиленная передача вируса чикунгунья посредством A. albopictus могла означать увеличенный риск вспышек в других областях, где присутствует азиатский тигровый комар. Недавняя эпидемия в Италии, вероятно, передавалась A. albopictus. В Африке чикунгунья распространяется посредством лесного цикла, в котором вирус по большей части находится в других приматах между вспышками у человека.

При инфицировании вирусом чикунгунья фибробласты хозяина продуцируют интерферон 1 типа (альфа и бета). Мыши, которые лишены рецептора интерферона альфа, погибают в течение от двух до трех суток при воздействии 10^2 БОЕ вируса чикунгунья, в то время как мыши дикого типа выживают даже при воздействии 10^6 БОЕ вируса. В то же время мыши, которые имеют частичный дефицит интерферона 1 типа (IFN α/β +/-), имеют мягкое поражение и имеют такие симптомы, как мышечная слабость и летаргия. Partidos et al. (2011) увидели сходные результаты для живого ослабленного штамма CHIKV181/25. Однако вместо гибели мыши с дефицитом интерферона 1 типа (IFN α/β -/-) временно инвалидизировались, и мыши с частичным дефицитом интерферона 1 типа не имели никаких проблем.

Было проведено несколько исследований для поиска вышележащих компонентов каскада интерферона 1 типа, вовлеченных в ответ хозяина на инфекцию чикунгунья. До настоящего времени никому не известен специфический для чикунгунья ассоциированный с патогеном молекулярный паттерн. Тем не менее, было обнаружено, что важным фактором является IPS-1, также известный как Cardif, MAVS и VISA. В 2011 году White et al. обнаружили, что ингибирование IPS-1 снижало фосфорилирование регулирующего интерферон фактора 3 (IRF3) и продукцию IFN-β. В других исследованиях было обнаружено, что IRF3 и IRF7 являются важными в зависимости от возраста. Взрослые мыши, которые лишены оба из этих регуляторных факторов, погибают при инфицировании вирусом чикунгунья. Новорожденные, с другой стороны, погибают от вируса, если они имеют дефицит одного из этих факторов.

Чикунгунья противодействует ответу интерферона типа I посредством продуцирования NS2, неструктурного белка, который осуществляет деградацию RBP1 и выключает способность клетки-хозяина транскрибировать ДНК. NS2 препятствует каскаду передачи сигнала JAK-STAT и препятствует фосфорилированию STAT.

Стандартные лабораторные тесты на чикунгунья включают ОТ-ПЦР, выделение вируса и серологические тесты. Выделение вируса обеспечивает наиболее точный диагноз, однако его проведение отнимает от одной до двух недель и должно проводиться в лабораториях с уровнем III биологической безопасности. Способ вовлекает воздействие на конкретные клеточные линии образцов из цельной крови и идентификацию специфических для вируса чикунгунья ответов. ОТ-ПЦР с использованием гнездовых пар праймеров используют для амплификации нескольких специфических для чикунгунья генов из цельной крови. Результаты можно получить в течение от 1 до 2 суток.

Серологическая диагностика требует большего количества крови, чем другие способы, и в ней используется анализ ELISA для количественного определения уровней специфических для чикунгунья IgM. Для получения результатов требуется от 2 до 3 суток, и могут появляться ложноположительные

результаты при инфицировании другими родственными вирусами, такими как вирус о'Нъонг-нъонг и вирус леса Семлики.

Дифференциальная диагностика может включать диагностику инфекций другими переносимыми комарами вирусами, таким как вирус денге и гриппа. Хроническая рецидивирующая полиартралгия возникает по меньшей мере у 20% пациентов с чикунгунья через один год после инфицирования, в то время как при денге такие симптомы являются нечастыми.

В настоящее время специфическое лечение не доступно. Попытки смягчить симптомы включают применение NSAID, таких как напроксен или парацетамол (ацетаминофен), и жидкостей. Аспирин не рекомендуется. У индивидуумов с артритом в течение более чем двух недель может использоваться рибавирин. Эффект хлороквина неочевиден. По-видимому, он не помогает при остром заболевании, однако предварительные данные указывают на то, что он может помочь при хроническом артрите. Стероиды, по-видимому, тоже не являются полезными.

Чикунгунья по большей части присутствует в развивающихся странах. Эпидемиология чикунгунья связана с комарами, их средой и поведением человека. Адаптация комаров к изменяющемуся климату Северной Африки приблизительно 5000 лет назад вынудила их искать среду, где люди хранили воду. Впоследствии поселения человека и среда обитания комаров очень близко связаны. В периоды эпидемии люди являются резервуарами вируса. В другое время резервуарами служат обезьяны, птицы и другие позвоночные.

Описано три генотипа этого вируса: западно-африканский, восточно/центрально/южно-африканский и азиатский генотипы. Взрывная эпидемия в Индийском океане в 2005 году и на островах Тихого океана в 2011 году, а также в настоящее время в Америке, продолжают изменять распределение генотипов.

28 мая 2009 года в Changwat Trang в Таиланде, где вирус является эндемичным, в местной больнице решили провести кесарево сечение инфицированной чикунгунья беременной мальчиком женщине, Khwanruethai Sutmueang, 28 лет, местной жительнице Trang, для предотвращения передачи от матери к плоду. Однако после рождения ребенка врачи обнаружили, что ребенок уже инфицирован вирусом и поместили его в отделение интенсивной терапии, поскольку инфекция оставила ребенка неспособным самостоятельно дышать или пить молоко. Врачи предположили, что вирус может быть способен передаваться от матери к плоду, но без лабораторного подтверждения.

В декабре 2013 года чикунгунья была подтверждена на Карибском острове Святого Мартина с 66 подтвержденными случаями и приблизительно 181 предполагаемым случаем. Эта вспышка является первой в Западном полушарии, когда заболевание распространилось к человеку от популяции инфицированных комаров. К январю 2014 года, Public Health Agency of Canada сообщило, что случаи были подтверждены на британских Виргинских островах, Saint-Barthelemy, Guadeloupe, Dominica, Martinique, и французской Гайане. В апреле 2014 года Centers for Disease Control and Prevention (CDC) также подтвердили чикунгунья в Доминиканской республике. К концу апреля она распространилась всего на 14 стран, включая Ямайку, Сент-Люсию, Сент-Китс и Невис, Гаити, где была объявлена эпидемия.

К концу мая 2014 года в США было описано свыше десяти привезенных случаев вируса от людей, путешествующих во Флориду из регионов, где вирус является эндемичным. Штамм чикунгунья, распространившийся в США из Карибского бассейна, легче всего распространяется A. aegypti. Существует опасение, что этот штамм чикунгунья может мутировать, чтобы вектор A. albopictus стал более эффективным. Если эта мутация произойдет, чикунгунья может стать более опасным для здравоохранения США, поскольку A. albopictus или азиатский тигровый комар более широко распространен в США и является более агрессивным, чем A. aegypti.

В июне 2014 года шесть случаев вируса было подтверждено в Бразилии: два в городе Кампинас штата Сан-Паулу. Эти шесть случаев представляли собой солдат бразильской армии, которые недавно вернулись с Гаити, где они участвовали в попытках преобразования в качестве членов United Nations Stabilisation Mission in Haiti. Информация была официально выпущена муниципалитетом Кампинаса, который считает, что предпринял соответствующие действия.

На 16 июня 2014 года, во Флориде всего было 42 случая. К 11 сентября 2 014 года количество описанных случаев в Пуэрто-Рико для этого года составило 1636. К 28 октября это количество возросло до 2974 подтвержденных случаев с более чем 10000 предполагаемых. 17 июня 2014 года Department of Health officials of the U.S. штата Миссисипи подтвердил, что они исследуют первый потенциальный случай у жителя Миссисипи, который недавно путешествовал на Гаити. 19 июня 2014 года вирус распространился в Джорджию, США. 24 июня 2014 года был описан случай в Poinciana, Polk County, Флорида, США. 25 июня 2014 года Health Department of the U.S. штата Арканзас подтвердил, что один индивидуум в штате является носителем чикунгунья. 26 июня 2014 года случай был описан в мексиканском штате Халиско.

17 июля 2014 года первый случай чикунгунья, приобретенный в США, был описан Centers for Disease Control and Prevention во Флориде. С 2006 года свыше 200 случаев было описано в США, но только у людей, которые путешествовали в другие страны. Это является первым случаем, когда вирус был передан комарами индивидууму на материке в США. 2 сентября 2014 года, Centers for Disease Control and

Prevention сообщили, что произошло семь подтвержденных случаев чикунгунья в США у людей, которые имели приобретенное заболевание на местном уровне.

25 сентября 2014 года официальные представители Сальвадора сообщили о более чем 30000 подтвержденных случаях этой новой эпидемии. Эта новая эпидемия также усиливается на Ямайке и Барбадосе. Существует риск, что туристы в этих странах могут привезти вирус в их собственные страны. В ноябре 2014 года Бразилия описала локальную передачу отличающегося штамма (генотипа) чикунгунья, который никогда не документировался в Америке. Он представляет собой африканский генотип, но, как ни странно, не было объяснено, является ли он южно-африканским или западно-африканским. Новый генотип (в Америке) является более тяжелым, чем азиатский генотип, который в настоящее время распространяется в Америке, и иммунитет к одному генотипу не сообщает иммунитета к другим. Французская Полинезия входит в число других регионов, в которых продолжается вспышка.

7 ноября 2014 года было сообщено о вспышке чикунгунья в Мексике, приобретенной посредством локальной передачи, в южном штате Чьяпас. Вспышка распространяется по побережью от границы с Гватемалой до соседнего штата Оахака. Органы здравоохранения сообщили о совокупной заболеваемости, составлявшей 39 лабораторно подтвержденных случаев (к концу недели 48). Не было описано случаев подозрения. В январе 2015 в Колумбии произошел 90481 описанный случай чикунгунья.

II. Моноклональные антитела и их получение.

A. Общие способы.

Будет понятно, что моноклональные антитела, связывающиеся с вирусом чикунгунья, имеют несколько применений. Они включают изготовление диагностических наборов для применения для обнаружения и диагностики инфекции вирусом чикунгунья, а также для ее лечения. В этом контексте можно связывать такие антитела с диагностическими или терапевтическими средствами, использовать их в качестве средств для улавливания или конкурирующих агентов в конкурентном анализе или использовать их индивидуально без добавления дополнительных связанных с ними средств. Антитела могут быть мутантными или модифицированными, как дополнительно рассмотрено ниже. Способы получения и охарактеризации антител хорошо известны в данной области (см., например, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; патент США 4196265).

Способы получения моноклональных антител (MAb), как правило, начинаются аналогично получению поликлональных антител. Первой стадией обоих из этих способов является иммунизация соответствующего хозяина или идентификация индивидуумов, которые являются иммунными вследствие предшествующей естественной инфекции. Как хорошо известно в данной области, данная композиция для иммунизации может варьироваться по ее иммуногенности. Таким образом, часто является необходимым усиление иммунной системы хозяина, что может быть достигнуто путем связывания пептидного или полипептидного иммуногена с носителем. Иллюстративными и предпочтительными носителями являются гемоцианин лимфы улитки (KLH) и бычий сывороточный альбумин (BSA). Также в качестве носителей можно использовать другие альбумины, такие как овальбумин, сывороточный альбумин мыши или сывороточный альбумин кролика. Средства для конъюгации полипептида с белком-носителем хорошо известны в данной области и включают глутаральдегид, м-малеимидобенкоил-N-гидроксисукцинимидный эфир, карбодиимид и бис-биазотированный бензидин. Как также хорошо известно в данной области, иммуногенность конкретной иммуногенной композиции может быть усилена с использованием неспецифических иммуностимуляторов иммунного ответа, известных как адъюванты. Иллюстративные и предпочтительные адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (неспецифический стимулятор иммунного ответа, содержащий убитые Mycobacterium tuberculosis), неполный адъювант Фрейнда и адъювант на основе гидроксида алюминия.

Количество иммуногенной композиции, используемой для получения поликлональных антител, варьируется в зависимости от природы иммуногена, а также от животного, используемого для иммунизации. Для доставки иммуногена можно использовать различные пути (подкожный, внутримышечный, внутрикожный, внутривенный и внутрибрюшинный). Мониторинг продукции поликлональных антител можно осуществлять путем взятия образца крови иммунизированного животного в различные моменты времени после иммунизации. Также можно проводить вторую усиливающую инъекцию. Процесс усиления и титрования повторяют до тех пор, пока не достигнут подходящего титра. Когда достигают желаемого уровня иммуногенности, у иммунизированного животного можно проводить взятие крови и сыворотку выделять и хранить и/или животное можно использовать для получения MAb.

После иммунизации соматические клетки, обладающие потенциалом к продукции антител, в частности B-лимфоциты (B-клетки), отбирают для применения в протоколе получения MAb. Эти клетки можно получать путем биопсии из селезенки или лимфатических узлов или из циркулирующей крови. Затем продуцирующие антитела B-лимфоциты иммунизированного животного подвергают слиянию с клетками бессмертной линии миеломы, как правило, того же вида животных, что и животное, что иммунизировали, или клетками человека или химерными клетками человека/мыши. Миеломные клеточные линии, пригодные для применения в методиках слияния для получения гибридом, предпочтительно являются не продуцирующими антитела, обладающими высокой эффективностью слияния и имеющими дефицит ферментов, который делает их неспособными расти в определенных селективных средах, кото-

рые поддерживают рост только желаемых слитых клеток (гибридомы). Можно использовать любые из ряда миеломных клеток, как известно специалистам в данной области (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984).

Способы получения гибридов продуцирующих антитела клеток селезенки или клеток лимфатических узлов и миеломных клеток обычно включают смешение соматических клеток с миеломными клетками в соотношении 2:1, хотя это соотношение может варьироваться от приблизительно 20:1 до приблизительно 1:1 соответственно в присутствии средства или средств (химических или электрических), которые стимулируют слияние клеточных мембран. Способы слияния с использованием вируса Сендай описаны Kohler and Milstein (1975; 1976), и способы слияния с использованием полиэтиленгликоля (PEG), такого как 37% (об./об.) PEG, описаны Gefter et al. (1977). Также является пригодным использование способов электрически индуцируемого слияния (Goding, pp. 71-74, 1986). Методики слияния обычно продуцируют жизнеспособные гибрид с низкой частотой приблизительно от 1×10^{-6} до $1\times1C^{-8}$. Однако это не является проблемой, поскольку жизнеспособные слитые гибриды отделяют от родительских неслитых клеток (в частности, неслитых клеток миеломы, которые обычно продолжают делиться неопределенно долго) путем культивирования в селективной среде. Селективная среда обычно представляет собой среду, которая содержит средство, которое блокирует синтез нуклеотидов de novo в среде для культивирования тканей. Иллюстративными и предпочтительными средствами являются аминоптерин, метотрексат и азасерин. Аминоптерин и метотрексат блокируют синтез de novo как пуринов, так и пиримидинов, в то время как азасерин блокирует только синтез пуринов. Когда используют аминоптерин или метотрексат, среду дополняют гипоксантином и тимидином в качестве источника нуклеотидов (среда HAT). Когда используют азасерин, среду дополняют гипоксантином. Уабаин добавляют, если источником В-клеток является трансформированная вирусом Эпштейна-Барр (EBV) линия В-клеток человека, для устранения трансформированных EBV линий, которые не слились с миеломой.

Предпочтительной селективной средой является HAT или HAT с уабаином. В среде HAT могут выжить только клетки, способные задействовать пути реутилизации нуклеотидов. Миеломные клетки имеют дефект ключевых ферментов реутилизационного пути, например, гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), и они не могут выжить. В-клетки могут задействовать этот путь, однако они имеют ограниченную продолжительность жизни в культуре и обычно погибают в течение приблизительно двух недель. Таким образом, единственными клетками, которые могут выжить в селективной среде, являются гибриды, образованные из клеток миеломы и В-клеток. Когда источником В-клеток, используемых для слияния, является линия трансформированных EBV В-клеток, как в данном случае, также для лекарственной селекции гибридов можно использовать уабаин, поскольку трансформированные EBV В-клетки являются подвержены уничтожению этим лекарственным средством, в то время как используемый миеломный партнер выбирают так, чтобы он был резистентным к уабаину.

Культивирование обеспечивает популяцию гибридом, из которых отбирают специфические гибридомы. Как правило, селекцию гибридом проводят путем культивирования клеток посредством разбавления до единичных клонов в микропланшетах для титрования с последующим исследованием супернатантов индивидуальных клонов (приблизительно через от 2 до 3 недель) в отношении желаемой реактивности. Анализ должен быть чувствительным, простым и быстрым, такой как радиоиммунный анализ, ферментный иммуноанализ, анализ цитотоксичности, анализ бляшкообразования, дот-блоттинг и т.п. Затем отобранные гибридомы подвергают серийному разведению и единичные клетки сортируют посредством проточно-цитометрической сортировки и клонируют в индивидуальные продуцирующие антитела клеточные линии, и эти клоны затем можно неограниченно увеличивать в количестве с получением mAb. Клеточные линии можно исследовать в отношении продукции MAb двумя основными путями. Образец гибридомы можно инъецировать (часто в брюшную полость) животному (например, мыши). Необязательно животным предварительно вводят углеводород, особенно масла, такие как пристан (тетраметилпентадекан) перед инъекцией. Когда, таким образом, используют гибридомы человека, является оптимальным инъецирование мышам с иммунодефицитом, таким как мыши SCID, для предотвращения отторжения опухоли. У животных после инъекции развиваются опухоли, секретирующие специфическое моноклональное антитело, продуцируемое гибридом слитых клеток. Затем жидкости организма животного, такие как сыворотка или асцитная жидкость, можно отбирать для получения MAb в высокой концентрации. Индивидуальные клеточные линии также можно культивировать in vitro, где MAb естественным образом секретируются в культуральную среду, из которых их можно получать без труда в высоких концентрациях. Альтернативно гибридомные клеточные линии человека можно использовать in vitro для получения иммуноглобулинов в клеточном супернатанте. Клеточные линии могут быть адаптированы для роста в бессывороточной среде для оптимизации возможности выделения моноклональных иммуноглобулинов человека, имеющих высокую чистоту.

MAb, продуцированные любым из способом, можно очищать далее, если желательно, с использованием фильтрации, центрифугирования и различных хроматографических способов, таких как FPLC или аффинная хроматография. Фрагменты моноклональных антител по изобретению можно получать из очищенных моноклональных антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей посредством химического восстанов-

ления. Альтернативно фрагменты моноклональных антител, охватываемые настоящим изобретением, можно синтезировать с использованием автоматизированного устройства для синтеза пептидов.

Также предусматривается, что для получения моноклональных антител можно использовать подход молекулярного клонирования. Для этого РНК можно выделять из гибридомной линии и гены антител получать посредством ОТ-ПЦР и клонировать в экспрессирующий вектор для иммуноглобулинов. Альтернативно из РНК, выделенной из клеточных линий, получают комбинаторные фагмидные библиотеки иммуноглобулинов, и фагмиды, экспрессирующие антитела, отбирают посредством сортировки с использованием вирусных антигенов. Преимущества этого подхода над общепринятыми способами гибридом состоят в том, что приблизительно 10^4 антител можно продуцировать и подвергать скринингу за один раунд и что новой специфичности достигают посредством комбинирования H- и L-цепей, что далее повышает вероятность нахождения подходящих антител.

Другие патенты США, каждый из которых включен в качестве ссылки, в которых описано получение антител, пригодных в рамках настоящего изобретения, включают патент США 5565332, в котором описано получение химерных антител с использованием комбинаторного подхода; патент США 4816567, в котором описаны рекомбинантные препараты иммуноглобулинов; и патент США 4867973, в котором описаны конъюгаты антитело-лекарственное средство.

B. Антитела по настоящему изобретению.

Антитела согласно настоящему изобретению могут определяться в первом случае их специфичностью связывания, которая в данном случае направлена на гликопротеин вируса чикунгунья (GP). Специалисты в данной области, посредством оценки специфичности/аффинности связывания данного антитела с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области, могут определить, входят ли такие антитела в объем настоящей формулы изобретения. В одном аспекте предусматриваются моноклональные антитела, имеющие парные CDR клонов из тяжелых и легких цепей, проиллюстрированных в табл.3 и 4 соответственно. Такие антитела можно получать с использованием клонов, описанных ниже в разделе "Примеры", с использованием способов, описанных в настоящем описании.

Во втором аспекте антитела могут определяться их вариабельной последовательностью, которая включает дополнительные "каркасные" области. Они предоставлены в табл. 1 и 2, в которых представлены или отображены полные вариабельные области. Более того, последовательности антител можно изменять относительно этих последовательностей, необязательно с использованием способов, более подробно описанных ниже. Например, последовательности нуклеиновых кислот могут отличаться от последовательностей, указанных выше, тем, что (a) вариабельные области могут быть отделены от константных доменов легкой и тяжелой цепей, (b) нуклеиновые кислоты могут отличаться от нуклеиновых кислот, описанных выше, без влияния на остатки, кодируемые ими, (c) нуклеиновые кислоты могут отличаться от нуклеиновых кислот, описанных выше, с данным процентом гомологии, например 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, (d) нуклеиновые кислоты могут отличаться от нуклеиновых кислот, описанных выше, способностью гибридизоваться в условиях высокой жесткости, иллюстрируемых условиями низкого содержания соли и/или высокой температуры, обеспечиваемых от приблизительно 0,02 M до приблизительно 0,15 M NaCl при температурах от приблизительно 50°C до приблизительно 70°C, (e) аминокислоты могут отличаться от аминокислот, указанных выше, с данным процентом гомологии, например, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, или (f) аминокислоты могут отличаться от аминокислот, указанных выше, вследствие допущения консервативных замен (рассмотренных ниже). Каждое из вышеуказанных положений применимо к последовательностям нуклеиновых кислот, указанным в табл.1, и аминокислотным последовательности, приведенным в табл.2.

C. Модификация способами инженерии последовательностей антител.

В различных вариантах осуществления можно выбирать модификацию способами инженерии последовательностей идентифицированных антител по различным причинам, таким как повышенная экспрессия, повышенная перекрестная реактивность или сниженное неспецифическое связывание. Ниже приводится общее обсуждение соответствующих способов модификации антител способами инженерии.

Гибридомы можно культивировать, затем клетки можно подвергать лизису и экстрагировать тотальную РНК. Случайные гексамеры можно использовать с RT для получения кДНК-копий РНК, а затем можно проводить ПЦР с использованием мультиплексной смеси праймеров ПЦР, которые предположительно будут амплифицировать все последовательности генов вариабельных областей человека. Продукт ПЦР можно клонировать в вектор pGEM-T Easy, а затем секвенировать посредством автоматизированного ДНК-секвенирования с использованием стандартных праймеров для вектора. Анализ связывания и нейтрализации можно проводить с использованием антител, собранных из супернатантов гибридом, и очищать посредством FPLC с использованием колонок с белком G.

Рекомбинантные полноразмерные IgG-антитела можно получать путем субклонирования ДНК Fv тяжелой и легкой цепей из клонирующего вектора в плазмидный вектор для IgG, трансфицировать в клетки 293 Freestyle или клетки CHO, и антитела собирать и очищать из супернатанта клеток 293 или CHO.

Быстрая доступность антитела, продуцируемого в той же клетке-хозяине и в том же процессе куль-

тивирования клеток, что и конечный процесс производства cGMP, имеет потенциал к снижению длительности программ разработки процесса. Lonza разработали общий способ с использованием объединенных трансфектантов, выращенных в среде CDACF, для быстрого продуцирования небольших количеств (вплоть до 50 г) антител в клетках CHO. Хотя это является несколько более медленным, чем истинная временная система, преимущества включают более высокую концентрацию продукта и использование того же хозяина и процесса, что и в случае клеточной линии для продукции. Пример роста и продуктивности совокупностей GS-CHO, экспрессирующих модельное антитело, в одноразовом биореакторе: в культуре в одноразовом биореакторе в виде мешка (рабочий объем 5 л), работающем в режиме периодического культивирования с подпиткой, была достигнута концентрация антитела 2 г/л в пределах 9 недель после трансфекции.

Молекулы антител включают фрагменты (такие как F(ab'), $F(ab')_2$), которые продуцируются, например, посредством протеолитического расщепления mAb, или одноцепочечные иммуноглобулины, продуцируемые, например, рекомбинантными способами. Такие производные антител являются одновалентными. В одном варианте осуществления такие фрагменты можно комбинировать друг с другом или с другими фрагментами антител или лигандами рецепторов с получением "химерных" связывающих молекул. Важно, что такие химерные молекулы могут содержать заместители, способные связываться с различными эпитопами одной молекулы.

В родственных вариантах осуществления антитело представляет собой производное описанных антител, например, антитело, содержащее последовательности CDR, идентичные последовательностям CDR описанных антител (например, химерного антитела или антитела с пересаженными CDR). Альтернативно может быть желательным внесение модификаций, такое как внесение консервативных изменений в молекулу антитела. При внесении таких изменений можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Важность гидропатического индекса аминокислот для сообщения белку биологической функции взаимодействия в общем понятна в данной области (Kyte and Doolittle, 1982). Является общепризнанным, что относительный гидропатический характер аминокислоты вносит вклад во вторичную структуру конечного белка, что в свою очередь определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например, ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п.

Также в данной области понятно, что замену сходных аминокислот можно проводить эффективно на основе гидрофильности. В патенте США 4554101, включенном в настоящем описании в качестве ссылки, утверждается, что наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью его соседних аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка. Как подробно описано в патенте США 4554101, аминокислотным остаткам были приписаны следующие значения гидрофильности: основные аминокислоты: аргинин (+3,0), лизин (+3,0) и гистидин (-0,5); кислотные аминокислоты: аспартат (+3,0 ±1), глутамат (+3,0 ±1), аспарагин (+0,2) и глутамин (+0,2); гидрофильные неионные аминокислоты: серии (+0,3), аспарагин (+0,2), глутамин (+0,2) и треонин (-0,4); содержащие серу саминокислоты: цистеин (-1,0) и метионин (-1,3); гидрофобные неароматические аминокислоты: валин (-1,5), лейцин (-1,8), изолейцин (-1,8), пролин (-0,5 ±1), аланин (-0,5) и глицин (0); гидрофобные ароматические аминокислоты: триптофан (-3,4), фенилаланин (-2,5) и тирозин (-2,3).

Понятно, что аминокислота может быть заменена другой аминокислотой, имеющей сходную гидрофобность, и может быть получен биологически или иммунологически модифицированный белок. При таких изменениях предпочтительной является замена аминокислот, у которых величины гидрофильности находятся в пределах ±2, особенно предпочтительной является замена аминокислот с величиной в пределах ±1 и еще более предпочтительной является замена аминокислот с величиной в пределах ±0,5.

Как описано выше, аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.п. Иллюстративные замены, учитывающие различные вышеуказанные характеристики, хорошо известны специалистам в данной области и включают аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серии и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин.

Настоящее изобретение также относится к модификации изотипов. Посредством модификации Fc-области для того, чтобы она имела отличающийся изотип, можно обеспечивать различную функциональность. Например, изменение в IgG_1 может повышать антителозависимую клеточную цитотоксичность, переключение на класс A может улучшить распределение в тканях, и переключение на класс M может повысить валентность.

Модифицированные антитела можно получать любым способом, известным специалистам в данной области, включая экспрессию стандартными молекулярно-биологическими способами или химический синтез полипептидов. Способы рекомбинантной экспрессии описаны в настоящем описании.

D. Одноцепочечные антитела.

Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) представляет собой слитую конструкцию вариабельных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, связанных коротким (обычно серии, глицин) линкером. Эта химерная молекула сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и внесение линкерного пептида. Эта модификация обычно остав-

ляет специфичность неизмененной. Эти молекулы исторически создавали для облегчения фагового дисплея, когда является в высокой степени удобной экспрессия антигенсвязывающего домена в качестве единого пептида. Альтернативно scFv можно создавать непосредственно из субклонированных тяжелых и легких цепей, происходящих из гибридомы. Одноцепочечные вариабельные фрагменты лишены константной Fc-области, присутствующей в полных молекулах антител и, таким образом, для очистки антител используются распространенные участки связывания (например, белок A/G). Эти фрагменты часто можно очищать/иммобилизовывать с использованием белка L, поскольку белок L взаимодействует с вариабельной областью легких цепей каппа.

Гибкие линкеры, как правило, состоят из обеспечивающих спираль и поворот аминокислотных остатков, таких как аланин, серии и глицин. Однако также могут функционировать другие остатки. Tang et al. (1996) использовали фаговый дисплей в качестве средства быстрой селекции оптимизированных линкеров для одноцепочечных антител (scFv) из библиотек белковых линкеров. Была сконструирована случайная библиотека линкеров, в которой гены для вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей были связаны сегментом, кодирующим пептид из 18 аминокислот с переменным составом. Репертуар scFv (приблизительно 5×10^6 различных представителей) был экспонирован на нитчатом фаге и подвергнут аффинной селекции с использованием гаптена. Популяция отобранных вариантов демонстрировала значительное повышение активности связывания, но сохраняла значительное разнообразие последовательностей. Скрининг 1054 индивидуальных вариантов впоследствии обеспечил каталитически активный scFv, который эффективно продуцировался в растворимой форме. Анализ последовательности выявил консервативный пролин в линкере через два остатка после C-конца V_H и множество остатков аргинина и пролина в других положениях в качестве единственных общих признаков отобранных связывающих структур.

Рекомбинантные антитела по настоящему изобретению также могут вовлекать последовательности или части, которые обеспечивают димеризацию или мультимеризацию рецепторов. Такие последовательности включают последовательности, происходящие из IgA, которые позволяют образование мультимеров совместно с J-цепью. Другим доменом мультимеризации является домен димеризации Ga14. В других вариантах осуществления цепи могут быть модифицированы такими средствами, как биотин/авидин, которые позволяют комбинирование двух антител.

В отдельных вариантах осуществления одноцепочечное антитело можно получать путем связывания легких и тяжелых цепей рецептора с использованием непептидного линкера или химической структуры. Как правило, легкие и тяжелые цепи продуцируют в различных клетках, очищают, а затем связывают вместе соответствующим образом (т.е. N-конец тяжелой цепи связан с C-концом легкой цепи через соответствующий химический мостик).

Сшивающие реагенты используют для формирования молекулярных мостиков, которые связывают функциональные группы двух различных молекул, например стабилизирующего и коагулирующего средства. Однако предусматривается, что можно создавать димеры или мультимеры одного аналога или гетеромерные комплексы, состоящие из различных аналогов. Для связывания двух различных соединений пошаговым образом можно использовать гетеробифункциональные линкеры, которые устраняют нежелательное образование гомополимера.

Иллюстративный гетеробифункциональныи сшивающий линкер содержит две реакционноспособных группы: одна реагирует с группой первичного амина (например, N-гидроксисукцинимид), а другая реагирует с тиольной группой (например, пиридилдисульфид, малеинимиды, галогены и т.д.). Через реакционноспособную группу первичного амина сшивающий линкер может реагировать с остатком(ми) лизина на белке (например, выбранное антитело или фрагмент), и через тиольную реакционноспособную группу сшивающий линкер, уже связанный с первым белком, реагирует с остатком цистеина (свободная сульфгидрильная группа) другого белка (например, селективный агент).

Предпочтительно использование сшивающего линкера, обладающего приемлемой стабильностью в крови. Известны многочисленные типы содержащих дисульфидную связь линкеров, которые можно успешно использовать для конъюгации нацеливающих и терапевтических/профилактических средств. Линкеры, которые содержат дисульфидную связь, доступ к которой пространственно затруднен, могут оказаться обеспечивающими более высокую стабильность in vivo, препятствуя высвобождению нацеливающего пептида до достижения области действия. Таким образом, линкеры являются одной группой связывающих агентов.

Другим сшивающим реагентом является SMPT, который представляет собой бифункциональный сшивающий линкер, содержащий дисульфидную связь, доступ к которой "пространственно затрудняет" соседнее бензольной кольцо и метильные группы. Полагают, что пространственное препятствие доступа к дисульфидной связи выполняет функцию защиты связи от атаки тиолатными анионами, такими как глутатион, которые могут присутствовать в тканях и крови, и тем самым помогает препятствовать расщеплению конъюгата до доставки связанного средства в заданную область.

Сшивающий реагент SMPT, так же, как и многие другие сшивающие реагенты, обладает способностью сшивать функциональные группы, такие как SH цистеина или первичные амины (например, эпсилон аминогруппа лизина). Другой возможный тип сшивающего линкера включает гетеробифункцио-

нальные фотореактивные фенилазиды, содержащие расщепляемую дисульфидную связь, такие как сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3'-дитиопропионат. N-гидроксисукцинимидильная группа реагирует с первичными аминогруппами и фенилазид (при фотолизе) неселективно реагирует с любым аминокислотным остатком.

В дополнение к сшивающим линкерам, доступ к которым затруднен, также можно использовать линкеры в соответствии с настоящим изобретением можно использовать линкеры, доступ к которым не затруднен. Другие пригодные сшивающие линкеры, не считающиеся содержащими или образующими дисульфид, доступ к которому затруднен, включают SATA, SPDP и 2-иминотиолан (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). Использование таких сшивающих линкеров хорошо понятно в данной области. Другой вариант осуществления вовлекает использование гибких линкеров.

В патенте США 4680338 описаны бифункциональные линкеры, пригодные для получения конъюгатов лигандов с аминосодержащими полимерами и/или белками, особенно для получения конъюгатов антител с хелаторами, лекарственными средствами, ферментами, поддающимися обнаружению метками и т.п. В патентах США 5141648 и 5563250 описаны расщепляемые конъюгаты, содержащие неустойчивую связь, расщепляемую в различных мягких условиях. Этот линкер является особенно пригодным, поскольку представляющее интерес средством может быть связано непосредственно с линкером, причем расщепление приводит к высвобождению активного средства. Конкретные применения включают добавление свободной амино или свободной сульфгидрильной группы к белку, такому как антитело или лекарственное средство.

В патенте США 5856456 описаны пептидные линкеры для применения для связывания полипептидных компонентов для получения слитых белков, например одноцепочечных антител. Линкер имеет длину вплоть до приблизительно 50 аминокислот, содержит по меньшей мере одну заряженную аминокислоту (предпочтительно аргинин или лизин), за которой следует пролин, и характеризуется более высокой стабильностью и сниженной агрегацией. В патенте США 5880270 описаны аминоокси-содержащие линкеры, пригодные для различных иммунодиагностических способов и способов разделения.

E. Интраантитела.

В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой рекомбинантное антитело, которое является пригодным для действия внутри клетки - такие антитела известны как "интраантитела". Эти антитела могут препятствовать функции мишени посредством различных механизмов, например посредством изменения внутриклеточного транспорта белков, препятствования ферментативной функции и блокирования взаимодействий белок-белок или белок-ДНК. Во многом их структуры имитируют или сходны со структурами одноцепочечных и однодоменных антител, описанных выше. Действительно, единый транскрипт/единая цепь является важным признаком, который позволяет внутриклеточную экспрессию в клетке-мишени, а также делает транспорт белка через клеточные мембраны более осуществимым. Однако требуются дополнительные признаки.

Двумя основными ограничениями, влияющими на реализацию терапевтического средства на основе интраантитела, являются доставка, включая нацеливание в клетку/ткань и стабильность. Что касается доставки, используют различные подходы, такие как направленная на ткань доставка, использование специфических для типа клеток промоторов, доставка на вирусной основе и использование обеспечивающих клеточную проницаемость/транслокацию через мембрану пептидов. Что касается стабильности, подход обычно состоит либо в скрининге посредством перебора, включая способы, которые вовлекают фаговый дисплей и могут включать созревание последовательностей или разработку консенсусных последовательностей, или более направленные модификации, такие как встраивание стабилизирующих последовательностей (например, Fc-областей, последовательностей белков-шаперонов, лейциновых молний) и замену/модификацию дисульфида.

Дополнительным признаком, который может потребоваться для интраантител, является сигнал для внутриклеточного нацеливания. Векторы, которые могут нацеливать интраантитела (или другие белки) в субклеточные области, такие как цитоплазма, ядро, митохондрии и ER, были сконструированы и являются коммерчески доступными (Invitrogen Corp.; Persic et al., 1997).

Вследствие их способности входить в клетки интраантитела имеют дополнительные применения, которые не могут быть достигнуты с помощью других типов антител. В случае антител по настоящему изобретению, способность к взаимодействию с цитоплазматическим доменом MUC1 в живой клетке может препятствовать функциям, ассоциированным с CD MUC1, таким как функции передачи сигнала (связывание с другими молекулами) или образование олигомера. В частности, предусматривается, что такие антитела можно использовать для ингибирования образования димера MUC1.

F. Очистка.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть очищенными. Термин "очищенный", как используют в рамках изобретения, относится к композиции, изолированной от других компонентов, где белок очищен до любой степени относительно его природного состояния. Таким образом, очищенный белок также относится к белку, свободному от среды, в которой он может встречаться в природе. Когда используют термин "по существу очищенный" это обозначение относится к композиции, в которой белок или пептид образует основной компонент композиции, напри-

мер, составляет приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более от белков в композиции.

Способы очистки белков хорошо известны специалистам в данной области. Эти способы вовлекают на одном уровне предварительное фракционирование клеточной среды на полипептидные и неполипептидные фракции. После отделения полипептида от других белков представляющий интерес полипептид можно далее очищать с использованием хроматографических и электрофоретических способов для достижения частичной или полной очистки (или очистки до однородности). Аналитическими способами, особенно пригодными для получения чистого пептида, являются ионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография; полиакриламидный гель-электрофорез; изоэлектрическое фокусирование. Другие способы очистки белков включают преципитацию с сульфатом аммония, PEG, антитела и т.п. или тепловую денатурацию, а затем центрифугирование; гель-фильтрацию, обращено-фазовую хроматографию, хроматографию с гидроксилапатитом и аффинную хроматографию; и комбинации таких и других способов.

При очистке антитела по настоящему изобретению может быть желательной экспрессия полипептида в прокариотическои или эукариотической экспрессирующеи системе и экстракция белка с использованием денатурирующих условий. Полипептид можно очищать от других клеточных компонентов с использованием аффинной колонки, с которой связывается меченая часть полипептида. Как общеизвестно в данной области, предполагается, что порядок проведения различных стадий очистки можно изменять или что определенные стадии можно исключать и все еще достигать подходящего способа получения по существу очищенного белка или пептида.

Часто полные антитела фракционируют с использованием средств (т.е. белка А), которые связывают Fc-часть антитела. Альтернативно антигены можно использовать для одновременной очистки и селекции соответствующих антител. В таких способах часто используется селективное средство, связанное с подложкой, такой как колонка, фильтр или гранулы. Антитела связываются с подложкой, примеси удаляют (например, смывают) и антитела высвобождают путем применения определенных условий (соль, нагревание и т.д.).

Различные способы количественного определения степени очистки белка или пептида будут известны специалистам в данной области с учетом настоящего изобретения. Они включают, например, определение удельной активности активной фракции или оценку количества полипептидов во фракции посредством анализа SDS/PAGE. Другим способом оценки чистоты фракции является вычисление удельной активности фракции, сравнения ее с удельной активностью первоначального экстракта и, таким образом, вычисление степени чистоты. Фактические единицы, используемые для обозначения величины активности, безусловно зависят от конкретного способа анализа, выбранного для отслеживания очистки и того, демонстрирует ли экспрессируемыи белок или пептид поддающуюся обнаружению активность.

Известно, что миграция полипептида может варьироваться, иногда значительно, в зависимости от условий SDS/PAGE (Capaldi et al., 1977). Таким образом, будет понятно, что в различных условиях электрофореза кажущаяся молекулярная масса очищенных или частично очищенных продуктов экспрессии может варьироваться.

III. Активная/пассивная иммунизация и лечение/предупреждение инфекции чикунгунья.

А. Составление и введение.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела против вируса чикунгунья и антигены для их получения. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество антитела, или его фрагмента, или пептидного иммуногена и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более конкретно у человека. Термин "носитель" относится к разбавителю, эксципиенту или наполнителю, с которыми вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. В частности, вода является носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Также в качестве жидких носителей можно использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, в частности для инъекционных растворов. Другие подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п.

Если желательно, композиция также может содержать небольшие количества смачивающих средств или эмульгаторов или pH-буферных средств. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Пероральные составы могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахаринат натрия, целлюлоза, магний карбонат, и т.д. фармацевтической категории. Примеры подходящих фармацевтических средств описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences". Такие компози-

ции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Состав должен быть пригодным для пути введения, который может быть пероральным, внутривенным, внутриартериальным, интрабуккальным, интраназальным, осуществляемого через небулайзер, бронхиальную ингаляцию, или доставляемый посредством механической вентиляции.

Также предусматриваются активные вакцины, где антитела, подобные антителам, которые описаны, продуцируются in vivo у субъекта, имеющего риск инфекции чикунгунья. Последовательности для E1 и E2 приведены в качестве SEQ ID NO: 253-276 в прилагаемом списке последовательностей. Такие вакцины можно составлять для парентерального введения, например составлять для инъекции внутрикожным, внутривенным, внутримышечным, подкожным или даже внутрибрюшинным путями. Предусматривается введение внутрикожным и внутримышечным путями. Альтернативно вакцину можно вводить местным путем непосредственно на слизистую оболочку, например посредством назальных капель, ингаляции или через небулайзер. Фармацевтически приемлемые соли включают кислые соли и соли, которые образованы с неорганическими кислотами, например такими как хлористоводородная или фосфорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, виннокаменная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильный группами, также могут происходить из неорганических оснований, например таких как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т.п.

Пассивный перенос антител, известный как искусственно приобретенный пассивный иммунитет, обычно вовлекает применение внутривенных или внутримышечных инъекций. Формы антитела могут представлять собой плазму или сыворотку крови человека или животного, объединенный иммуноглобулин для внутривенного (IVIG) или внутримышечного (IG) применения, IVIG или IG человека с высоким титром от иммунизированных доноров или доноров, выздоравливающих от заболевания, и моноклональные антитела (MAb). Такой иммунитет обычно длится только короткий период времени, а также существует потенциальный риск реакций гиперчувствительности и сывороточной болезни, особенно вследствие гамма-глобулина, происходящего не из человека. Однако пассивный иммунитет обеспечивает немедленную защиту. Антитела можно составлять в носителе, подходящем для инъекции, т.е. стерильном и проходимом через иглу шприца.

Как правило, ингредиенты композиций по изобретению предоставляют либо по отдельности, либо смешанными вместе в единичной дозированной форме, например в качестве сухого лиофилизированного порошка или не содержащего воды концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, на которых указано количество активного вещества. Когда композицию вводят посредством инфузии, ее можно распределять с использованием бутылки для инфузии, содержащей стерильную воду или солевой раствор фармацевтической категории. Когда композицию вводят посредством инъекции, может быть предоставлена ампула стерильной воды для инъекций или солевой раствор, так чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Композиции по изобретению можно составлять в качестве нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как анионы хлористоводородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, виннокаменной кислот и т.д., и соли, образованные с катионами, такими как катионы, образованные из гидроксида натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

IV. Конъюгаты антител.

Антитела по настоящему изобретению могут быть связаны по меньшей мере с одним средством с образованием конъюгата антител. Для повышения эффективности молекул антител в качестве диагностических или лекарственных средств является общепринятым сшивание или ковалентное связывание или образования комплекса по меньшей мере с одной желаемой молекулой или частью. Такая молекула или часть может представлять собой, но не ограничивается ими, по меньшей мере одну эффекторную или репортерную молекулу. Эффекторные молекулы включают молекулы, обладающие желаемой активностью, например, цитотоксической активностью. Неограничивающие примеры эффекторных молекул, которые связаны с антителами, включают токсины, противоопухолевые средства, терапевтические ферменты, радионуклиды, противовирусные средства, хелатирующие агенты, цитокины, факторы роста, и олиго- или полинуклеотиды. Напротив, репортерную молекулу определяют как любую часть, которая может быть обнаружена с использованием анализа. Неограничивающие примеры репортерных молекул, которые конъюгируют с антителами, включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, фотоаффинные молекулы, окрашенные частицы или лиганды, такие как биотин.

Конъюгаты антител, как правило, являются предпочтительными для применения в качестве диагностических средств. Антительные диагностические средства, как правило, относятся к двум классам: для применения в диагностике in vitro, такой как различные иммуноанализы, и для применения в протоколах диагностики in vivo, обычно известные как "визуализация с помощью антител". В данной области известны многие подходящие визуализирующие средства так же, как и способы их связывания с антитела-

ми (см., например, патенты США 5021236, 4938948 и 4472509). Используемые визуализирующие части могут представлять собой парамагнитные ионы, радиоактивные изотопы, флуорохромы, обнаруживаемые посредством ЯМР вещества и средства рентгенографии.

В случае парамагнитных ионов в качестве примера могут быть упомянуты ионы, такие как хром (III), марганец (II), железо (III), железо (II), кобальт (II), никель (II), медь (II), неодимий (III), самарий (III), иттербий (III), гадолиний (III), ванадий (II), тербий (III), диспрозий (III), гольмий (III) и/или эрбий (III), причем особенно предпочтительным является гадолиний. Ионы, пригодные в других контекстах, таких как рентгенография, включают, но не ограничиваются ими, лантан (III), золото (III), свиней (II) и особенно висмут (III).

В случае радиоактивных изотопов для терапевтического и/или диагностического применения, могут быть упомянуты астат^{211}, ^{14}углерод, ^{51}хром, ^{36}хлор, ^{57}кобальт, ^{58}кобальт, медь^{67}, ^{152}Eu, галлий^{67}, ^{3}водород, йод^{123}, йод^{125}, йод^{131}, индий^{111}, ^{59}железо, ^{32}фосфор, рений^{186}, рений^{188}, ^{75}селен, ^{35}сера, технеций ^{99m} и/или иттрий^{90}. Часто ^{125}I является предпочтительным для применения в определенных вариантах осуществления и технеций ^{99m} и/или индий^{111} также часто являются предпочтительными вследствие их низкой энергии и пригодности для дальнего обнаружения. Радиоактивно меченные моноклональные антитела по настоящему изобретению можно получать способами, хорошо известными в данной области. Например, моноклональные антитела можно йодировать посредством контакта с йодидом натрия и/или калия и химическим окислителем, таким как гипохлорит натрия или ферментативный окислитель, такой как лактопероксидаза. Моноклональные антитела по изобретению могут быть меченными технецием ^{99m} посредством процесса обмена лигандами, например посредством восстановления пертехната раствором олова, хелатирования восстановленного технеция на колонке Sephadex и внесения антитела в эту колонку. Альтернативно можно использовать прямое мечение, например посредством инкубации пертехната, восстановителя, такого как $SNCl_2$, буферного раствора, такого как раствор фталата натрия-калия и антитела. Промежуточные функциональные группы, которые часто используют для связывания радиоизотопов, которые существуют в качестве ионов металлов, с антителом, представляют собой диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA) или этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA).

Флуоресцентные метки, предусматриваемые для применения в качестве конъюгатов, включают Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, флуоресцеин изотиоцианат, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Renographin, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамин и/или Texas Red.

Другим типом конъюгатов антител, предусматриваемых в рамках настоящего изобретения, являются конъюгаты антител, предназначенные в основном для применения in vitro, где антитело связано со вторичным связывающим лигандом и/или с ферментом (ферментной меткой), который будет образовывать окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Примеры подходящих ферментов включают уреазу, щелочную фосфатазу, пероксидазу (хрена) или глюкозооксидазу. Предпочтительными вторичными связывающими лигандами являются соединения биотина, и авидина и стрептавидина. Применение таких меток хорошо известно специалистам в данной области и описано, например в патентах США 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 и 4366241.

Другой известный способ сайт-специфического связывания молекул с антителами включает рекацию антител с аффинными метками на основе гаптенов. По существу, аффинные метки на основе гаптенов реагируют с аминокислотами в антигенсвязывающем центре, тем самым разрушая этот участок и блокируя специфическую реакцию антигена. Однако это может не быть преимущественным, поскольку это приводит к утрате связывания антигена конъюгатом антитела.

Молекулы, содержащие азидогруппы, также можно использовать для образования ковалентных связей с белками через реактивные нитреновые промежуточные соединения, которые образуются под действием низкоинтенсивного ультрафиолетового света (Potter and Haley, 1983). В частности, 2- и 8-азидоаналоги пуриновых нуклеотидов используют в качестве сайт-направленных фотозондов для идентификации связывающих нуклеотиды белков в неочищенных клеточных экстрактах (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- и 8-азидонуклеотиды также используют для картирования нуклеотидсвязывающих доменов очищенных белков (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; Dholakia et al., 1989), и их можно использовать в качестве соединений для связывания с антителами.

В данной области известно несколько способов присоединения или конъюгации антитела с конъюгируемой с ним частью. Некоторые способы присоединения вовлекают применение хелатирующего металл комплекса с использованием, например, органического хелатирующего агента, такого как ангидрид диэтилентриаминпентауксуснои кислоты (DTPA); этилентриаминтетрауксусная кислота; N-хлор-п-толуолсульфонамид; и/или тетрахлор-3α-6α-дифенилгликоурил-3, связанного с антителом (патенты США 4472509 и 4938948). Моноклональные антитела также можно подвергать реакции с ферментом в присутствии агента реакции сочетания, такого как глутаральдегид или перйодат. Конъюгаты с флуоресцеиновыми маркерами получают в присутствии этих агентов реакции сочетания или посредством реакции с изотиоцианатом. В патенте США 4938948 визуализацию опухолей молочной железы осуществляют с использованием моноклональных антител и поддающиеся обнаружению визуализирующие части

связывают с антителом с использованием линкеров, таких как метил-п-гидроксибензимидат или N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропионат.

В других вариантах осуществления предусматривается дериватизация иммуноглобулинов посредством селективного внесения сульфгидрильных групп в Fc-область иммуноглобулина с использованием условий реакции, которые не изменяют антигенсвязывающего центра антитела. Описано, что конъюгаты антител, полученные по этой методологии, демонстрируют улучшенную длительность действия, специфичность и чувствительность (патент США 5196066, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Сайт-специфическое присоединение эффекторных или репортерных молекул, где репортерная или эффекторная молекула конъюгирована с углеводным остатком Fc-области, также описано в литературе (O'Shannessy et al., 1987). Описано, что этот подход обеспечивает диагностически и терапевтически перспективные антитела, которые в настоящее время проходят клиническую оценку.

V. Способы иммунодетекции.

В следующих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам иммунодетекции для связывания, очистки, удаления, количественного определения или иного обнаружения в целом вируса чикунгунья и ассоциированных с ним антигенов. В то время как такие способы можно использовать традиционным образом, другим применением является контроль качества и мониторинг вакцин и других содержащих вирус материалов, где антитела по настоящему изобретению можно использовать для оценки количества или целостности (т.е долговременной стабильности) антигенов H1 в вирусах. Альтернативно способы можно использовать для скрининга различных антител в отношении профилей подходящей/желаемой реактивности.

Некоторые способы иммунодетекции включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA), иммунорадиометрическии анализ, флуороиммуноанализ, хемилюминесцентныи анализ, биолюминесцентный анализ и вестерн-блоттинг, среди прочих. В частности, предусматривается конкурентный анализ для обнаружения и количественного определения антител против вируса чикунгунья, направленных на конкретные эпитопы паразитов в образцах. Стадии различных пригодных способов иммунодетекции описаны в научной литературе, например, такой как Doolittle and Ben-Zeev (1999), Gulbis and Galand J.1993), De Jager et al. (1993) и Nakamura et al. (1987). Как правило, способы иммуноблоттинга включают получение образца, предположительно содержащего вирус чикунгунья, и приведение в контакт образца с первым антителом в соответствии с настоящим изобретением в соответствующих случаях, в условиях, эффективных для обеспечения образования иммунокомплексов.

Эти способы включают способы очистки вируса чикунгунья или родственных антигенов из образца. Антитело предпочтительно связывают с твердой подложкой, например в форме матрикса колонки, и образец, предположительно содержащий вирус чикунгунья или антигенный компонент, наносят на иммобилизованное антитело. Нежелательные компоненты смывают с колонки, оставляя антиген вируса чикунгунья в иммунном комплексе с иммобилизованным антителом, которое затем собирают путем удаления организма или антигена из колонки.

Способы иммунного связывания также включают способы обнаружения и количественного определения вируса чикунгунья или родственных компонентов в образце и обнаружение и количественное определение каких-либо иммунных комплексов, образовавшихся в процессе связывания. В этом случае можно получить образец, предположительно содержащий вирус чикунгунья или его антигены, и привести образец в контакт с антителом, которое связывает вирус чикунгунья или его компоненты, а затем провести обнаружение и количественное определение иммунных комплексов, образовавшихся в конкретных условиях. С точки зрения обнаружения антигена анализируемый биологический образец может представлять собой любой образец, который предположительно содержит вирус чикунгунья или антиген вируса чикунгунья, такой как срез или образец ткани, экстракт гомогенизированной ткани, биологическая жидкость, включая кровь и сыворотку, или секрет, такой как кал или моча.

Приведение в контакт выбранного биологического образца с антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования иммунных комплексов (первичных иммунных комплексов), обычно является вопросом простого добавления композиции антитела к образцу и инкубации смеси в течение периода времени, достаточного длительного, чтобы антитела образовывали иммунные комплексы, т.е. связывались с вирусом чикунгунья или присутствующими антигенами. После этого композицию образец-антитело, такую как срез ткани, планшет для ELISA, дот-блот или вестерн-блот, обычно промывают для удаления любых неспецифически связанных типов антител, обеспечивая обнаружение только тех антител, которые специфически связались с первичными иммунными комплексами.

Как правило, обнаружение образования иммунного комплекса хорошо известно в данной области и может быть достигнуто с использованием многочисленных подходов. Эти способы обычно основаны на обнаружении метки или маркера, такого как радиоактивные, флуоресцентные, биологические и ферментные метки. Патенты, касающиеся применения таких меток, включают патенты США 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 и 4366241. Безусловно, могут быть найдены дополнительные преимущества в использовании вторичного связывающего лиганда, такого как вторичное антитело и/или лиганд-связывающая система на основе биотина/авидина, как известно в данной области.

Антитело, используемое для обнаружения, может быть само по себе связано с поддающейся обнаружению меткой, где впоследствии можно просто обнаруживать эту метку, тем самым, позволяя определять количество первичных иммунных комплексов в композиции. Альтернативно первое антитело, которое становится связанным в первичных иммунных комплексах, можно обнаруживать посредством второго связывающего лиганда, который обладает аффинностью связывания с антителом. В этих случаях второй связывающий лиганд может быть связан с поддающейся обнаружению меткой. Второй связывающий лиганд сам по себе часто представляет собой антитело, которое, таким образом, может быть названо "вторичным" антителом. Первичные иммунные комплексы приводят в контакт с меченым вторичным связывающим лигандом или антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования вторичных иммунных комплексов. Затем вторичные иммунные комплексы обычно промывают для удаления каких-либо неспецифически связанных меченых вторичных антител или лигандов, а затем выявляют оставшуюся метку во вторичных иммунных комплексах.

Следующие способы включают обнаружение первичных иммунных комплексов посредством двухстадийного подхода. Второй связывающий лиганд, такой как антитело, которое обладает аффинностью связывания с антителом, используют для формирования вторичных иммунных комплексов, как описано выше. После промывания вторичные иммунные комплексы приводят в контакт с третьим связывающим лигандом или антителом, которые обладают аффинностью связывания со вторичным антителом, вновь в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования иммунных комплексов (третичные иммунные комплексы). Третий лиганд или антитело связаны с поддающейся обнаружению меткой, позволяя обнаружение третичных иммунных комплексов, образовавшихся таким образом. Эта система может обеспечить усиление сигнала, если это желательно.

В одном способе иммунодетекции используется два различных антитела. Первое биотинилированное антитело используют для обнаружения антигена-мишени, а затем используют второе антитело для обнаружения биотина, находящегося в комплексе. В этом способе образец, подлежащий исследованию, сначала инкубируют в растворе, содержащем антитело первой стадии. Если антиген-мишень присутствует, часть антитела связывается с антигеном с образованием комплекса биотинилированное антитело/антиген. Затем комплекс антитело/антиген амплифицируют посредством инкубации в последовательных растворах стрептавидина (или авидина), биотинированной ДНК и/или комплементарной биотинилированной ДНК, причем на каждой стадии к комплексу антитело/антиген добавляют дополнительные участки биотина. Стадии амплификации повторяют до тех пор, пока не достигнут подходящего уровня амплификации, и в этот момент времени образец инкубируют в растворе, содержащем антитело второй стадии против биотина. Это антитело второй стадии является меченным, например, ферментом, который можно использовать для обнаружения присутствия комплекса антитело/антиген посредством гистоензимологии с использованием хромогенного субстрата. С использованием подходящей амплификации можно получать конъюгат, который является макроскопически видимым.

В другом известном способе иммунодетекции используется методология иммуно-ПЦР (полимеразная цепная реакция). Способ ПЦР является сходным со способом Cantor вплоть до инкубации с биотинилированной ДНК, однако вместо использования множества раундов инкубации стрептавидина и биотинилированной ДНК, комплекс ДНК/биотин/стрептавидин/антитело смывают с использованием буфера с низким значением pH или высоким содержанием соли, который высвобождает антитело. Затем полученный раствор для промывания используют для проведения реакции ПЦР с подходящими праймерами с соответствующими контролями. По меньшей мере, теоретически невероятную способность к амплификации и специфичность ПЦР можно использовать для обнаружения одной молекулы антигена.

A. ELISA.

Способы иммуноанализа, в их наиболее простом и прямом значении, представляют собой анализы связывания. Определенными предпочтительными способами иммуноанализа являются различные типы твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и радиоиммунного анализа (RIA), известные в данной области. Также, в частности, является пригодным иммуногистохимическое обнаружение с использованием срезов тканей. Однако будет хорошо понятно, что обнаружение не ограничивается такими способами, и также можно использовать Вестрн-блоттинг, дот-блоттинг, FACS-анализ и т.п.

В одном иллюстративном ELISA, антитела по изобретению иммобилизуют на выбранной поверхности, обладающей аффинностью к белку, такой как полистироловый микропланшет для титрования. Затем в лунки добавляют исследуемую композицию, предположительно содержащую вирус чикунгунья или антиген вируса чикунгунья. После связывания и промывания для удаления неспецифически связавшихся иммунных комплексов можно выявлять связанный антиген. Выявление можно осуществлять путем добавления другого антитела против вируса чикунгунья, которое связано с поддающейся обнаружению меткой. Этот тип ELISA представляет собой простой "сэндвич-ELISA". Обнаружение также можно осуществлять посредством добавления второго антитела против вируса чикунгунья, а затем добавления третьего антитела, которое обладает аффинностью связывания в отношении второго антитела, причем третье антитело связано с поддающейся обнаружению меткой.

В другом иллюстративном ELISA образцы, предположительно содержащие вирус чикунгунья или антиген вируса чикунгунья, иммобилизуют на поверхности лунки, а затем приводят в контакт с антите-

лами против вируса чикунгунья по изобретению. После связывания и промывания для удаления неспецифически связанных иммунных комплексов, проводят выявление связанных антител против вируса чикунгунья. Когда первоначальные антитела против вируса чикунгунья связаны с поддающейся обнаружению меткой, иммунные комплексы можно выявлять прямо. Вновь иммунные комплексы можно выявлять с использованием второго антитела, которое обладает аффинностью связывания с первым антителом против вируса чикунгунья, причем второе антитело связано с поддающейся обнаружению меткой.

Независимо от используемого формата, ELISA обладают определенными общими признаками, такими как нанесение, инкубация и связывание, промывание для удаления неспецифически связавшихся компонентов и обнаружение связанных иммунных комплексов. Они описаны ниже.

При нанесении на планшет либо антигена, либо антитела, как правило, лунки планшета инкубируют с раствором антигена или антитела либо в течение ночи, либо в течение периода, составляющего определенное количество часов. Затем лунки планшета промывают для удаления неполностью адсорбированного материала. На любые оставшиеся доступные поверхности лунок затем "наносят" неспецифический белок, который является антигенно нейтральным для исследуемой антисыворотки. Они включают бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин или растворы молочного порошка. Покрытие позволяет блокировать участки неспецифической адсорбции на поверхности для иммобилизации и, таким образом, снижает фоновый сигнал, вызываемый неспецифическим связыванием антисыворотки с поверхностью.

В ELISA, вероятно, более традиционным является использование вторичных или третичных средств для обнаружения вместо прямой процедуры. Таким образом, после связывания белка или антитела с лункой, покрытия нереактивным материалом для уменьшения фонового сигнала и промывания для удаления несвязанного материала, иммобилизующую поверхность приводят в контакт с биологическим образцом, подлежащим исследованию, в условиях, эффективных для обеспечения образования иммунного комплекса (антиген/антитело). Затем обнаружение иммунного комплекса требует меченого вторичного связывающего лиганда, или антитела и вторичного связывающего лиганда, или антитела совместно с меченым третичным антителом или третьим связывающим лигандом.

"В условиях, эффективных для обеспечения образования иммунного комплекса (антиген/антитело)" означает, что условия предпочтительно включают разбавление антигенов и/или антител растворами, такими как BSA, бычий гамма-глобулин (BGG) или фосфатно-солевой буфер (PBS)/Tween. Эти добавляемые средства также имеют тенденцию к способствованию снижению неспецифического фонового сигнала.

"Подходящие" условия также означают, что инкубацию проводят при температуре или в течение периода времени, достаточных для обеспечения эффективного связывания. Стадии инкубации, как правило, длятся приблизительно от 1-2 до 4 ч или около того, при температурах предпочтительно порядка от 25 до 27°C, или они могут продолжаться в течение ночи при приблизительно 4°C или около того.

После всех стадий инкубации в ELISA, подвергнутую контакту поверхность промывают для удаления не образовавшего комплекс материала. Предпочтительная методика промывания включает промывание раствором, таким как PBS/Tween или боратный буфер. После образования специфических иммунных комплексов между исследуемым образцом и первоначально связавшимся материалом и последующего промывания можно определять наличие даже малых количеств иммунных комплексов.

Для обеспечения средств обнаружения, второе или третье антитело имеет связанную с ним метку, позволяющую обнаружение. Предпочтительно она представляет собой фермент, который будет обеспечивать развитие окраски при инкубации с соответствующим хромогенным субстратом. Таким образом, например, может быть желательным приведение в контакт или инкубация первого и второго иммунного комплекса с антителом, конъюгированным с уреазой, глюкозооксидазои, щелочной фосфатазой или пероксидазой, в течение периода времени и в условиях, которые способствуют проявлению дальнейшего образования иммунного комплекса (например, инкубация в течение 2 ч при комнатной температуре в содержащем PBS растворе, таком как PBS-Tween).

После инкубации с меченым антителом и после промывания для удаления не связавшегося материала проводят количественное определение метки, например, посредством инкубации с хромогенным субстратом, таким как мочевина, или бромкрезоловый фиолетовый, или 2,2'-азино-ди-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота (ABTS), или H_2O_2, в случае пероксидазы в качестве ферментной метки. Затем проводят количественное определение посредством измерения степени развившейся окраски, например, с использованием спектрофотометра видимого спектра.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает использование конкурентных форматов. Это, в частности, является пригодным для обнаружения антител против вируса чикунгунья в образце. В конкурентных анализах неизвестное количество анализируемого соединения или антитела определяют по его способности вытеснять известное количество меченого антитела или анализируемого соединения. Таким образом, поддающаяся количественному определению потеря сигнала является признаком количества неизвестного антитела или анализируемого соединения в образце.

В рамках настоящего изобретения авторы изобретения предлагают использовать меченые моноклональные антитела против вируса чикунгунья для определения количества антител против вируса чикунгунья в образце. Основной формат включает приведение в контакт известного моноклонального антитела против вируса чикунгунья (связанного с поддающейся обнаружению меткой) с антигеном или частицей

вируса чикунгунья. Антиген или организм вируса чикунгунья предпочтительно связывают с подложкой. После связывания меченого моноклонального антитела с подложкой добавляют образец и инкубируют в условиях, позволяющих какому-либо немеченому антителу в образце конкурировать с меченым моноклональным антителом и, таким образом, вытеснять его. Посредством измерения либо утраченной метки, либо оставшейся метки (и вычитания этого количества из исходного количества связанной метки) можно определить, сколько немеченого антитело связано с подложкой и, таким образом, сколько антитела присутствовало в образце.

B. Вестерн-блоттинг.

Вестерн-блоттинг (альтернативно иммуноблоттинг белков) представляет собой аналитический способ, используемый для обнаружения конкретных белков в данном образце гомогената или экстракта ткани. В нем используется гель-электрофорез для разделения нативных и денатурированных белков по длине полипептида (денатурирующие условия) или по 3-D структуре белка (нативные/не денатурирующие условия). Затем белки переносят на мембрану (как правило, нитроцеллюлоза или PVDF), где их исследуют (обнаруживают) с использованием антител, специфичных к белку-мишени.

Образцы могут быть получены из цельной ткани или из клеточной культуры. В большинстве случаев солидные ткани сначала разрушают механически с использованием измельчителя (для образцов более крупных объемов), с использованием гомогенизатора (меньшие объемы) или посредством обработки ультразвуком. Клетки также можно разрушать одним из описанных выше механических способов. Однако следует отметить, что бактерии, вирус или образцы окружающей среды могут быть источником белка и, таким образом, вестерн-блоттинг не ограничивается только клеточными исследованиями. Для способствования лизису клеток и солюбилизации белков можно использовать подходящие детергенты, соли и буферы. Часто добавляют ингибиторы протеаз и фосфатаз для предотвращения расщепления образца его собственными ферментами. Подготовку ткани часто проводят при холодных температурах во избежание денатурации белков.

Белки образца разделяют с использованием гель-электрофореза. Разделение белков может быть осуществлено по изоэлектрической точке (pI), молекулярной массе, электрическому заряду или комбинации этих факторов. Характер разделения зависит от обработки образца и природы геля. Это является в высокой степени пригодным способом определения белка. Также можно использовать двумерный (2-D) гель, который разделяет белки из одного образца в двух направлениях. Белки разделяются в соответствии с изоэлектрической точкой (значение pH, при котором они имеют нейтральный суммарный заряд) в первом направлении и в соответствии с их молекулярной массой во втором направлении.

Для получения белков, доступных для обнаружения антителом, их перемещают из геля на мембрану, изготовленную из нитроцеллюлозы или поливинилидендифторида (PVDF). Мембрану помещают над гелем и на него помещают стопку фильтровальной бумаги. Всю стопку помещают в буферный раствор, который перемещается вверх бумаги посредством капиллярного действия, привлекая с собой белки. Другой способ переноса белков называют электроблоттином, и в нем используется электрический ток для извлечения белков из геля на PVDF или нитроцеллюлозную мембрану. Белки двигаются из геля в мембрану, сохраняя организацию, которую они имели в геле. В результате этого процесса блоттинга белки экспонируются на тонком поверхностном слое для обнаружения (см. ниже). Оба типа мембраны выбирают вследствие их свойств неспецифического связывания белков (т.е. связывают все белки в равной степени хорошо). Связывание белков основано на гидрофобном взаимодействии, а также на зарядовых взаимодействиях между мембраной и белком. Нитроцеллюлозные мембраны дешевле, чем PVDF, однако они значительно более хрупкие и плохо выдерживают повторное испытание. Единообразие и общую эффективность переноса белка из геля на мембрану можно проверять посредством окрашивания мембраны кумасси бриллиантовым синим или красителем Ponceau S. После переноса обнаружение белков проводят с использованием меченых первичных антител или немеченых первичных антител с последующим непрямым обнаружением с использованием меченого белка A или вторичных меченых антител, связывающихся с Fc-областью первичных антител.

C. Иммуногистохимия.

Антитела по настоящему изобретению также можно использовать совместно как со свежезамороженными, так и/или фиксированными формалином залитыми парафином блоками тканей для исследования посредством иммуногистохимии (IHC). Способ получения блоков тканей из конкретных образцов успешно использовался в предшествующих исследованиях посредством IHC различных прогностических факторов, и он хорошо известен специалистам в данной области (Brown et al., 1990; Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990).

В кратком изложении, замороженные срезы можно получать посредством регидратации 50 нг замороженной "растертой" ткани при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере (PBS) в небольших пластмассовых капсулах; осаждения частиц посредством центрифугирования; ресуспендирования их в вязкой заливочной среде (OCT); переворачивания капсулы и/или вновь осаждения посредством центрифугирования; быстрого замораживания в изопентане, имеющем температуру -70°C; разрезания пластмассовой капсулы и/или удаления замороженного цилиндра ткани; закрепления тканевого цилиндра на патроне криостата-микротома; и/или проведения 25-50 последовательных срезов с капсулы. Альтерна-

тивно для серийного нарезания срезов можно использовать замороженные образцы тканей.

Долговечные срезы можно получать сходным способом, вовлекающим регидратацию 50 мг образца в пластмассовой микроцентрифужной пробирке; осаждение; ресуспендирование в 10% формалина для фиксации в течение 4 ч; промывание/осаждение; ресуспендирование в теплом 2,5% агаре; осаждение; охлаждение в ледяной воде для застывания агара; удаление блока ткани/агара из пробирки; пропитывание и/или заливку блока парафином и/или проведение вплоть до 50 последовательных долговечных срезов. Вновь, целые образцы ткани можно заменять.

D. Наборы для иммунодетекции.

В следующих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам для иммунодетекции для применения в способах иммунодетекции, описанных выше. Поскольку антитела можно использовать для обнаружения вируса чикунгунья или антигенов вируса чикунгунья, антитела могут быть включены в набор. Таким образом, наборы для иммунодетекции включают в подходящих контейнерах первое антитело, которое связывается с вирусом чикунгунья или антигеном вируса чикунгунья, и необязательно реагент для иммунодетекции.

В определенных вариантах осуществления антитело против вируса чикунгунья может быть предварительно связано с твердой подложкой, такой как матрица колонки и/или лунка планшета для микротитрования. Реагенты для иммунодетекции в наборе могут иметь любую из множества форм, включая поддающиеся обнаружению метки, которые ассоциированы или связаны с данным антителом. Также предусматриваются поддающиеся обнаружению метки, которые ассоциированы или связаны со вторичным связывающим лигандом. Иллюстративные вторичные лиганды представляют собой вторичные антитела, которые обладают аффинностью связывания в отношении первого антитела.

Следующие подходящие реагенты иммунодетекции для применения в наборах по настоящему изобретению включают двухкомпонентный реагент, который содержит вторичное антитело, которое обладает аффинностью связывания с первым антителом, а также третье антитело, которое обладает аффинностью связывания со вторым антителом, причем третье антитело связано с поддающейся обнаружению меткой. Как отмечалось выше, в данной области известен ряд иллюстративных меток, и все такие метки можно использовать в рамках настоящего изобретения.

Кроме того, наборы могут содержать подходящим образом распределенную на аликвоты композицию вируса чикунгунья или антигена вируса чикунгунья, как меченых, так и немеченых, которые можно использовать для получения стандартной кривой для анализа обнаружения. Наборы могут содержать конъюгаты антитело-метка, либо в полностью конъюгированной форме, либо в форме промежуточных соединений, либо в качестве отдельных частей для конъюгации пользователем набора. Компоненты наборов могут быть упаковываны либо в водных средах, либо в лиофилизированной форме.

Контейнеры набора, как правило, включают по меньшей мере один флакон, тест-пробирку, колбу, бутылку, шприц или другие контейнеры, в которые антитело может быть помещено или предпочтительно подходящим образом распределено аликвотами. Наборы по настоящему изобретению, как правило, включают средства для содержания антитела, антигена и любые другие контейнеры, находящиеся вблизи друг от друга в ограниченном пространстве для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать инжекционно формуемые или формуемые литьем с раздувом пластмассовые контейнеры, в которых удерживаются желаемые флаконы.

VI. Примеры.

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления. Специалистам в данной области должно быть понятно, что способы, описанные в примерах, которые следуют далее, отражают способы, разработанные авторами изобретения для надлежащего применения вариантов осуществления на практике, и, таким образом, их можно считать составляющими предпочтительные способы для его применения на практике. Однако специалисты в данной области должны в свете настоящего изобретения понять, что многие изменения можно вносить в конкретные варианты осуществления, которые описании, и все еще получать подобный или сходный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 1. Материалы и способы.

Выделение mAb человека.

PBMC получали от человека через ~5 лет после документированной симптоматической инфекции CHKV в Шри-Ланке. В-клетки трансформировали в 384-луночных планшетах посредством EBV в присутствии CpG. Супернатанты полученных В-клеточных лимфобластных линий подвергали скринингу в отношении присутствия специфичных к CHKV человека связывающих антител посредством ELISA с использованием живого вируса CHIKV вакцинного штамма 181/25 в качестве антигена. Трансформированные В-клетки собирали и подвергали слиянию с миеломной клеточной линией, распределяли в планшеты для культивирования и увеличения в количестве, и подвергали селекции посредством выращивания в среде с гипоксантином-аминоптерином-тимидином, содержавшей уабаин. Гибридомы клонировали посредством сортировки единичных клеток. Супернатанты клонированных гибридом, выращенных в бессывороточной среде, собирали, очищали и концентрировали из очищенной среды посредством хроматографии с белком G.

Анализы нейтрализации.

Очищенные белки mAb-IgG исследовали в отношении нейтрализующей активности с использованием репликонных частиц (VRP) вируса CHKV или каждого из 4 живых вирусов чикунгунья, соответствующих разнообразному генетическому и географическому профилю. VRP CHIKV, которые кодировали GFP, получали путем разработки системы-помощника репликона CHIKV из трех плазмид на основе плазмиды, содержавшей полноразмерную кДНК геноной последовательности CHIKV штамма SL15649 (GenBank: GU189061.1), с использованием методологий клонирования на основе ПЦР. VRP инкубировали с разведениями mAb, а затем инокулировали в монослои клеток Vero 81 на 18 ч; инфицированные клетки и тотальные клетки (идентифицированные с использованием ядерного маркера) идентифицировали с использованием флуоресцентной визуализирующей системы. Для определения охвата и эффективности нейтрализации mAb авторы изобретения использовали четыре репрезентативных живых штамма вируса с по меньшей мере одним репрезентативным штаммом для каждого генотипа CHIKV, включая один прототипный вирус из каждого из трех генотипов, а также штамм текущей вспышки в Карибском бассейне. Нейтрализующую активность определяли с использованием теста нейтрализации по подавлению фокусообразования. Серийные разведения очищенных mAb человека инкубировали со 100 фокусобразующими единицами CHIKV при 37°C в течение 1 ч. Комплексы MAb-вирус добавляли к клеткам Vero в 9б-луночных планшетах, а затем выявляли бляшки после фиксации клеток с использованием выявления с иммунопероксидазои и количественно определяли с использованием анализатора ImmunoSpot 5.0.37 macroanalyzer (Cellular Technologies Ltd). Величины EC_{50} вычисляли с использованием нелинейного регрессионного анализа после сравнения с лунками, инокулированными CHIKV в отсутствие антитела.

ELISA E2. Рекомбинантный белок эктодомена E2 CHIKV (соответствующий штамму CHIKV-LR2006) получали в E. coli и адсорбировали на микропланшеты для титрования. Наносили mAb человека, а затем проводили обнаружение связанных специфичных к CHKV mAb с использованием конъюгированного с биотином антитела козы против IgG человека.

Конкурентный анализ связывания. Авторы изобретения идентифицировали группы антител, связывающихся с одним и тем же основным антигенным участком, по конкуренции пар антител за связывание с белком эктодомена E2 CHIKV-LR2006, содержащим полигистидиновую метку, связанную с наконечником биосенсора Anti-Penta-His biosensor tip (ForteBio #18-5077) в биосенсоре Octet Red biosensor (ForteBio).

Аланин-сканирующий мутагенез для картирования эпитопов.

Экспрессирующую конструкцию для белка оболочки CHIKV (штамм S27, Uniprot Reference #Q8JUX5) с C-концевой меткой V5 подвергали аланин-сканирующему мутагенезу для получения всесторонней библиотеки мутаций. Праймеры конструировали для мутации каждого остатка в областях E2, 6K и E1 белков оболочки (остатки Y326-H1248 в структурном полибелке) на аланин; кодоны аланина подвергали мутации на серии. Всего было получено 910 мутантов белка оболочки CHIKV. Снижение связывания mAb с каждой конструкцией исследовали с помощью иммунофлуоресцентного связывающего анализа с использованием клеточной флуоресценции, обнаруживаемой с использованием высокопроизводительного проточного цитометра.

Механизм нейтрализации.

MAb подвергали взаимодействию с VRP до или после связывания с клетками Vero 81, а затем клетки окрашивали, визуализировали и анализировали, как описано для анализов нейтрализации VRP, для определения того, на какой стадии mAb демонстрировали противовирусный эффект. Анализы слияния изнутри и слияния снаружи проводили, как подробно описано в "Дополнительных экспериментальных методиках".

Исследования защиты in vivo у мышей.

Мышей $Ifnar^{-/-}$разводили в не имеющих патогенов вивариях и эксперименты по инфицированию проводили в помещениях A-BSL3. Инъекции в подушечки стоп проводили под анестезией. Для исследований профилактики mAb человека вводили посредством внутрибрюшинной инъекции мышам $Ifnar^{-/-}$ в возрасте 6 недель за 1 сутки до подкожной инокуляции в подушечку лапы посредством 10 ФОЕ CHIKV-LR. Для терапевтических исследований 10 ФОЕ CHIKV-LR доставляли за 24, 48 или 60 ч до введения однократной дозы индивидуальных mAb или комбинаций mAb человека в указанных дозах.

Индивидуум и выделение клеток периферической крови.

В остальном у здоровый индивидуум был предоставлен в октябре 2006 года с инфекцией CHIKV. Симптомы инфекции CHIKV совпали с возвращением из Шри-Ланки, посещаемой в течение одного года, в ходе которого пациент проводил время на городских территориях (в основном Коломбо), и в сельской местности, включая тропический лес и прибрежные зоны. Пациент перенес множество укусов насекомых в ходе посещения, но у него сохранялось хорошее состояние здоровья на протяжении пребывания. По возвращении в США индивидуум поступил к врачу общей практики с лихорадкой (102°F (38,9°C)), длившейся трое суток. Пациент сообщил о сопутствующим развитии двухсторонней боли в суставах локтей и пальцев и выступающей незудящей сыпи на спине и животе, сопровождающейся общей "болью в теле" и головной болью. При поступлении он выглядел хорошо и у него не было острого нарушения.

Мягкая, бледная, папулезная сыпь выступала на спине, груди и животе (см. фиг. 4). Отмечался мягкий конъюнктивит. При обследовании скелета отмечались болезненные опухшие пальцы, колени и локти, на которых не было эритемы и выпота. Мышечная сила и амплитуда движений пораженных суставов были интактными, однако движение в суставах вызывало боль.

Была взята кровь на CBC, серологию и мазки на малярию, и пациент был отпущен. Количество лейкоцитов составляло $4{,}0\times10^4$ клеток/мм^3, гематокрит составлял 41% и количество тромбоцитов составляло 180000/мм^3. Общее количество лимфоцитов составляло $1{,}0\times10^4$ клеток/мм^3. Мазки на малярию и серологические тесты были отрицательными, и пациенту ориентировочно поставили диагноз вирусного заболевания неизвестной этиологии.

Пациент вернулся в клинику через две недели, без лихорадки, но с персистирующей артралгией, наиболее выраженной в пальцах. Пациент описывал боль и скованность, не улучшившиеся и, возможно, ухудшившиеся относительно его предшествующего посещения. Пациент сообщил, что в регионе его предыдущего путешествия происходила вспышка чикунгунья. Была взята кровь и отделена сыворотка и отправлена в CDC для ПЦР и серологического тестирования, которые подтвердили диагноз инфекции чикунгунья.

В апреле 2012 года через пять с половиной лет после указанной инфекции, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделили посредством разделения в градиенте плотности на Ficoll без известного воздействия CHIKV или других артритогенных альфавирусов в промежуточный период во время жизни в США. Клетки подвергали криосохранению и хранили и жидком азоте до исследования. Протокол набора индивидуумов и взятия образцов крови был одобрен комиссией по биомедицинской этике University of North Carolina at Chapel Hill и Vanderbilt University Medical Center.

Получение гибридом человека.

Криосохраненные образцы PBMC размораживали быстро при 37°C и промывали перед трансформацией вирусом Эпштейна-Барр, как описано (Smith et al., 2012). Культуры инкубировали при 37°C с 5% CO_2 в течение 10 суток и подвергали скринингу в отношении присутствия клеток, секретирующих антитела, специфичные к CHIKV, в супернатанте с использованием анализов нейтрализации VRP и ELISA. Авторы изобретения провели две независимых трансформации с использованием отдельных аликвот одного и того же образца крови.

В первой трансформации авторы изобретения получили 3840 культур (10×384-луночных планшетов), содержавших в среднем 42 трансформированных B-клеточных колонии на культуру с всего приблизительно 161000 индивидуальных B-клеточных колоний. Для скрининга антител, которые демонстрируют нейтрализующую активность против CHIKV в условиях BSL2, авторы изобретения разработали высокопроизводительный анализ нейтрализации по уменьшению флуоресценции с использованием репликонных частиц (VRP) CHIKV, которые экспрессируют зеленый флуоресцентный белок, в качестве репортера. VRP представляют собой вирионы, которые экспонируют нативные вирусные гликопротеины, но лишены полноразмерного вирусного генома и, таким образом, неспособны давать инфекционное потомство (Vander Veen et al., 2012). Авторы изобретения использовали VRP, полученные из штамма SL15649 (Morrison et al., 2011), который был выделен в Шри-Ланке в 2006 году. SL15649 является совпадающим по времени со штаммом, который инфицировал донора, и, вероятно, имеет очень сходную последовательность. Из этого эксперимента авторы изобретения идентифицировали 160 B-клеточных культур, супернатанты которых опосредовали нейтрализацию с 90% ингибированием, что указывает на частоту 0,099% вирус-специфических B-клеток на все B-клетки (~1 на 1000). Всего 60 из этих линий осуществляли ингибирование на уровне >98%, и при вторичном скрининге супернатанты 58 из 60 линий содержали антитела, которые связывались в ELISA с продуцированным клеточной культурой CHIKV (штамм 181/25), иммобилизованном на планшете для иммуноанализа. Авторы изобретения отобрали 35 из 58 линий с наиболее высокой активностью нейтрализации и связывания для слияния гибридом, идентифицировали 22 гибридомы со связывающими вирус супернатантами после слияния и посева, и успешно выделили 14 клонов для дальнейшего исследования. Во второй трансформации авторы изобретения получили 1536 культур (4×384-луночных планшета), содержащих в среднем 38 трансформированных B-клеточных колоний на культуру с предположительно всего приблизительно 58000 протестированных индивидуальных B-клеточных колоний, что указывает на частоту вирус-специфических B-клеток 0,1% (вновь ~1 на 1000). В этом эксперименте они использовали первичный скрининг связывания в ELISA со штаммом CHIKV 181/25 без предшествующего теста нейтрализации. Авторы изобретения идентифицировали 60 линий с сигналом оптической плотности в ELISA, более чем в четыре раза превышающим фоновый уровень, отобрали 30 линий B-клеток с наиболее высоким сигналом оптической плотности в ELISA для слияния, идентифицировали 18 гибридом со связывающими вирус супернатантами после слияния и посева, и успешно выделили 16 клонов для дальнейшего исследования.

Слияние с клетками миеломы.

Клетки из лунок с супернатантами, способными нейтрализовывать инфекционность CHIKV, подвергали слиянию с несекретирующими клетками миеломы HMMA2.5, как описано (Smith et al., 2012). Полученные гибридомы отбирали по росту в среде с гипоксантином-аминоптерином-тимидином (HAT),

содержавшей уабаин, биологически клонировали посредством FACS единичных клеток с использованием клеточного сортировщика FACSAria III (BD Biosciences) и увеличивали в количестве.

Продукция и очистка mAb человека.

Лунки, содержавшие гибридомы, продуцирующие антитела, специфичные к CHIKV, клонировали посредством трех раундов лимитирующего разведения или с использованием устройства ClonePix (Molecular Devices) в соответствии с инструкциями изготовителя. После получения индивидуальных клонов каждую гибридому увеличивали в количестве до 50% смыкания монослоя в 75-см^2 колбах. Для экспрессии антител клетки собирали с использованием клеточного скребка, промывали бессывороточной средой (GIBCO Hybridoma-SFM от Invitrogen, 12045084) и разделяли поровну на четыре колбы объемом 225 см^2 (Corning, 431082), содержавшие 250 мл бессывороточной среды. Клетки инкубировали в течение 21 суток, а затем среду очищали центрифугированием и пропускали через 0,2-мкм стерильный фильтр. Антитела очищали из очищенной среды посредством хроматографии с белком G (GE Life Sciences, Protein G HP Columns).

Клетки. Клетки BHK-21 (ATCC CCL-10) поддерживали в минимальной поддерживающей среде альфа (αMEM; Gibco), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) и 10% фосфатом триптозы (Sigma). Клетки Vero 81 (ATCC CCL-81) поддерживали в αMEM, дополненной 5% FBS. Среду всех клеток дополняли 0,29 мг/мл L-глутамина (Gibco), 100 Е/мл пенициллина (Gibco), 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) и 500 нг/мл амфотерицина B. Клетки поддерживали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2.

Получение плазмидных конструкций VRP CHIKV.

Система-помощник репликона CHIKV с тремя плазмидами была получена из плазмиды, содержавшей полноразмерную кДНК геномной последовательности CHIKV штамма SL15649 (GenBank: GU189061.1), с использованием методологий клонирования на основе ПЦР. Геном репликона CHIKV конструировали с использованием двухстадийного процесса, который вовлекал получение промежуточного клонирующего вектора, в котором полноразмерная структурная кассета CHIKV была заменена участком множественного клонирования (MCS). Усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) субклонировали в участок множественного клонирования этой плазмиды с получением pMH41 (репликон CHIKV SL15649 eGFP). Конструирование системы-помощника с двумя плазмидами включало многостадийный процесс клонирования, который вовлекал получение плазмиды-помощника с полноразмерным структурным геном посредством удаления основной части (6891 нуклеотидов) неструктурной кассеты CHIKV. Полноразмерную структурную кассету далее подразделяли на две конструкции: pMH38 (капсидный помощник CHIKV SL15649), которая содержала последовательность гена капсида, за которой следовал уникальный участок рестрикции AvrII, и pMH39 (гликопротеиновый помощник CHIKV SL15649), которая содержала делецию в рамке считывания капсидного РНК-связывающего домена за которой следовала интактная кодирующая последовательность гликопротеина оболочки (E3-E1).

Продукция рекомбинантного p62-E1 CHIKV.

Плазмиду, содержавшую p62 CHIKV (т.е. E3 [а.к.S1-R64]-E2 [а.к.S1-E361]-линкер из 16 аминокислот-El [а.к.Y1-Q411], за которыми следовала His-метка) (Voss et al., 2010) трансфицировали в клетки 293F с использованием реагента 293fectin (Invitrogen). После инкубации в течение 72 часов супернатант удаляли и клетки культивировали в течение дополнительных 72 часов. Объединенные супернатанты наносили на колонку с никель-агарозными гранулами (GoldBio) и элюировали имидазолом. Белок далее очищали с использованием колонки для гель-фильтрации Superdex S200 (GE Life Sciences). Фракции, содержавшие белок p62-E1 CHIKV, объединяли, замораживали и хранили при -80°C.

Получение исходного материала VRP, происходящих из CHIKV штамма SL15649.

Исходный материал VRP выделяли из рекомбинантных плазмид CHIKV в сертифицированном помещении с 3 уровнем биологической безопасности (BSL3) в биологических ламинарных шкафах в соответствии с протоколами, одобренными Vanderbilt University Department of Environment, Health, and Safety и Vanderbilt Institutional Biosafety Committee. Три плазмиды репликонной системы SL15649 линеаризовывали расщеплением посредством NotI-HF, очищали посредством экстракции фенолом-хлороформом и использовали в качестве матриц в реакциях транскрипции с использованием набора для транскрипции mMessage mMachine SP6 (Life Technologies) с получением кэппированных полноразмерных РНК-транскриптов in vitro. Транскрипты вирусной РНК вводили в клетки BHK21 посредством электропорации с использованием устройства для электропорации GenePulser. Культуральные супернатанты, содержавшие VRP, собирали через 24 ч после электропорации; супернатанты очищали посредством центрифугирования при 855хд в течение 20 мин, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C. Исходный материал VRP оценивали на компетентный в отношении увеличения в количестве рекомбинантный вирус посредством серийного пассирования 20% исходного материала и 10% культурального супернатанта пассажа 1 с использованием клеток Vero81, которые исследовали в отношении цитопатического эффекта (CPE) через 72 ч после инфицирования. Исходные материалы считали прошедшими этот тест на безопасность, когда CPE не обнаруживался в последнем пассаже. Затем исходный материал перемещали из лаборатории BSL3.

Анализ нейтрализации VRP и анализ с репортером GFP.

Клетки Vero 81 ($2,25\times10^3$ клеток/лунка) высевали в лунки 384-луночных планшетов и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Чистый супернатант гибридомы или серийные разведения очищенных mAb инкубировали с VRP при MOI ~5 инфекционных единиц/клетка в буфере для разведения вируса (VDB; среда RPMI, содержащая 20 мМ HEPES, дополненный 1% FBS) при 37°C в течение 1 ч, а затем адсорбировали на клетки. Клетки инкубировали при 37°C в течение 18 ч, окрашивали красителем Хехста для мечения ядер и визуализировали с использованием визуализирующей системы ImageXpress Micro XL (Molecular Devices) в Vanderbilt High-Throughput Screening Facility. Тотальные и инфицированные CHIKV клетки (маркированные экспрессией GFP) количественно определяли с использованием программного обеспечения MetaXpress (Molecular Devices) в двух полях зрения на лунку. Для каждого антитела определяли величины EC_{50} с 95% доверительным интервалом с использованием нелинейной регрессии для аппроксимации отдельных логистических кривых роста с использованием программы R statistics (R.C. Team, 2014).

Исходные материалы вируса, полученные в качестве антигена для ELISA.

Плазмиду инфекционного клонов для вакцинного штамма CHIKV 181/25 (Levitt et al., 1986 и Mainou et al., 2013) линеаризовывали посредством NotI-HF и транскрибировали in vitro с использованием набора для транскрипции mMessage mMachine SP6 (Life Technologies). Вирусную РНК вводили в клетки BHK21 посредством электропорации. Культуральные супернатанты собирали через 24 ч, очищали посредством центрифугирования при 855×g в течение 20 мин, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C.

ELISA для улавливания вируса для скрининга гибридом.

Связывание антитела с вирусными частицами проводили посредством покрытия планшетов для анализа очищенным mAb мыши CHK-187 (Pal et al., 2013), приготовленном в концентрации 1 мкг/мл в буфере для связывания 0,1 M Na_2CO_3 и 0,1 M $NHCO_3$, pH 9,3, которое использовали для нанесения на планшеты для ELISA (Nunc 242757), и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшетов в течение 1 ч с блокирующим буфером (1% сухое молоко и 2% сыворотка козы в PBS с Tween 20 [PBS-T]), планшеты промывали пять раз посредством PBS-T и инкубировали с 25 мкл культурального супернатанта монослоев клеток BHK21, инфицированных вакцинным штаммом CHIKV 181/25. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа планшеты промывали десять раз PBS, и добавляли 10 мкл культурального супернатанта B-клеток к 25 мкл/лунка блокирующего буфера. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем промывали пять раз посредством PBS-T. Вторичное антитело, конъюгированное с щелочной фосфатазой (антитело козы против Fc человека; Meridian Life Science, W99008A) применяли в разведении 1:5000 в 25 мкл/лунка блокирующего буфера и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После пяти промываний посредством PBS-T, добавляли раствор субстрата фосфатазы (1 мг/мл субстрата фосфатазы в 1 M Tris аминометане [Sigma, S0942]) в количестве 25 мкл/лунка и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем определяли оптическую плотность при 405 нм с использованием устройства для считывания планшетов Biotek. CHIKV-специфические контрольные mAb человека. В некоторых анализах в качестве положительных контролей использовали два ранее описанных CHIKV-специфических mAb человека, 5F10 и 8B10 (Warter et al., 2011) . Эти mAb экспрессировали в клетках 293F (Invitrogen) после трансфекции экспрессирующей IgG1 плазмидой (Lonza), содержавшей кДНК с оптимизированной последовательностью генов вариабельных областей антител 5F10 и 8B10 на основе последовательностей, предоставленных Cheng-I Wang и Alessandra Nardin (Singapore Immunology Network, A*STAR, Singapore).

ELISA для mAb, связывающегося с белком E2.

Рекомбинантный белок эктодомена E2 CHIKV (соответствующий штамму CHIKV-LR2006) продуцировали в E. coli, как описано (Pal et al., 2013), и адсорбировали на микропланшеты для титрования (100 мкл раствора белка E2 2 мкг/мл в 0,1 M Na_2CO_3, 0,1 M $NaHCO_3$, и 0,1% NaN_3 [pH 9,3]) при 4°C в течение ночи. Планшеты ополаскивали три раза посредством PBS, содержавшего 0,05% Tween-20, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч с блокирующим буфером (PBS, 0,05% Tween-20, и 2% (мас./об.) BSA). В лунки добавляли первичное mAb человека (разбавленное до 10 мкг/мл в блокирующем буфере) при комнатной температуре на 1 ч. Планшеты ополаскивали три раза PBS, содержавшим 0,05% Tween-20, и последовательно добавляли вторичное антитело (конъюгированное с биотином антитело козы против IgG человека (H- и L-цепи) с минимальной перекрестной реактивностью в отношении белков сыворотки мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories), разбавленное 1/20000 блокирующим буфером), и конъюгированную со стрептавидином пероксидазу хрена (разбавленную PBS с 0,05% Tween-20; Vector Laboratories), в каждом случае при комнатной температуре на 1 ч с ополаскиванием планшета между стадиями. После ополаскивания четыре раза посредством PBS планшеты инкубировали при комнатной температуре с 100 мкл раствора хромогенного субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (Dako) в течение 5 мин и реакцию останавливали добавлением 2 H H_2SO_4. Интенсивность окрашивания продукта определяли с использованием устройства для считывания планшетов для ELISA при оптической плотности 450 нм.

Измерение аффинности посредством поверхностного плазмонного резонанса.

Взаимодействия очищенных mAb человека и белков CHIKV анализировали кинетически с исполь-

зованием устройства Biacore T100, как описано (Austin et al., 2012). Для интактного IgG с растворимым p62-E1 CHIKV, антитела против IgG человека (GE Life Sciences) иммобилизовывали на чипе Series S CM5 и использовали для улавливания антител против CHIKV или контрольных антител (hu-WNV E16). P62-E1 CHIKV инжектировали над поверхностью со скоростью 65 мкл/мин в течение 180 с и позволяли диссоциировать в течение 1000 с, а затем проводили регенерацию посредством 3 M $MgCl_2$ между циклами. Некоторые антитела не связывались с мономерным белком E1, таким образом, авторы изобретения протестировали их в отношении связывания с VLP. Для кинетических измерений с VLP CHIKV антитела против IgG мыши (GE Life Sciences) иммобилизовывали для улавливания группы антител мыши против CHIKV с субнаномолярной аффинностью, которые в свою очередь использовали для улавливания VLP CHIKV. IgG или Fab против CHIKV инжектировали над поверхностью чипа со скоростью 65 мкл/мин в течение 180 с и позволяли им диссоциировать в течение 1000 с, а затем колонку регенерировали посредством 10 мМ глицина, pH 1,7, между циклами. Все данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Biacore Evaluation Software (версии 1.1.1) и глобальной аппроксимации Ленгмюра 1:1 для кривых. Результаты получали для по меньшей мере трех независимых экспериментов.

Штаммы вируса, использованные для тестов нейтрализации посредством подавления фокусообразования. Для определения охвата и эффективности нейтрализации mAb, авторы изобретения использовали четыре репрезентативных живых штамма вируса по меньшей мере с одним репрезентативным штаммом для каждого генотипа CHIKV, включая один прототипный вирус из каждого из трех генотипов, а также штамм текущей вспышки в Карибском бассейне. Штамм LR2006_OPY1 (LR) (восточно/центрально/южноафриканский (ECSA) генотип CHIKV) был предоставлен Stephen Higgs (Manhattan, KS). Штамм NI 64 IbH 35 (западно-африканский генотип) и штаммы RSU1 и 99659 (азиатский генотип; выделенные в 2014 году от субъекта на Британских Виргинских островах (Lanciotti & Valadere, 2014)) были предоставлены Robert Tesh (World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses, Galveston, TX).

Тест нейтрализации посредством подавления фокусообразования (FRNT) с инфекционным CHIKV.

Серийные разведения очищенных mAb человека инкубировали со 100 фокусобразующими единицами CHIKV (ФОЕ) при 37°C в течение 1 ч. Комплексы MAb-вирус добавляли к клеткам Vero в 96-луночных планшетах. После инкубации в течение 90 мин на клетки наслаивали 1% (мас./об.) метилцеллюлозу в модифицированной среде Игла (MEM), дополненной 2% FBS. Клетки инкубировали в течение 18 ч и фиксировали 1% параформальдегидом в PBS. Клетки инкубировали последовательно с 500 нг/мл CHK-11 мыши (Pal et al., 2013) и конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) антителом козы против IgG мыши в PBS, дополненном 0,1% сапонином и 0,1% бычьим сывороточным альбумином (BSA). Инфицированные CHIKV бляшки визуализировали с использованием субстрата пероксидазы TrueBlue (KPL) и количественно определяли с использованием анализатора ImmunoSpot 5.0.37 macroanalyzer (Cellular Technologies Ltd). Величины EC_{50} вычисляли с использованием нелинейного регрессионного анализа после сравнения с лунками, инокулированными CHIKV в отсутствие антитела.

Конкурентный анализ связывания на основе интерферометрии биослоя.

Белок эктодомена E2 CHIKV-LR2006, содержащий полигистидиновую метку (20 мкг/мл), иммобилизовывали на наконечниках биосенсора Anti-Penta-His (ForteBio #18-5077) в течение 2 мин. После определения исходного сигнала в кинетическом буфере (KB, IX PBS, 0,01% BSA и 0,002% Tween 20) в течение 1 мин, наконечники биосенсора погружали в лунки, содержавшие первичное антитело, в концентрации 100 мкг/мл на 5 мин, а затем погружали в лунки, содержавшие конкурирующие mAb в концентрации 100 мкг/мл на 5 мин. Процентное связывание конкурирующего mAb в присутствии первого mAb определяли посредством сравнения максимального сигнала конкурирующего mAb, добавленного после первоначального комплекса mAb, к максимальному сигналу конкурирующего mAb отдельно. Антитела считали конкурирующими за связывание одного участка, если максимальное связывание конкурирующего mAb снижалось до <30% относительно аффинности связывания отдельно. Антитела считали не конкурирующими, если максимальное связывание конкурирующего mAb составляло >70% от неконкурентного связывания. Уровень 30-70% неконкурентного связывания считался промежуточной конкуренцией.

Картирование эпитопов посредством мутагенеза.

Экспрессирующую конструкцию белка оболочки CHIKV (штамм S27, ссылочный номер Uniprot #Q8JUX5) с C-концевой меткой V5 подвергали аланин-сканирующему мутагенезу для получения всесторонней библиотеки мутаций. Праймеры конструировали для мутации каждого остатка в областях E2, 6K и E1 белков оболочки (остатки Y326-H1248 в структурном полибелке) на аланин; кодоны аланина подвергали мутации на серии (Fong et al., 2014). Всего было получено 910 мутантов белка оболочки CHIKV (охват 98,5%), последовательность подтверждена, и их упорядочивали в 384-луночных планшетах. Клетки HEK-293T трансфицировали библиотекой мутаций CHIKV в 384-луночных планшетах и инкубировали в течение 22 ч. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Electron Microscopy Sciences) в PBS плюс кальций и магний (PBS+/+) и окрашивали очищенными mAb в концентрации 0,25-1,0 мкг/мл или очищенными Fab-фрагментами в концентрации 2,5 мкг/мл, разбавленными 10% нормальной сывороткой козы (NGS; Sigma). Концентрации первичных антител определяли с использованием независимой кривой титрования иммунофлуоресценции против белков оболочки CHIKV дикого типа, чтобы убедиться, что сигналы находятся в пределах линейного диапазона обнаружения. Антитела выявляли с использованием

3,75 мкг/мл конъюгированного с AlexaFluor488 вторичного антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в 10% NGS. Клетки промывали два раза PBS без магния и кальция (PBS -/-) и ресуспендировали в Cellstripper (Cellgro) с 0,1% BSA (Sigma). Среднюю флуоресценцию клеток выявляли с использованием высокопроизводительного проточного цитометра (HTFC, Intellicyt). Реактивность антител против каждого мутантного клона вычисляли относительно реактивности белка дикого типа посредством вычитания сигнала из трансфицированных имитирующей конструкцией контролей и нормализации к сигналу контролей, трансфицированных конструкцией дикого типа. Аминокислоты идентифицировали как требующиеся для связывания mAb, если соответствующий аланиновый мутант не реагировал с исследуемым mAb, но реагировал с другими антителами против CHIKV. Эта стратегия контр-скрининга способствует исключению мутантов, которые неправильно свернуты или имеют дефект экспрессии (Christian et al., 2013, Paes et al., 2009 и Selvarajah et al., 2 013). Аминокислоты, требуемые для связывания антител, визуализировали на кристаллической структуре белка оболочки CHIKV (мономер PDB ID #3N41 и тример PDB ID #2XFB) с использованием программного обеспечения PyMol.

Анализы нейтрализации до и после прикрепления.

Клетки Vero 81 (ATCC CCL-81; ~$7,5\times10^3$ клеток/лунка) высевали в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали при 37°C в течение ~24 ч. Для анализов до прикрепления приготавливали разведения mAb при 4°C в буфере для разведения вируса (VDB) и предварительно инкубировали с VRP при 4°C в течение 1 ч. К предварительно охлажденным клеткам Vero 81 добавляли комплексы антитело-вирус при 4°C в течение 1 ч. Неадсорбированный вирус удаляли посредством трех промываний VDB и клетки инкубировали в полной среде при 37°C в течение 18 ч. Анализ после прикрепления проводили аналогичным образом, за исключением того, что эквивалентную MOI VRP сначала адсорбировали на клетках Vero 81 при 4°C в течение 1 ч, не связавшиеся VRP удаляли посредством трех промываний буфером для разведения вируса и клетки инкубировали с предварительно охлажденным VDB, содержавшим серийные разведения mAb при 4°C в течение 1 ч. Не связавшиеся mAb удаляли посредством трех промываний VDB и клетки инкубировали в полной среде при 37°C в течение 18 ч. Клетки окрашивали, визуализировали и анализировали, как описано для анализов нейтрализации VRP, с четырьмя полями зрения на лунку с получением всего ~800-1000 клеток, проанализированных в отношении экспрессии GFP, на образец.

Анализы ингибирования слияния.

Слияние вируса с плазматической мембраной оценивали с использованием анализа FFWO (Edwards & Brown, 1986). Клетки Vero 81 (~$3,75\times10^3$ клеток/лунка) высевали в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали при 37°C в течение ~24 ч. Клетки промывали один раз средой для связывания (RPMI 1640, дополненная 1% FBS, 25 мМ HEPES (pH 7,4) и 20 мМ NH_4Cl, для предотвращения инфицирования посредством эндосомального слияния) и инкубировали в среде для связывания при 4°C в течение 15 мин. Инокулят, содержавший VRP, разбавляли в среде для связывания и инкубировали с клетками при 4°C в течение 1 ч. Не связавшиеся VRP удаляли посредством двух промываний средой для связывания. Серийные разведения mAb в VDB инкубировали с клетками при 4°C в течение 1 ч и не связавшиеся mAb удаляли посредством двух промываний VDB. FFWO индуцировали добавлением предварительно нагретой среды для слияния (RPMI 1640, 1% FBS, 25 мМ HEPES и 30 мМ янтарная кислота при pH 5,5) при 37°C в течение 2 мин. В параллельных лунках добавляли контрольную среду (RPMI 1640, 1% FBS, 25 мМ HEPES при pH 7,4) при 37°C в течение 2 мин. Среду удаляли и клетки инкубировали в DMEM, дополненной 5% FBS, 20 мМ NH_4Cl (чтобы убедиться, что инфекция происходила только посредством pH-зависимого слияния плазматических мембран) и 25 мМ HEPES, pH 7,4). Через 18 ч после инфицирования клетки окрашивали, визуализировали и анализировали, как описано, с двумя полями зрения на лунку с получением всего ~800-1000 клеток, проанализированных в отношении экспрессии GFP, на образец.

Исследования защиты in vivo на мышах.

Это исследование проводили в строгом соответствии с рекомендациями Guide for the Care anf Use of Laboratory Animals от National Institutes of Health. Протоколы были одобрены Institutional Animal Care and Use Committee at Washington University School of Medicine (Assurance Number: A3381-01). Мышей $Ifnar^{-/-}$ разводили в не имеющих патогенов вивариях в Washington University School of Medicine, и эксперименты по инфицированию проводили в помещениях A-BSL3 при одобрении Washington University Animal Studies Committee. Инъекции в подушечки лап проводили под анестезией, которую индуцировали и поддерживали гидрохлоридом кетамина и ксилазином. Для исследований профилактики mAb человека вводили посредством внутрибрюшинной инъекции мышам $Ifnar^{-/-}$ в возрасте 6 недель за 1 сутки до подкожной инокуляции в подушечку лапы 10 ФОЕ CHIKV-LR, разбавленного в HBSS с 1% инактивированной нагреванием FBS. Для терапевтических исследований 10 ФОЕ CHIKV-LR доставляли за 24, 48 или 60 ч до введения однократной дозы индивидуальных mAb человека или их комбинаций в определенных дозах.

Пример 2 - результаты.

Выделение специфичных к CHIKV mAb человека.

Авторы изобретения выделили панель mAb от одного субъекта, который приобрел инфекцию CHIKV в Шри-Ланке в 2006 году и поступил с лихорадкой, артралгией и сыпью (фиг. 4). Клиническое течение, и трансформация B-клеток, и методики скрининга представлены в Online Methods. Они транс-

формировали В-клетки в двух отдельных экспериментах из одного образца крови, взятого от донора через пять с половиной лет после естественной инфекции. Они наблюдали частоту вирус-специфических В-клеток приблизительно 1 на 1000 тотальных В-клеток и получили 30 стабильных гибридом из линий В-клеток, секретирующих антитела, которые связывались с вирусом. Панель mAb содержала IgG нескольких подклассов с 24 IgG1, тремя IgG2 и двумя IgG3; один не определялся вследствие плохого роста гибридомы (табл. 5).

Оценка нейтрализации mAb.

Восемнадцать mAb продемонстрировали активность нейтрализации против репортерных частиц (VRP) азиатского штамма вируса CHIKV SL15649-GFP со значениями EC_{50}<40 нг/мл, причем одиннадцать продемонстрировали сверхвысокую ингибиторную активность (определенную как величины EC_{50}<10 нг/мл, табл.5). Четыре mAb обладали слабой ингибиторной активностью (значения EC_{50} в диапазоне от 0,1 до 5 мкг/мл), и восемь из mAb не обладали ингибиторной активностью при наиболее высоких протестированных концентрациях (значения EC_{50}>10 мкг/мл).

Охват нейтрализующей активности.

Авторы изобретения определили значения EC_{50} для каждого антитела против репрезентативных инфекционных штаммов CHIKV восточно/центрально/южно-африканского (ECSA) генотипа (штамм LR2006 OPY1 [LR]), западно-африканского генотипа (штамм NI 64 IbH 35) и азиатского генотипа (штаммы RSU1 и 99659, 2014, карибский) с использованием высокопроизводительного теста нейтрализации посредством подавления фокусообразования (FRNT) (Pal et al., 2013). Двадцать пять mAb продемонстрировали активность нейтрализации против по меньшей мере одного штамма CHIKV (значения EC_{50}<10 мкг/мл), причем восемь mAb продемонстрировали нейтрализацию в эффективном диапазоне (значения EC_{50} 10-99 нг/мл) и тринадцать mAb продемонстрировали нейтрализацию в сверхэффективном диапазоне (значения EC_{50}<10 нг/мл) (табл.5). Для целей сравнения авторы изобретения также протестировали ранее описанные mAb человека 5F10 и 8B10 против вирусов всех трех генотипов, и в каждом случае величины EC_{50} составляли >100 нг/мл (диапазон 161-1337). В большинстве случаев mAb выделенные авторами изобретения продемонстрировали относительно сходную нейтрализующую активность против вируса всех трех генотипов. Шесть mAb (2B4, 2H1, 4J21, 4N12, 5M16 и 9D14) ингибировали вирусы всех трех генотипов со сверхвысокой активностью (значения EC_{50}<10 нг/мл). Эти данные указывают на то, что у одного субъекта может сформироваться множество CHIKV-специфических антител, которые являются сверхэффективными и обладающими широкой нейтрализующей способностью.

Связывание с белком E2.

Белок E2 CHIKV является преобладающей мишенью гуморальных ответов мыши (Goh et al., 2013; Lum et al., 2013), не являющегося человеком примата (Kam et al., 2014) и человека (Fong et al., 2014; Kam et al., 2012a; Kam et al., 2012b; Selvarajah et al., 2013). Авторы изобретения протестировали mAb человека в отношении связывания с мономерной формой эктодомена белка E2, экспрессируемого в E. coli (Pal et al., 2013). Девять mAb прочно связывались с эктодоменом E2, шесть продемонстрировали умеренное связывание, одно связывалось слабо и 14 не связывались выше фонового уровня (табл. 5). Способность связывать очищенный белок E2 in vitro не коррелировала непосредственно с эффективностью нейтрализации (табл.5). Подгруппу из 17 mAb человека исследовали с использованием анализа посредством поверхностного плазмонного резонанса в отношении связывания с белком p62-E1, происходящим из клеток млекопитающих (Voss et al., 2010). Все mAb связывались в нМ-диапазоне с величинами K_D от 0,5 до 20 нМ. Отличия в кинетике связывания не коррелировали с антигенной специфичностью или функциональной активностью (табл.S1).

Исследования конкурентного связывания.

Для идентификации не перекрывающихся антигенных областей в рекомбинантном белке E2, распознаваемом различными нейтрализующими mAb, авторы изобретения использовали количественный анализ конкурентного связывания. Для сравнения они также оценивали четыре ранее описанных mAb мыши (CHK-84, CHK-88, CHK-141 и CHK-265) (Pal et al., 2013) и ранее описанное mAb человека 5F10 (Warter et al., 2011) (фиг. 5). Профиль конкуренции был комплексным, однако было очевидно три основных группы конкуренции, которые авторы настоящего изобретения обозначили как группа 1 (красная рамка), группа 2 (синие рамки) или группа 3 (зеленая рамка). Авторы изобретения также определили четвертую группу, содержащую одно mAb человека, 5F19 (оранжевая рамка). Эти конкурентные исследования указывают на то, что существует три основных антигенных области, распознаваемых CHIKV-специфическими антителами.

Картирование эпитопов с использованием аланин-сканирующего мутагенеза.

Авторы изобретения использовали библиотеку аланин-сканирующего мутагенеза в сочетании с клеточной экспрессией и проточной цитометрией для идентификации аминокислот в белках E2 и E1 штамма CHIKV S27 (генотип ECSA), требуемых для связывания антител (Fong et al., 2014) (фиг. 6A-F). Остатки, требуемые для связывания антитела с гликопротеинами CHIKV для подгруппы из 20 mAb человека, приведены в табл.6. Мутации, влияющие на связывание этих 20 mAb, указаны в выравнивании полноразмерных последовательностей E2 штамма S27 и штаммов, соответствующих всем генотипам CHIKV, которые использовали в этом исследовании (фиг. 1A). Аминокислоты в E2, которые влияют на

связывание, расположены в основном в открытых для растворителя областях доменов A и B и дугах 1 и 2 β-ленточного соединительного элемениа, который связывает домены A и B (Voss et al., 2010) (фиг. 1A). Сравнение антигенных участков, идентифицированных посредством экспериментов по утрате связывания с использованием аланин-сканирующего мутагенеза с конкурентным анализом связывания (фиг. 5), продемонстрировало, что группы конкуренции 1 и 2 главным образом соответствовали участкам в домене домен A и дугах, в то время группа 3 соответствовала областям в домене B.

Структурный анализ антигенных областей.

С большим и разнообразным количеством поверхностных остатков в доменах A и B и дугах контактирует по меньшей мере одно из mAb (фиг. 1B-C). Две основных антигенных области в E2 обуславливают связывание множества mAb. Первая область расположена в домене A между аминокислотами 58 и 80 и содержит предполагаемый связывающий рецептор домен (RBD) (Sun et al., 2014; Voss et al., 2010). Вторая область расположена в домене B между аминокислотами 190 и 215. Обе области последовательности выступают в направлении от оболочки вируса и расположены вблизи вершины тримера E2 (фиг. 6A-F и 7).

Механизм нейтрализации.

Авторы изобретения провели анализы нейтрализации до и после прикрепления с использованием mAb, демонстрирующих диапазон ингибиторной активности. Как и ожидалось, все пять исследованных mAb эффективно нейтрализовывали инфекцию, когда их предварительно инкубировали с VRP (фиг. 2A). Однако mAb 4B8 не нейтрализовывало VRP полностью даже при высоких концентрациях, что указывает на присутствие части вирионов CHIKV, резистентных к этому mAb; этот паттерн также наблюдали в анализах с использованием жизнеспособных штаммов CHIKV, соответствующих трем различным генотипам CHIKV (данные не представлены). Напротив, mAb 3E23, 4J21, 5M16 и 9D14 полностью нейтрализовывали инфекцию при введении до прикрепления. Все пять mAb человека также нейтрализовывали инфекцию CHIKV при добавлении после прикрепления, однако авторы изобретения наблюдали три различных паттерна активности (фиг. 2A). MAb 4B8 было неспособно осуществить нейтрализацию при добавлении после прикрепления и доля резистентных вирионов была большей по сравнению с долей, наблюдаемой после нейтрализации до прикрепления. MAb 9D14 нейтрализовывало VRP со сравнимой эффективностью при добавлении как до, так и после прикрепления. MAb 3E23, 4J21 и 5M16 продемонстрировали полную нейтрализацию VRP, однако эффективность нейтрализации после прикрепления была более низкой, чем до прикрепления; mAb 2H1 и 4N12 также эффективно нейтрализовывали VRP при добавлении до или после прикрепления (фиг. 8).

Тестирование в анализе слияния снаружи (FFWO) пяти сверхэффективно нейтрализующих mAb (3E23, 4B8, 4J21, 5M16 или 9D14) показало, что все они ингибировали слияние (Edwards and Brown, 1986). Как и ожидалось, когда вирионы, предварительно обработанные mAb, инкубировали непрерывно со средой, забуференной при нейтральном значении pH, наблюдали от незначительной инфекции до ее отсутствия (фиг. 2B). В отсутствие обработки антителом короткая импульсная обработка кислотной pH-забуференной средой приводила к инфицированию клеток, что указывало на слияние между вирусной оболочкой и плазматической мембраной. Примечательно, что все пять mAb человека ингибировали слияние плазматических мембран и инфицирование, причем mAb 9D14 продемонстрировало наибольшую эффективность в этом анализе. Эти исследования указывают на то, что сверхэффективно нейтрализующие mAb блокируют слияние CHIKV.

Профилактика посредством MAb In vivo. Авторы изобретения протестировали подгруппу mAb, демонстрирующих разнообразные уровни активности нейтрализации (табл. 7) в модели летальной инфекции у мышей с высоким иммунодефицитом $Ifnar^{-/-}$ в возрасте 6 недель. Мышам предварительно вводили однократную дозу 50 мкг (~3 мг/кг) mAb человека против CHIKV или изотипического контрольного mAb, специфичного к вирусу лихорадки западного Нила (WNV hE16), за 24 ч до подкожной инъекции летальной дозы CHIKV-LR2006. Все мыши, которым вводили изотипическое контрольное mAb, погибли от инфекции к 4 суткам после инокуляции. Предварительная обработка посредством mAb 4B8, 4J21 или 5M16 полностью защищала мышей $Ifnar^{-/-}$, в то время как обработка посредством mAb 3E23 или 9D14 частично защищала инфицированных животных с показателями выживаемости 67% (фиг. 3A). Неожиданно mAb 2D12, которое имело слабую нейтрализацию in vitro, защитило 83% животных.

Терапия MAb после воздействия in vivo.

Мышам $Ifnar^{-/-}$инокулировали летальную дозу CHIKV-LR2006, а затем вводили однократную дозу 50 мкг (~3 мг/кг) репрезентативных mAb через 24 ч после инокуляции вируса. Терапевтическое введение этих mAb обеспечило полную защиту, в то время как изотипическое контрольное mAb не обеспечило защиту (фиг. 3B). Для дальнейшего определения терапевтического окна эффективности мышам $Ifnar^{-/-}$ вводили однократную дозу 250 мкг (~14 мг/кг) репрезентативных mAb через 48 часов после заражения CHIKV-LR2006. Введение 5M16, 4J21 и 4B8 защитило 85, 50 и 12,5% животных, соответственно (фиг. 3C). Примечательно, что монотерапия 4N12 в последующий момент времени 60 ч защитила 100% животных при использовании в дозе 500 мкг (~28 мг/кг) (фиг. 3D). Эти данные показывают, что mAb человека могут защищать от индуцируемой CHIKV гибели даже со значительными интервалами после развития инфекции.

Аналогично проводили исследования на мышах WT для оценки эффектов mAb человека на острый

и хронический артрит CHIKV. Mab вводили на 1 или 3 сутки после инфекции и вирусную нагрузку или РНК анализировали на D3, 5 или 28 после инфекции. В зависимости от исследуемой ткани и времени как 1H12, так 4J14 обеспечили наиболее значительную вирологическую защиту. 4N12 также обеспечило значительную защиту в этих анализах.

Комбинированная терапия mAb in vivo. Учитывая возможность селекции резистентности in vivo у животных, которым вводят одно mAb против CHIKV (Pal et al., 2013), авторы изобретения исследовали, может ли комбинация двух mAb человека против CHIKV защитить от летального заражения. Они выбрали пары нейтрализующих mAb на основе эффективности индивидуальных mAb in vitro. Мышам $Ifnar^{-/-}$ вводили одну дозу комбинации (250 мкг каждого, всего ~28 мг/кг) наиболее эффективных mAb через 60 ч после инокуляции. Хотя некоторые комбинации mAb ([4J21+2H1] и [4J21+5M16]) обеспечили небольшую защиту или не обеспечили ее, другие ([4J21+4N12]) привели к показателю выживаемости 63% в этот очень поздний момент времени (фиг. 3D). Таким образом, комбинированная терапия mAb защищала от летальной инфекции CHIKV у мышей с высоким иммунодефицитом даже при введении в пределах от 24 до 36 ч до момента, когда эти животные погибают. В этих условиях 4N12 действовало хуже в комбинации с 4J21, чем в качестве монотерапии, хотя дозирование 4N12 в экспериментах по монотерапии (500 мкг) в два раза превышало дозирование компонента 4N12 в комбинированной терапии (250 мкг).

Таблица S1. Кинетика связывания антител человека против CHIKV с антигеном, измеренная посредством SPR.

Величины ka, kd, KD представляют собой средние значения+стандартное отклонение.

KD=kd/ka: $t_{1/2}$=(ln(2)/kd)/60

MAb против CHKV	Лиганд	ka (106M-1s-1)	kd (loVi)	KD(нМ)	t1/2(мин)
5M16	P62-E1	1,09±0,02	1,13±0,02	1,03±0,01	102±2
5M16Fab	VLP	1,19±0,01	0,84±0,13	7,07±1,06	137±21
4J21	P62-E1	1,19±0,02	0,62±0,04	0,54±0,31	186±11
4J21Fab	VLP	1,58±0,03	14,2±0,29	9,00±0,03	8±0,2
3E23	P62-E1	3,18±2,43	2,67±0,87	6,11±1,41	43±19
3E23Fab	VLP	0,203±0,03	3,93±0,40	19,6±3,16	29±3
4B8	P62-E1	2,98±2,98	5,06±1,10	5,57±1,10	23±5
4B8Fab	VLP	0,60±0,04	3,33±0,30	5,60±0,46	35±3
5N23	P62-E1	2,98±0,75	2,40±0,66	0,87±0,37	48±17
1L1	P62-E1	0,88±0,44	2,73±0,36	3,79±2,10	42±6

2C2	p62-E1	1,54±0,65	6,08±1,45	4,59±2,32	19±6
2D12	p62-E1	17,5±1,64	5,41±4,97	0,49±0,08	13±4
4N12	P62-E1	1,24±0,02	1,18±0,01	0,95±0,02	98±1
5014	p62-E1	0,79±0,02	9,11±0,19	1,15±0,01	13±0,3
SD14	p62-E1	2,70±0,90	2,82±0,14	1,13±0,40	41±2
8G18	p62-E1	3,90±0,21	1,88±0,11	0,48±0,02	62±3
4J14	p62-E1	1,61±0,47	15,3±2,52	9,94±2,64	8±1
5F	P62-E1	2,61±0,04	50,9±0,75	19,5±0,2	2±0,03
3A2	p62-E1	2,12±0,02	10,1±0,12	4,78±0,08	11±0,1
1M9	p62-E1	1,86±0,99	3,98±0,26	2,48±0,99	29±2
3B4	p62-E1	2,91±0,09	1,56±0,11	0,54±0,02	74±5
8B	p62-E1	0,99±0,03	2,74±0,10	2,77±0,18	42±2
8E22	P62-E1	0,48±0,02	2,0±0,13	4,22±0,42	58±4

Пример 3 - обсуждение.

Авторы изобретения сообщили о выделении разнообразной панели встречающихся в природе mAb человека от одного субъекта, большинство из которых распознают белок E2 CHIKV и демонстрируют выраженную активность нейтрализации in vitro и терапевтическую эффективность in vivo. Как класс большинство ингибиторных антител также демонстрировали широкую активность, нейтрализующую вирусы всех трех генотипов CHIKV, включая штамм, в настоящее время циркулирующий в Карибском бассейне. Большинство mAb человека, специфичных к CHIKV, выделенных в этом исследовании, нейтрализовывали вирус в концентрациях менее 100 нг/мл, и многие из них продемонстрировали ингибиторную активность при менее чем 10 нг/мл. Эта активность является более высокой, чем наблюдалось авторами изобретения в предшествующих исследованиях mAb человека против других патогенных вирусов человека, включая вирусы гриппа H1, H2, H3 или H5 (Hong et al., 2013; Krause et al., 2012; Krause et al., 2011a; Krause et al., 2011b; Krause et al., 2010; Thornburg et al., 2013; Yu et al., 2008), вирусы денге (Messer et al., 2014; Smith et al., 2013a; Smith et al., 2014; Smith et al., 2013b; Smith et al., 2012) и другие. Эффективность многих mAb человека против CHIKV является сравнимой или превышает эффективность лучших в своем классе нейтрализующих mAb мыши против CHIKV (Fong et al., 2014; Fric et al., 2013; Pal et al., 2013; Warter et al., 2011), которые были получены после неоднократной вспомогательной иммунизации и созревания аффинности. Большинство других нейтрализующих mAb человека против CHIKV являются существенно менее эффективными (Fong et al., 2014; Selvarajah et al., 2013; Warter et al., 2011). Одно ранее описанное специфичное к CHIKV mAb человека (IM-CKV0 63) демонстрирует активность, сравнимую с активностью сверхэффективных нейтрализующих mAb, описанных в настоящем описании (Fong et al., 2014).

Авторы изобретения выявили многообразие паттернов распознавания эпитопа в E2 различными протестированными нейтрализующими mAb против CHIKV. Точное картирование эпитопа посредством замещенных аланином гликопротеинов CHIKV продемонстрировало, что распознавание этих структурных областей в E2 ассоциировано с опосредуемой mAb нейтрализацией: домен A, который содержит предполагаемый RBD (Sun et al., 2013; Voss et al., 2010), домен B, который контактирует и экранирует петлю слияния в El (Voss et al., 2010), и дуги 1 и 2 β-ленточного соединительного элемента, который содержит чувствительную к кислотам область и связывает домены A и B (Voss et al., 2010). Среди антител, картированных на эпитопах E2, основная часть (антитела в группах конкуренции 1 и 2) предпочтительно распознавала участки в домене A и дуги 1 и 2, в то время как меньшая группа (в группе конкуренции 3) распознавала участки в домене B. Эти данные указывают на то, что экспонированные на поверхности области в домене A и дуги являются преобладающими антигенными участками, которые индуцируют ответы нейтрализующих антител человека. Авторы изобретения сделали заключение, что высококонсервативная область в домене A и дуге 2 может индуцировать широко защищающий иммунный ответ и служить привлекательным кандидатом для сфокусированной на эпитопе разработки вакцины.

Примечательно, что практически четверть экспонированных на поверхности остатков в ключевых доменах E2, как оказалось, связывается одним или несколькими mAb от одного субъекта. Существование функционально разнообразных способов связывания на основных антигенных центрах предполагается вследствие двух наблюдений: (a) некоторые mAb связывались со сходными эпитопами, но демонстриро-

вали ингибиторную активность, которая варьировалась на несколько порядков величины, и (b) корреляция между нейтрализующей способностью и аффинностью связывания с белком E2 была малой. Семь из наиболее эффективно нейтрализующих mAb человека (2H1, 3E23, 4B8, 4J21, 4N12, 5M16 и 9D14) ингибировали инфекцию CHIKV на стадии после прикрепления, вероятно, посредством предотвращения pH-зависимых структурных изменений, которые препятствуют проникновению нуклеокапсида в цитоплазму (Kielian et al., 2010).

Поскольку терапевтическая эффективность у мышей по-видимому прогнозирует исходы лечения при экспериментально индуцируемой инфекции и артрите у не являющихся человеком приматов (Pal et al., 2013; Pal et al., 2014), данные, представленные в настоящем описании, указывают на то, что профилактика людей посредством специфичных к CHIKV mAb человека может предотвратить инфекцию. Учитывая опасения, касающиеся селекции резистентных вариантов при монотерапии (Pal et al., 2013), может быть желательной комбинированная терапия с использованием сверхэффективных нейтрализующих антител, которые нацелены на различные области E2. Терапия может быть нацелена на популяции пациентов, имеющих значительно увеличенный риск тяжелого заболевания, в ходе вспышек, включая пациентов с имеющимися серьезными медицинскими состояниями (например, беременные женщины на поздних сроках, индивидуумы с иммунодефицитом и пожилые индивидуумы). Планируется дальнейшее клиническое тестирование для определения того, могут ли нейтрализующие mAb человека предупреждать или смягчать развившееся заболевание суставов у человека.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности для вариабельных областей антител

Клон	Последовательность вариабельной области	SEQ ID NO:
1H12 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCTGGTTACAGCTTTACCAGCTACGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCACTTACAAAGGTTACACACAGTATGCACAGAACTTCCAGGGCAGAGTCACCATCACCACAGACACACCCGCGACTACAGTCTATATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGCGCGAGAGTTCTTTCCGAGACTGGTTATTTCTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	2
1H12 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGTACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGATTATAATGTACACTGGTACCAGCTGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACACCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAGTGCTTCGGTATTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTAG	3
2B4 тяжелая	caggtgcagctggtgcaatctgggtctgagttgaagaagcctgggGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAGTTTCACTAGCTATTCTATCAACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGGGATGGATCGACACCAACACTGGGAACCCAACCTATGCCCAGGACTTCGCAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCACCACGGCATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGGGGACACTGCCGTTTATTACTGTGCAACATATTATGTTGACCTTTGGGGGAGTTATCGCCAAGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAC	4
2B4 легкая	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagaggtcaccatCTCTTGTTCTGGAGGGAGCTCCAACATCGGGAGTAATCCTGTAAATTGGTACCAGATGGTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCCTCTATACTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAATGGACTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTGAGTGGCCGTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCCTA	5
2H1 тяжел	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAGGGTCTCCTGCAAGGCGTCTGGTTACACCTTTACCAGTTATGGTA	6

ая	TCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG ATCAGCACTTACAATGGTGACACAAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAG AGTCACCTTGACAACAGAGACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGA GGCGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTACTACTGTGCGAGAGATTTT GAATTTCCCGGAGATTGTAGTGGTGGCAGCTGCTACTCCAGGTTCATCTA CCAGCACAACGACATGGACGTCTGGGGCCACGGGACCCTGGTCACCGTCT CCTCAGCAAGC	
2H1 легка я	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAA GGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATCATTATG TATCCTGGTACCAGCACCTCCCGGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTAT GACAATTATAAGCGACCCTCAGTGATTCCTGACCGATTCTCTGCCTCCAA GTCTGGCGCGTCAGCCACCCTGGGCATCATCGGACTCCAGACTGGGGACG AGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGAGTGCTGTGGTA TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	7
3E23 тяжел ая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACAC CCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCAAGTGACGCCCTCCGCAGCAGGAGTT ATTACTGGGGCTGGGTCCGCCAGCCCCCCGGGAAGGGATTGGAGTGGATT GGGACTGTCTCTTATAGTGGGGGCACCTACTACAACCCGTCCCTCCAGAG TCGAGTCACCGTGTCGGTGGACACGTCCAAGAACCACTTCTCCCTGAGGT TGAACTCTGTGACCGCCGCAGACGCGGCTGTTTATTACTGTGCGAGATCT TATTTCTATGATGGCAGTGGTTACTACTACCTGAGCTACTTTGACTCCTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	8
3E23 легка я	CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGAC AGTCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCACTGGAGCAGTCACCAGTGGTCACT ATCCAAACTGGTTCCAGCAGAAACCTGGACAACCACCCAGGGCCCTGATT TATAGCACAGACAACAAGCACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTC CCTCCTAGGGGTCAAGGCTGCCCTGACACTGTCAGATGTACAGCCTGAGG ACGAGGCTGACTATTACTGCCTGCTCCATTTTGGTGGTGTCGTGGTCTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	9
3N23 тяжел ая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGTGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCCA TGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCAGTT ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTGAC	10

	TACGTTCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
3N23 легкая	GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCAGTTGCCGGGCCAGTCAGAGCATTCCCAGCTATTTAA ATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCT ACATCCACTTTGGAAGCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAATACGGGGATATTCACTTTCGGC CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA	11
4J14 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTC GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACTTCCAGCACTTATGCTA TCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGC AGCATCCCTGTCTTTGCTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAG ACTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGTTTACATGGAACTGA GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTTTATTTCTGTGCGAGCCCCTAT TGTAGTAGTATGAACTGCTATACGACCTTTTACTACTTTGACTTCTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	12
4J14 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTTTGGGTTTCCTGGACAGTC GATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACTTTGGTACTTATAACT ATGTCTCTTGGTACCAGCAACACCCAGGCCAAGCCCCCAAACTCATGATT TTTGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTC CAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGG ACGAGGCTTCTTATTACTGCAGCTCCTATACAAGCGGCAGCACTCTCTAC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG	13
4J21 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTC AGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAGTTTCACTAGCTATTCTA TCAACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGGGATGG ATCGACACCAACACTGGGAACCCAACCTATGCCCAGGACTTCGCAGGACG GTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCACCACGGCATATCTGCAGATCA GCAGCCTAAAGGCTGGGGACACTGCCGTTTATTACTGTGCAACATATTAT GTTGACCTTTGGGGGAGTTATCGCCAAGACTACTACGGTATGGACGTCTG GGGCCACGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	14
4J21 легкая	CAGTCTGTGGTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCTGGGACCCCCGGGCAGGG GGTCACCATCTCTTGTTCTGGAGGGAGCTCCAACATCGGGAGTAATCCTG TAAATTGGTACCAGATGGTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCCTCTAT ACTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAA	15

	GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAATGGACTCCAGTCTGAGGATG AGGCTGATTATTACTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTGAGTGGCCGTTGG GTGTTCggcggagggaccaagctgaccgtccta	
4N12 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTC AGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGATACATCCTCAGTAAATTATCCG TGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGACTTGAATGGATGGGAGGT TCTGAACGTGAAGATGGCGAAACAGTCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAG AATCAGCTTGACCGAGGACACATCTATAGAGACAGCCTACATGGAGCTGA GCAGCCTGAGTTCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCAACAGGAGGC TTCTGGAGTATGATTGGGGGAAATGGAGTGGACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA	16
4N12 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTCCATCGTCCCTGCCTGCATCTGTAGGAGA CAGGGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGAAATAATTTAG GCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCGCCTGATCTATGGA ACCTCCAATTTGCAGAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATC TGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCTCCCACGTTCGGCCGC GGGACCAAGGTGGAAATCAAA	17
5M16 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTC AGTGAGAGTTTCCTGCAAGGCATCTGGGTACACCTTCACCAGTTACTTTA TGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGCGATA ACTTATCCTGGTGGTGGTAGCCCATCCTACGCACCGCAGTTCCAGGGCAG ACTCACCATGACCGACGACACGTCCGCGACCACAGTCTACATGGACCTGA GTGACCTGACTTCTAAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGTGCC CACCGTTCCATTGGGACGACCCCCCTTGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCT GGTCACCGTCTCCTCAGCAAGCTTCAAGGG	18
5O14 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGACGCGTGGTCCAGGCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTATGTATGGCG TCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATGGAATGATGGATCTAAAGAATACTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACGTTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGTCGACGACACGGCAGTGTATTTTTGTGCGAGAGATGGA ATTCCTGACCCTGAACGCGGTGACTACGGGGGCTTGGACTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	19
5O14	CAGACTGTGGTGACTCAGTTTCCATCCTCCCCGTTTGCATCTGTAGGAGA	20

легка я	CGGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGGCAGAGCATTAGCAGTTATGTTA ATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATTTACGCT ACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATA TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACATACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTTTCCTCGAACGTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC	
8G18 тяжел ая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTCAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTC GGTGAAGGTCTCCTGCAAGCCCTCTGGAGGCACCTTCAACAACAATGGGA TCAGTTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGC ATCGTCCCGAACTTTGGAACCCCAACCTATGGACAAGACTTCCAGGGCAG AGTCACGATCACCGCGGACGAATCTACGAGCACAGTCTTCTTGGAGCTGA CCAGACTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTTCTGTGCGCGAGGTCGC ACGGCGGTGACTCCGATGCAATTGGGTTTACAGTTCTACTTTGACTTCTG GGGCCGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	21
8G18 легка я	cagactgtggtgactCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGAC AGTCACTCTCACCTGTTCTGCCAACAGTGGAGCAGTCACCAGTGATTACT ATCCAAACTGGTTCCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCCAGGGCACTGATT TATAGTGCAAGCAACAAATTCTCCTGGACGCCTGCCCGGTTCTCAGGCTC CCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGCGCAGCCTGAGG ACGAGGCTGAGTATTACTGCCTGGTCTACTCTGGTGATGGTGTGGTTTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC	22
1I9 тяжел ая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCCGGGGCCTC AGTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGATATACGTTCACCGACAACTCTG TACACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGTTTGAGTGGATGGGACGG ATCAACCCTAACACTGGTGTCTCAACTTCTGCCCAGAAGTTTCAGGGCAG GGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAACCTACATGGAGCTGA GCAGTTTGAGATCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGAGGAG AACGATAGTAGTGGGTATTACCTTTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT CTCCTCA	23
1I9 легка я	CAGATTGTGGTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTTTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCACCTATTTAA ATTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT GCATCCAGTTTGGAGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCGGTGGCAGTAGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGGACCCCGTGGACGTTCGGCCAA	24

	GGGACCAAGGTGGACATCAAA	
1L1 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGTATTAGTGGAGTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATTTATTGGGATGATGATAAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCGAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACACAGTATGACTAAAGGCGGGGCTATCTATGGTCAGGCCTACTTTGAATACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC	25
1L1 легкая	CCATCTCCTGCACTGGAACCAGACAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATCATTTATGATGTCACTGATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGCCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACTCTGGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	26
1M9 тяжелая	caggtccagctggtacagtctggggctgaggtgaagaagcctggGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGATACACCCTCACTGAATTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGCCTAGAGTGGATGGGAGGTTTTGAGCCTGAAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTAGAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTACAACAGATCAGGTCTACTATCGTTCGGGGAGTTATTCTGGATATGTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC	27
1O5 тяжелая	caggtccagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctgggtCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGACGCACCTTCAGCAGCTATGTTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTCTGTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAATTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGGGGCGCCCAGCTATATTACAATGATGGTAGTGGTTACATTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTC	28
1O6 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCAGCTTTATTAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAGGATGG	29

	ATCGTCGTTGCCAGTGCTAACACAAACTACGCACAGAAGTTCCGGGAAAG AGTCACCATTACTAGGGACATGTCCACAAACACAGCCTATATGGAACTGA CCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGGCAGAGCAC CGGTCCCCTTGTAGTGGTGGTGATAGCTGCTACAGTCTCTACTACGGTAT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
2A2 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCCGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTGTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACCGTTAGTAACTATGGCA TGAGCTGGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACT ATTAGTACTAGTAGTGGTAGAACATTCTACGCAGACTCCGTGGAGGGCCG GTTCACCATCTCCGGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGTCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCCCG TTCGGGGGCGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCA	30
2A2 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGCCATCTACTTAG CCTGGTATCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGAT GCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTG CAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTGGCAACTGGCAGTACACTTTTGGCCAG GGGACCAAACTGGAGATCAAA	31
2C2 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGCAGGTC CCTGACACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGTTTATGCCA TGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCTTGGAGTGGGTCGCAGGT ATTAGTTGGAATAGTGGTAGCGTAGGCTATGCGGACTCTATGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATTA ACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAGCATTC TGGTTCGGGGAGTTATCGGGTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA	32
2C2 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTTTCCTGGACAGTC AGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTAGTTATAACT ATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATAATT TATGCGGTCACTAGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAGCGCTTCTCTGGCTC CAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGG ATGAGGCTGATTATTACTGCACCTCATATGCAGGCAACAACAAGGATGTC	33

	TTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA	
2D12 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAGCTTTAACATCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAACTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAACTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACCACTTTGGGGGGAATTTTACTATGATATCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	34
2D12 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCGGGTACTCAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAAAAGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCTGTTTGCTACCTCACCTCCGCCCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA	35
3A2 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAATTATGTTATGGAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGCAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATCAGAGTGGGAGTCTTCCTATGGTTCGGGGAATTATTATACAGATTACTTCTACTACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCCAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	36
3A2 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAATCAGAGCCTCCTGCGTGGTATTAGATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGCCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTACCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA	37
3B4 тяжел	CAGGTGCAGCTGGAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGTTCCTTCTCTGGGTTCTCACTCACCACTACTGGAG	38

ая	TGACTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCTTGGAGTGGCTT GCACTCATTTATTGGGATGATGATAAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAG CAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACCA TGACCAACATGGACCCTGTGGACACTGCCACATATTACTGTGCGCACTCC ACCGGCTACTATGATAGTAGTGGCTATCGAGGGGCCCTTGATGCTTTTGC TGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
3B4 легка я	CAGATTGTGGTGACTCAGTTTCCAGACTCCCCGGCTGTGTCTTTGGGCGA GAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACCACTCCA ACAATAAAAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCT AACCTGCTCATTTACTGGGCATCTGCCCGACAATCCGGGGTCCCTGACCG ATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT CCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	39
3E23 тяжел ая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACAC CCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCAAGTGACGCCCTCCGCAGCAGGAGTT ATTACTGGGGCTGGGTCCGCCAGCCCCCCGGGAAGGGATTGGAGTGGATT GGGACTGTCTCTTATAGTGGGGGCACCTACTACAACCCGTCCCTCCAGAG TCGAGTCACCGTGTCGGTGGACACGTCCAAGAACCACTTCTCCCTGAGGT TGAACTCTGTGACCGCCGCAGACGCGGCTGTTTATTACTGTGCGAGATCT TATTTCTATGATGGCAGTGGTTACTACTACCTGAGCTACTTTGACTCCTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	40
3E23 легка я	CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGAC AGTCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCACTGGAGCAGTCACCAGTGGTCACT ATCCAAACTGGTTCCAGCAGAAACCTGGACAACCACCCAGGGCCCTGATT TATAGCACAGACAACAAGCACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTC CCTCCTAGGGGTCAAGGCTGCCCTGACACTGTCAGATGTACAGCCTGAGG ACGAGGCTGACTATTACTGCCTGCTCCATTTTGGTGGTGTCGTGGTCTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	41
3H5 тяжел ая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTTCAACGTCTGGATTCACCTTCAGGATGTATGGCA TGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTT ATTTTTAACGATGGAGTTAAGAAATATTATGGAGACGCCGTGAAGGGCCG ATTCACCGTCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGGAAATGA AAAGCCTGAGAGTCGACGACACGGCTGCCTACTACTGTGCGAGAGACGGG ATTCCTGACCCCGAACGCGGTGACTACGGGGGCTTGGACTACTGGGGCCA	42

	GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
3H5 легкая	CAGACTGTGGTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA CACAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTACCAGTTATTTAA ACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCAAAGCTCCTCATCTATGCT ACATCCAGTTTGCAAAGTGGGCTCCCCTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGCTA TGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGTGGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACATACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTTTCCTCGAACGTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATGGATA	43
3I21 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCATCTTTGATGATTATGCCA TGTACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGT ATTAGTTGGAATAGTGGAAACATAGCCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATTTGGAAATGA ACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGTAAAAGATCTT TACGGGTACGATATTTTGACTGGTAATGGATATGATTACTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	44
3I21 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTTCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCAAAGTAATG GATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG CTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCT CCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAA	45
3K11 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTC GGTGAAGGTCCCCTGCAAGGCTTCTGGAGACACCCTCAGTTACTACGGAA TCACTTGGGTGCGACGGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACAG ATCATCCCTTTCTTTGCTACAACAATCTCCGCACAGAAGTTCCAGGGCAG ACTCACCATGACCGCGGAAGAATCCACGAGCACTGGCTACATGGAGCGCA CATTTTACATGGACTTGAGTAGCCTTAGACCTGAGGACACGGCCGTATAC TACTGTGCGGGGGGCTACTATGGTTCGGGGAGTTCGGGCGACTACGGTTT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	46
3K11 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAG GGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATG ATGTAAACTGGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATC TATGGTAACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTC	47

	CAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGG ATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAGTGGTTCG GGAGTCTTCGGAACTGGGACCGAGGTCACCGTCCTA	
4B8 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC CCTGTCCCTGACGTGCGCTGTTTCTGGTGACTCCATCGGCAGTAGAAGTT TCTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGAAGTATCTATTATAATGGGACCACCTACTACAAGCCGTCCCTCAAGAG TCGAGTCACCATATCCCTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAGGC TGAGCTCTCTGACCGCCACAGACACGGGTGTCTATTACTGTGCGCGGGCG CCAACCTACTGTAGTCCTTCCAGCTGCGCAGTTCACTGGTACTTCAATCT CTGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	48
4B10 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCCTC AGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACATATTTACCAAATATGGTA TCAGTTGGCTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGGATGG ATCAGCGCTTACAATGAAAACACAAACTATGCAGAGAAGTTCCAGGGCAG AGTCACCTTGACCACAGATGCATCCACGAGCACGGCCTACATGGAGCTGA GGAACCTGAGATCTGACGACACGGCCGTATACTTCTGTGCGAGAGAAGTC TGGTTCGCGGAGTATATTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCA	49
8E22 легкая	CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGAC AGTCACTCTCACCTGTTCTGCCAACAGTGGAGCAGTCACCAGTGATTACT ATCCAAACTGGTTCCAGCAGAAACCTGGACAAGCACCCAGGGCACTGATT TATAGTGCAAGCAACAAATTCTCCTGGACGCCTGCCCGGTTCTCAGGCTC CCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGCGCAGCCTGAGG ACGAGGCTGAGTATTACTGCCTGGTCTACTCTGGTGATGGTGTGGTTTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAA	50
9A11 легкая	CAGTCTGTGGTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTC GATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGCTTATAACT ATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCGTGATT TATGATGTCGCTAATCGGCCCTCAGGGATTTCTGACCGCTTCTCTGGCTC CAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGG ACGAGGCTGATTATTACTGCGGCTCATATACCAGCGACGTCTCGCCGGTT TTCAGCGGGGGGACCAAGCTGACCGTCCTCA	51
9D14 тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTC AGTGAAGCTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACAAGTCATCCTA TGAATTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG ATCAACACCAAGACTGGGAACCTAACTTATGCCCAGGGCTTCACAGGACG GTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGGACGGCGTATCTGCAGATCA GCGGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCATTTATTACTGTGCGAGAGATGAG TATAGTGGCTACGATTCGGTAGGGGTGTTCCGTGGTTCTTTTGACGACTT CTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	52

Таблица 2. Белковые последовательности для вариабельных областей антител

Клон	Вариабельная последовательность	SEQ ID NO:
1H12 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYKGYTQYAQNFQGRVTITTDTPATTVYMELRSLRSDDTAVYYCARVLSETGYFYYYYYGMDVWGQGTLVTVSS	53
1H12 легкая	QAVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGADYNVHWYQLLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSASVFGGGTKLTVL	54
2B4 тяжелая	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTSYSINWVRQAPGQGPEWMGWIDTNTGNPTYAQDFAGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAGDTAVYYCATYYVDLWGSYRQDYYGMDVWGH	55
2B4 легкая	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNPVNWYQMVPGTAPKLLLYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAINGLQSEDEADYYCAVWDDSLSGRWVFGGGTKVTVL	56
2H1 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYNGDTNYAQKFQGRVTLTTETSTSTAYMELRRLRSDDTAVYYCARDFEFPGDCSGGSCYSRFIYQHNDMDVWGHGTLVTVSSAS	57
2H1 легкая	QAVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNHYVSWYQHLPGTAPKLLIYDNYKRPSVIPDRFSASKSGASATLGIIGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL	58
3E23 тяжелая	QVQLVQSGPGLVKPSDTLSLTCSVSSDALRSRSYYWGWVRQPPGKGLEWIGTVSYSGGTYYNPSLQSRVTVSVDTSKNHFSLRLNSVTAADAAVYYCARSYFYDGSGYYYLSYFDSWGQGTLVTVSS	59
3E23 легкая	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGHYPNWFQQKPGQPPRALIYSTDNKHSWTPARFSGSLLGVKAALTLSDVQPEDEADYYCLLHFGGVVVFGGGTKLTVL	60

3N23 тяжелая	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFTFSNYAMHWVRQAPGKGLDWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAR GDYVLDYWGQGTLVTVSS	61
3N23 легкая	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQSIPSYLNWYQQKPGKAPKVLIY ATSTLEAGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYNTGIFT FGPGTKVDIK	62
4J14 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTSSTYAISWVRQAPGQGLEWMG GSIPVFATVNYAQKFQGRLTITADESTSTVYMELSSLRSEDTAVYFCAS PYCSSMNCYTTFYYFDFWGQGTLVTVSS	63
4J14 легкая	QAVVTQPASVFGFPGQSITISCTGTSSDFGTYNYVSWYQQHPGQAPKLM IFDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEASYYCSSYTSGST LYGGGTKLTVL	64
4J21 тяжелая	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTSYSINWVRQAPGQGPEWMG WIDTNTGNPTYAQDFAGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAGDTAVYYCAT YYVDLWGSYRQDYYGMDVWGHGTLVTVSS	65
4J21 легкая	QSVVTQPPSVSGTPGQGVTISCSGGSSNIGSNPVNWYQMVPGTAPKLLL YTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAINGLQSEDEADYYCAVWDDSLSG RWVFGGGTKLTVL	66
4N12 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYILSKLSVHWVRQAPGKGLEWMG GSEREDGETVYAQKFQGRISLTEDTSIETAYMELSSLSSEDTAVYYCAT GGFWSMIGGNGVDYWGQGTLVTVSS	67
4N12 легкая	QAVVTQSPSSLPASVGDRVTITCRASQDIRNNLGWYQQKPGKAPERLIY GTSNLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPPTF GRGTKVEIK	68
5M16 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTFTSYFMHWVRQAPGQGLEWMA ITYPGGGSPSYAPQFQGRLTMTDDTSATTVYMDLSDLTSKDTAVYYCAR GAHRSIGTTPLDSWGQGTLVTVSSASFK	69
5O14 тяжелая	QVQLVQSGGRVVQAGRSLRLSCAASGFTFSMYGVHWVRQAPGKGLEWVA VIWNDGSKEYYGDSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRVDDTAVYFCAR DGIPDPERGDYGGLDYWGQGTLVTVSS	70
5O14 легкая	QTVVTQFPSSPFASVGDGVTITCRARQSISSYVNWYQQKPGKAPKLLIY ATSSLQSGVPSRFSGSGYGTDFTLTISGLQPEDFATYYCQQSYSFPRTF GQGTKVEIK	71
8G18 тяжелая	QVQLVQSGAQVKKPGSSVKVSCKPSGGTFNNNGISWVRQAPGQGLEWMG GIVPNFGTPTYGQDFQGRVTITADESTSTVFLELTRLRSDDTAVYFCAR	72

	GRTAVTPMQLGLQFYFDFWGRGTLVTVSS	
8G18 легкая	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSANSGAVTSDYYPNWFQQKPGQAPRAL IYSASNKFSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCLVYSGDGV VFGGGTKLTV	73
1I9 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDNSVHWVRQAPGQGFEWMG RINPNTGVSTSAQKFQGRVTMTRDTSISTTYMELSSLRSDDTAVYYCAR EENDSSGYYLWGQGTLVTVSS	74
1I9 легкая	QIVVTQSPSSLFASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLESGVPSRFGGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTPWTF GQGTKVDIK	75
1L1 тяжелая	QVQLVQSGP.TLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSISGVGVGWIRQPPGKALE WLALIYWDDDKRYSPSLKSRLTITKDTSENQVVLTMTNMDPVDTATYYC AHSMTKGGAIYGQAYFEYWGQGTLV	76
1L1 легкая	PSPALEPDSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLIIYDVTDRPSGVSNRFSAS KSANTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSST	77
1M9 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMG GFEPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSRDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTT DQVYYRSGSYSGYVDYWGQGTLV	78
1O5 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGRTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMG GIIPLFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCAR GAQLYYNDGSGYIF DYWGQGALV	79
1O6 тяжелая	QVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFSFISSAVQWVRQARGQRLEWIG WIVVASANTNYAQKFRERVTITRDMSTNTAYMELTSLRSEDTAVYYCAA EHRSPCSGGDSCYSLYYGMDVWGQGTLVTVSS	80
2A2 тяжелая	QVQLVQSGGGLVPPGGSLRLSCTASGFTVSNYGMSWVRQTPGKGLEWVS TISTSSGRTFYADSVEGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAK GPFGGDFDYWGQGTLVTVSS	81
2A2 легкая	QAVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVAIYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRGNWQYTF GQGTKLEIK	82
2C2 тяжелая	QVQLVQSGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDVYAMHWVRQAPGKGLEWVA GISWNSGSVGYADSMKGRFTISRDNAKNSLYLQINSLRAEDTALYYCAK AFWFGELSGYGMDVWGQGTLVTVSS	83
2C2	QAVVTQPPS.ASGFPGQSVTISCTGTSSDVGSYNYVSWYQQHPGKAPKL	84

легкая	IIYAVTRRPSGVPERFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCTSYAGNN KDVFGTGTKVTVL	
2D12 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFNIYGISWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR PLWGEFYYDIWGQGTLVTVSS	85
2D12 легкая	QAVVTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSGYSAWYQQKPGQAPRLLI YGASKRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQLFATSPPP FGQGTRLEIK	86
3A2 тяжелая	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYVMEWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVK.GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RSEWESSYGSGNYYTDYFYYYAMDVWGPGTLVTVSS	87
3A2 легкая	QAVVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSNQSLLRGIRYNYLDWYLQKPGQSP QLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSATDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQ TPTTFGQGTRLEIK	88
3B4 тяжелая	QVQLEESGPTLVKPTQTLTLTCSFSGFSLTTTGVTVGWIRQPPGKALEW LALIYWDDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCA HSTGYYDSSGYRGALDAFAVWGQGTLVTVSS	89
3B4 легкая	QIVVTQFPDSPAVSLGERATINCKSSQSVLYHSNNKNYLAWYQQKPGQP PNLLIYWASARQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYY STPYTFGQGTKLEIK	90
3E23 тяжелая	QVQLVQSGPGLVKPSDTLSLTCSVSSDALRSRSYYWGWVRQPPGKGLEW IGTVSYSGGTYYNPSLQSRVTVSVDTSKNHFSLRLNSVTAADAAVYYCA RSYFYDGSGYYYLSYFDSWGQGTLVTVSS	91
3E23 легкая	QAVVTQEPS.LTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGHYPNWFQQKPGQPPRA LIYSTDNKHSWTPARFSGSLLGVKAALTLSDVQPEDEADYYCLLHFGGV VVFGGGTKLTVL	92
3H5 тяжелая	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCSTSGFTFRMYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIFNDGVKKYYGDAVKGRFTVSRDNSRNTLYLEMKSLRVDDTAAYYCAR DGIPDPERGDYGGLDYWGQGTLVTVSS	93
3H5 легкая	QTVVTQSPSSLSASVGDTVTITCRASQSITSYLNWYQQKPGKAPKLLIY ATSSLQSGLPSRFSGSGYGTEFTLTISGLQPEDFATYYCQQSYSFPRTF GQGTKVEMD	94
3I21 тяжелая	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCATSGFIFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVS GISWNSGNIAYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLEMNSLRAEDTALYYCVK DLYGYDILTGNGYDYWGQGTLVTVSS	95

3I21 легкая	QAVVTQSSLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLQSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIK	96
3K11 тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVPCKASGDTLSYYGITWVRRAPGQGLEWMGQIIPFFATTISAQKFQGRLTMTAEESTSTGYMERTFYMDLSSLRPEDTAVYYCAGGYYGSGSSGDYGLDVWGQGTLVTVSS	97
3K11 легкая	QAVVTQPPS.VSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGSGVFGTGTEVTVL	98
4B8 тяжелая	QVQLVQSGPGLVKPSETLSLTCAVSGDSIGSRSFYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYNGTTYYKPSLKSRVTISLDTSKNQFSLRLSSLTATDTGVYYCARAPTYCSPSSCAVHWYFNLWGRGTLVTVSS	99
4B10 тяжелая	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYIFTKYGISWLRQAPGQGLEWVGWISAYNENTNYAEKFQGRVTLTTDASTSTAYMELRNLRSDDTAVYFCAREVWFAEYIYWGQGTLVTVSS	100
9A11 легкая	QSVVTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLVIYDVANRPSGISDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGSYTSDVSPVFSGGTKLTVL	101
9D14 тяжелая	QVQLVQSGSELKKPGASVKLSCKASGYTFTSHPMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGNLTYAQGFTGRFVFSLDTSVRTAYLQISGLKAEDTAIYYCARDEYSGYDSVGVFRGSFDDFYGMDVWGQGTLVTVSS	102

Таблица 3. Последовательности CDR тяжелой цепи

Антитело	**CDRH1 (SEQ ID NO:)**	**CDRH2 (SEQID NO:)**	**CDRH3 (SEQ ID NO:)**
1H12	GYSFTSYG (103)	ISTYKGYT (104)	ARVLSETGYFYYYYYGMDV (105)
2B4	GYSFTSYS (106)	IDTNTGNP (107)	ATYYVDLWGSYRQDYYGMDV (108)
2H1	GYTFTSYG (109)	ISTYNGDT (110)	ARDFEFPGDCSGGSCYSRFIYQHNDMDV (111)
3E23	SDALRSRSYY (112)	VSYSGGT (113)	ARSYFYDGSGYYYLSYFDS (114)

3N23	GFTFSNYA (115)	IWYDGSNK (116)	ARGDYVLDY (117)
4J14	GGTSSTYA (118)	SIPVFATV (119)	ASPYCSSMNCYTTFYYFDF (120)
4J21	GYSFTSYS (121)	IDTNTGNP (122)	ATYYVDLWGSYRQDYYGMDV (123)
4N12	GYILSKLS (124)	SEREDGET (125)	ATGGFWSMIGGNGVDY (126)
5M16	GYTFTSYF (127)	TYPGGGSP (128)	ARGAHRSIGTTPLDS (129)
5O14	GFTFSMYG (130)	IWNDGSKE (131)	ARDGIPDPERGDYGGLDY (132)
8G18	GGTFNNNG (133)	IVPNFGTP (134)	ARGRTAVTPMQLGLQFYFDF (135)
1I9	GYTFTDNS (136)	INPNTGVS (137)	AREENDSSGYYL (138)
1L1	GFSLSISGVG (139)	IYWDDDK (140)	AHSMTKGGAIYGQAYFEY (141)
1M9	GYTLTELS (142)	FEPEDGET (143)	TTDQVYYRSGSYSGYVDY (144)
1O5	GRTFSSYV (145)	IIPLFGTA (146)	ARGAQLYYNDGSGYIFDY (147)
1O6	GFSFISSA (148)	IVVASANT (149)	AAEHRSPCSGGDSCYSLYYGMDV (150)
2A2	GFTVSNYG (151)	ISTSSGRT (152)	AKGPFGGDFDY (153)
2C2	GFTFDVYA (154)	ISWNSGSV (155)	AKAFWFGELSGYGMDV (156)
2D12	GYSFNIYG (157)	ISAYNGNT (158)	ARPLWGEFYYDI (159)
3A2	GFTFSNYV (160)	ISYDGSNK (161)	ARSEWESSYGSGNYYTDYFYYYAMDV (162)
3B4	GFSLTTTGVT (163)	IYWDDDK (164)	AHSTGYYDSSGYRGALDAFAV (165)

3E23	SDALRSRSYY (166)	VSYSGGT (167)	ARSYFYDGSGYYYLSYFDS (168)
3H5	GFTFRMYG (169)	IFNDGVKK (170)	ARDGIPDPERGDYGGLDY (171)
3I21	GFIFDDYA (172)	ISWNSGNI (173)	VKDLYGYDILTGNGYDY (174)
3K11	GDTLSYYG (175)	IIPFFATT (176)	TAVYYCAGGYYGSGSSGDYGLDV (177)
4B8	GDSIGSRSFY (178)	IYYNGTT (179)	ARAPTYCSPSSCAVHWYFNL (180)
4B10	GYIFTKYG (181)	ISAYNENT (182)	AREVWFAEYIY (183)
9D14	GYTFTSHP (184)	INTKTGNL (185)	ARDEYSGYDSVGVFRGSFDDFYGMDV (186)

Таблица 4. Последовательности CDR легкой цепи

Антитело	**CDRL1 (SEQ ID NO:)**	**CDRL2 (SEQID NO:)**	**CDRL3 (SEQ ID NO:)**
1H12	SSNIGADYN (187)	GNT (188)	QSYDSSLSASV (189)
2B4	SSNIGSNP (190)	TNN (191)	AVWDDSLSGRWV (192)
2H1	SSNIGNHY (193)	DNY (194)	GTWDSSLSAVV (195)
3E23	TGAVTSGHY (196)	STD (197)	LLHFGGVVV (198)
3N23	QSIPSY (199)	ATS (200)	QQSYNTGIFT (201)
4J14	SSDFGTYNY (202)	DVS (203)	SSYTSGSTLYGGG (204)
4J21	SSNIGSNP (205)	TNN (206)	AVWDDSLSGRWV (207)
4N12	QDIRNN (208)	GTS (209)	LQHNSYPPT (210)
5O14	QSISSY	ATS	QQSYSFPRT

	(211)	(212)	(213)
8G18	SGAVTSDYY (214)	SAS (215)	LVYSGDGVV (216)
1I9	QSISTY (217)	AAS (218)	QQSYRTPWT (219)
1L1	DSDVGGYNY (220)	DVT (221)	SSYTSSSTLV (222)
2A2	QSVAIY (223)	DAS (224)	QQRGNWQYT (225)
2C2	SSDVGSYNY (226)	AVT (227)	TSYAGNNKDV (228)
2D12	QSVSSGY (229)	GAS (230)	QLFATSPPP (231)
3A2	QSLLRGIRYNY (232)	LGS (233)	MQALQTPTT (234)
3B4	QSVLYHSNNKNY (235)	WAS (236)	QQYYSTPYT (237)
3E23	TGAVTSGHY (238)	STD (239)	LLHFGGVVV (240)
3H5	QSITSY (241)	ATS (242)	QQSYSFPRT (243)
3I21	QSLLQSNGYNY (244)	LGS (245)	MQALQTPPT (246)
3K11	SSNIGAGYD (247)	GNN (248)	QSYDSSLSGSGV (249)
9A11	SSDVGAYNY (250)	DVA (251)	GSYTSDVSPV (252)

Таблица 5. Характеристики специфичных к вирусу чикунгунья моноклональных антител человека

mAb[1]	Подкласс IgG[2]	Легкая цепь λ/κ[2]	Связывание в ELISA с эктодоменом E2 (10 мкг/мл)[3]	Нейтрализация VRP CHIKV (штамм SL15649)[4] EC_{50} в нг/мл[5] [95% доверительный интервал]
2H1	IgG2	λ	++	8 [6-10]
4N12	IgG2	κ	-	8 [7-10]
2B4	IgG1	λ	++	14 [11-17]
4J21	IgG1	λ	++	5 [4-6]
5M16	IgG1	κ	+++	5 [4-6]
9D14	IgG1	λ	+++	6 [5-7]
1H12	IgG1	λ	+++	17 [14-20]
8E22	IgG1	λ	++	17 [14-19]
8G18	IgG1	λ	++	17 [14-19]
10N24	IgG1	κ	-	21 [17-26]
8I4	IgG1	κ	+++	8 [5-14]
3N23	IgG1	κ	-	25 [21-30]
5O14	IgG1	κ	+++	38 [30-47]
4J14	IgG1	λ	++	23 [20-26]
3E23	IgG2	λ	-	11 [9-13]
1L1	IgG1	λ	+/-	18 [15-22]
3B4	IgG3	κ	-	>
4B8	IgG1	λ	+++	0,6 [0,4-0,8]
4G20	IgG1	λ	-	95 [60-160]
1O5	IgG1	λ	-	138 [110-170]
1O6	IgG3	λ	-	5,200 [4,100-6,600]
2L5	NT	NT	-	4,600 [2,400-9,500]
3A2	IgG1	κ	+++	1,300 [830-1,900]
5F19	IgG1	λ	+++	>
1M9	IgG1	κ	-	>
1I9	IgG1	κ	-	>
4B10	IgG1	κ	-	>
2C2	IgG1	λ	-	>

2D12	IgG1	κ	-	>
5N23	IgG1	λ	+++	>
CHK-152 мыши	IgG2c	κ	-	3 [2-4]

[1]Порядок антител отражает уровень степени и охвата эффективности антител в анализах нейтрализации против клинических изолятов CHIKV различных генотипов
[2]Изотип, подтип иммуноглобулина и использование легкой цепи определяли посредством ELISA. NT означает не исследовали вследствие плохого роста В-клеточной линии
[3](-) обозначает не поддающееся обнаружению связывание [OD<0,1]; (+/-) обозначает слабое связывание [OD 0,31-0,499]; (++) обозначает умеренное связывание [OD 0,5-0,99]; (+++) обозначает сильное связывание [OD>1,0].
[4]Показанные величины соответствуют объединенным данным двух или более независимых экспериментов концентрация (нг/мл), при которой 50% нейтрализовывалось (EC_{50}). (>) указывает на то, что величина EC_{50} превышает наиболее высокую исследованную концентрацию mAb (10 мкг/мл). N.D.=не проводили

Таблица 6. Основные антигенные участки специфичных к вирусу чикунгунья моноклональных антител человека

mAb[1]	Группа конкурентного связывания для очищенного белка E2[2]	Картирование посредством мутагенеза	
		Домен E2[3]	Остатки E2, для которых было отмечено сниженное связывание при замене на аланин
2H1	Низкое связывание	E2-DA	R80, T116
4N12	NT	Дуга	D250
2B4	Низкое связывание	Без снижения ##	-
4J21	Низкое	Без снижения	-

	связывание		
5M16	2	Дуга	G253
9D14	2	Без снижения	-
1H12	½	DA/B, Дуга	T58, D59, D60, R68, D71, I74, D77, T191, N193, K234
8E22	Низкое связывание	DA, Дуга	H62, W64, R68, H99, D117, I255
8G18	Низкое связывание	DA	H62, W64, D117
10N24	NT	DA,B	W64, D71, R80, T116, D117, I121, N187, I190
8I4	NSF Ab	DB, Дуга	M171, Q184, I190, N193, V197, R198, Y199, G209, L210, K215, K234, V242, I255
3N23	NT	DA, Дуга	D60, R68, G98, H170, M171, K233, K234
5O14	2	Без снижения	-
4J14	Низкое связывание	DA/B	D63, W64, T65, R80, I121, A162, N193
3E23	NT	DA	W64
1L1	Низкое связывание	Дуга	G253
3B4	NT	DB	V192, Q195
4B8	2	Без снижения	-
4G20	NT	DB	D174, R198, Y199, K215
1O5	NT	DA	W64, T65

1O6	2	DA	R80
2L5	NT	Без снижения	-
3A2	3	DB	I190, R198, Y199, G209, L210, T212
5F19	4	DA	H18
1M9	NT	DA, Дуга	R36, H62, R80, Q146, E165, E166, N231, D250, H256
1I9	NT	E2	Не определено
4B10	NT	Без снижения	-
2C2	NT	Без снижения	Не определено
2D12	NT	E2	Не определено
5N23	1	DA, Дуга	E24, D117, I121
CHK-152 мыши	NT	E2-DA, E2-DB	D59, W235, A11, M74, G194, N193, T212, H232[4]

[1]Порядок антител отражает уровень степени и охвата эффективности антител в анализах нейтрализации против клинических изолятов CHIKV различных генотипов

[2]Показанные величины соответствуют объединенным данным для двух независимых экспериментов. Низкое связывание указывает на неполное связывание mAb с E2 на биосенсоре для оценки конкуренции. NT указывает не тестировали, поскольку Ab не связывало эктодомен E2 в ELISA; NSF Ab указывает на недостаточное предоставление mAb

[3]Не реагирует указывает на то, что mAb не реагировало против белков оболочки дикого типа и не могло тестироваться в этой системе. Без снижения указывает на то, что mAb связывалось с белками E дикого типа, однако не отмечалось воспроизводимого снижения для какого-либо мутанта. DA указывает на домен A; DB указывает на домен B; Дуга указывает либо на дугу 1, либо на дугу 2, либо на обе из них

[4]Остатки, идентифицировали посредством контактов с mAb при предшествующем восстановлении крио-EM

Таблица 7. Эффективнось и охват нейтрализации in vitro моноклональных антител человека, специфичных к вирусу чикунгунья

mAb[1]	Нейтрализация CHKV указанного генотипа и штамма* EC_{50}, нг/мл[2] (95% доверительный интервал)			
	Западно-африканский генотип	Генотип ECSA	Азиатский генотип	
	Штамм NI 64 IbH 35	Штамм LR2006 OPY1 (LR)	Штамм RSUI	Карибский штамм 2014 99659
2H1	3,7 (3,3-4,3)	5,6 (4,9-6,3)	5,9 (5,3-6,7)	5,5 (4,7-6,5)
4N12	2,5 (2,0-3,1)	4,0 (3,3-5,0)	6,5 (5,7-7,3)	7,3 (5,9-9,2)
2B4	3,2 (2,8-3,7)	5,6 (4,6-6,7)	6,5 (5,6-7,7)	7,0 (6,0-8,2)
4J21	5,2 (4,3-6,4)	7,4 (6,6-8,3)	7,7 (7,0-8,6)	7,2 (5,3-9,8)
5M16	6. 0 (5,5-6,6)	5,9 (5,0-6,8)	8,4 (6,7-10,4)	11,7 (9,7-14,1)
9D14	2,1 (1,6-2,7)	2,9 (2,3-3,7)	6,3 (4,7-8,4)	86,0 (31,5-235)
1H12	3,0 (2,5-3,5)	7,5 (6,7-8,4)	11,7 (9,3-14,8)	11,6 (8,2-16,2)
8E22	8,2 (7,0-9,7)	7,2 (6,4-8,3)	42,5 (30,8-58,5)	138,9 (64,7-298)
8G18	4,7 (4,1-5,3)	7,3 (6,3-8,4)	34,9 (24,9-48,9)	52,4 (24,1-114)
10N24	7,9 (6,9-9,0)	9,5 (8,2-11,0)	15,9 (13,2-19,2)	23,6 (18,3-30,5)
8I4	6,9 (3,8-12,3)	6,2 (4,5-8,4)	153 (78-299)	>
3N23	6,0 (5,0-	10,1 (8,9-	14,1 (11,6-	8,7 (7,0-

	7,2)	11,5)	17,1)	10,9)
5O14	6,7 (5,5-8,3)	12,1 (10,9-13,5)	17,3 (14,2-21,1)	6,2 (5,3-7,2)
4J14	12,9 (11,2-15,0)	17,7 (16,1-19,4)	23,1 (20-27)	23,0 (18,5-28,4)
3E23	19,4 (15,2-25,0)	18,7 (16,3-21,5)	36,0 (30,3-42,9)	38,0 (30,3-47,5)
1L1	18,6 (15,5-22,4)	24,2 (21,3-27,5)	34,3 (29-40,7)	N.D.
3B4	18,7 (10,7-32,8)	29,6 (18,7-46,8)	271 (144-511)	N.D.
4B8	22,8 (12,4-41,8)	28,1 (19,8-39,9)	234 (142-386)	N.D.
4G20	22,3 (17,3-29,0)	34,9 (28,2-43,8)	131,4 (88,5-195)	N.D.
1O5	30,1 (22,6-35,3)	37,6 (32,6-43,4)	48,9 (37,8-63,2)	N.D.
1O6	61,7 (50,8-74,8)	57,5 (48,8-68,1)	N.D.	N.D.
2L5	1,076 (748-1,548)	2,361 (1,460-3,819)	5,632 (3,904-8,128)	N.D.
3A2	1,566 (1,111-2,207)	1,396 (952-2,046)	>	N.D.
5F19	>	9,064 (2,911-28,249)	>	N.D.
1M9	>	>	6,187 (2,795-13,709)	N.D.
1I9	>	>	>	N.D.
4B10	>	>	>	N.D.
2C2	>	>	>	N.D.
2D12	>	>	>	N.D.
5N23	>	>	>	N.D.
СНК-152 мыши				

[1]Порядок антител отражает уровень степени и охвата эффективности антител в анализах нейтрализации против клинических изолятов CHIKV различных генотипов

[2]Концентрация (нг/мл) при которой 50% вируса нейтрализовывалось (EC_{50}); (>) указывает на то, что величина EC_{50} превышает наиболее высокую исследованную концентрацию mAb (10 мкг/мл); N.D.=не проводилось

Все композиции и способы, описанные и заявленные в настоящем описании, можно получать и проводить без излишнего экспериментирования ввиду настоящего изобретения. В то время как композиции и способы по настоящему изобретению описаны с точки зрения предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области будет понятно, что можно вносить изменения в композиции и способы и в стадии или последовательность стадий способа, описанного в настоящем описании, без отклонения от идеи, сущности и объема изобретения. Более конкретно будет понятно, что определенные средства, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут заменять средства, описанные в настоящем описании, достигая таких же или сходных результатов. Все такие сходные замены и модификации, очевидные специалистам в данной области, считаются являющимися частью сущности, объема и идеи изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

VII. Ссылки.

Следующие ссылки прямо включены в настоящее описание в качестве ссылок в том объеме, в котором они обеспечивают иллюстративные детали методик или прочие детали, дополнительные к деталям, описанным в настоящем описании.

"Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Abbondanzo *et al.*, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990.

Allred *et al.*, *Arch. Surg.*, 125(1), 107-113, 1990.

Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.

Austin *et al.*, PLoS Pathog 8, e1002930, 2012.

Brehin, *et al.*, Virology 371:185-195, 2008.

Brown *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 12;130(1),:111-121, 1990.

Campbell, *In*: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.

Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.

CDC, Chikungunya in the Americas. (Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services). world-wide-web at cdc.gov/chikungunya/geo/americas.html, 2014.

CDC, Chikungunya virus (Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services). world-wide-web at cdc.gov/media/releases/2013/p1218-chikungunyas.html, 2013.

Christian *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 110:18662-18667, 2013.

Chu *et al.*, Deciphering the protective role of adaptive immunity to CHIKV/IRES a novel candidate vaccine against Chikungunya in the A129 mouse model. Vaccine 31:3353-3360, 2013.

Couderc *et al.*, J. Infect. Dis. 200, 516-523, 2009.

De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.

Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.

Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109,:215-237, 1999.

Edwards & Brown, J. Gen. Virol. 67 (Pt 2), 377-380, 1986.

Edwards *et al.*, J. Gen. Virol. 67 (Pt 2), 377-380, 1986.

Fong *et al.*, J. Virol. 88:14364-14379, 2014.

Fric *et al.*, J. Infect. Dis. 207:319-322, 2013.

Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Goh *et al.*, Clin. Immunol. 149:487-497, 2013.

Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.

Guo *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 3:99 ra85, 2001.

Hallengard, *et al.*, J. Virol. 88:13333-13343, 2014.

Hawman *et al.*, J. Virol. 87, 13878-13888, 2013.

Hong *et al.*, J. Virol. 87:12471-12480, 2013.

Kam *et al.*, EMBO Mol. Med. 4, 330-343, 2012b.

Kam *et al.*, J. Virol. 86, 13005-13015, 2012a.

Kam *et al.*, PLoS One 9, e95647, 2014.

Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.

Kielian *et al.*, Viruses 2:796-825, 2010.

King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.

Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.

Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.

Krause *et al.*, J. Immunol. 187:3704-3711, 2011b.

Krause *et al.*, J. Virol. 84:3127-3130, 2010.

Krause *et al.*, J. Virol. 85:10905-10908, 2011a.

Krause *et al.*, J. Virol. 86:6334-6340, 2012.

Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.

Lanciotti & Valadere, Emerg Infect Dis 20, 2014.

Lee *et al.*, PLoS Pathog. 7:e1002390, 2011.

Levitt *et al.*, Vaccine 4, 157-162, 1986.

Lum *et al.*, J. Immunol. 190:6295-6302, 2013.

Mainou *et al.*, MBio 4, 2013.

Masrinoul *et al.*, Virology 464-465, 111-117, 2014.

Messer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111:1939-1944, 2014.

Morrison *et al.*, Am J Pathol, 178:32-40, 2011.

Nakamura *et al.*, *In*: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.

O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.

Paes *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 131:6952-6954, 2009.

Pal *et al.*, J. Virol. 88:8213-8226, 2014.

Pal *et al.*, PLoS Pathog 9, e1003312, 2013.

Persic *et al.*, *Gene* 187:1, 1997

Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 3:624-652,

1990.

R.C. Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

Schilte *et al.,* PLoS Negl. Trop. Dis. 7:e2137, 2013.

Selvarajah *et al.,* PLoS Negl. Trop. Dis. 7:e2423, 2013.

Sissoko *et al.,* PLoS Negl. Trop. Dis. 3:e389, 2009.

Smith *et al.,* J. Virol. 86, 2665-2675, 2012.

Smith *et al.,* J. Virol. 88, 12233-12241, 2014.

Smith *et al.,* J. Virol., 86:2665-2675, 2012.

Smith et al., MBio 4, e00873-00813, 2013a.

Smith *et al.,*, J. Infect. Dis. 207, 1898-1908, 2013b.

Staples *et al.,* Clin. Infect. Dis., 49, 942-948, 2009.

Sun *et al.,* Elife, 2:e00435, 2013.

Sun *et al., J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.

Sun *et al.,* J. Virol., 88:2035-2046, 2014.

Tang *et al., J. Biol. Chem.,* 271:28324-28330, 1996.

Thornburg *et al.,* J. Clin. Invest., 123:4405-4409, 2013.

Патент США 3817837

Патент США 3850752

Патент США 3939350

Патент США 3996345

Патент США 4196265

Патент США 4275149

Патент США 4277437

Патент США 4366241

Патент США 4472509

Патент США 4554101

Патент США 4680338

Патент США 4816567

Патент США 4867973

Патент США 4938948

Патент США 5021236

Патент США 5141648

Патент США 5196066

Патент США 5563250

Патент США 5565332

Патент США 5856456

Патент США 5880270

Vander Veen *et al.,* Anim Health Res Rev, 13:1-9, 2012.

Voss *et al.,* Nature, 468:709-712, 2010.

Voss *et al.,* Nature, 468:709-712, 2010.

Warter *et al.,* J. lmmunol., 186:3258-3264, 2011.

Warter *et al.,* J. Immunol., 186:3258-3264, 2011.

Wawrzynczak & Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

Yu *et al.,* Nature 455:532-536, 2008.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное и/или рекомбинантное моноклональное антитело, которое связывается с гликопротеином E2 вируса чикунгунья, или его фрагмент, где антитело или фрагмент антитела характеризуется CDR вариабельной области тяжелой цепи, состоящими из SEQ ID NO: 103-105, и CDR вариабельной области легкой цепи, состоящими из SEQ ID NO: 187-189.

2. Моноклональное антитело или фрагмент антитела по п.1, где указанное антитело или фрагмент антитела кодируется вариабельными последовательностями легкой и тяжелой цепей согласно SEQ ID NO: 3 и 2 соответственно.

3. Моноклональное антитело или фрагмент антитела по п.1, где указанное антитело или фрагмент антитела кодируется вариабельными последовательностями легкой и тяжелой цепей, обладающими по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 3 и 2 соответственно.

4. Моноклональное антитело или фрагмент антитела по п.1, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит вариабельные последовательности легкой и тяжелой цепей согласно SEQ ID NO: 54 и 53 соответственно.

5. Моноклональное антитело или фрагмент антитела по п.1, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит вариабельные последовательности легкой и тяжелой цепей, обладающие 95% идентичностью с SEQ ID NO: 54 и 53 соответственно.

6. Моноклональное антитело или фрагмент антитела по п.1, где фрагмент антитела представляет собой рекомбинантное антитело ScFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab-фрагмент, F $(ab')_2$-фрагмент или Fv-фрагмент.

7. Моноклональное антитело или фрагмент антитела по п.1, где указанное антитело представляет собой IgG.

8. Способ обнаружения инфекции вирусом чикунгунья у субъекта, включающий:

(a) приведение в контакт образца от указанного субъекта с антителом или фрагментом антитела по пп.1-7;

(b) обнаружение гликопротеина E2 вируса чикунгунья в указанном образце посредством связывания указанного антитела или фрагмента антитела с E2 в указанном образце.

9. Способ по п.8, где указанным образцом является жидкость организма.

10. Способ лечения субъекта, инфицированного вирусом чикунгунья, включающий доставку указанному индивидууму антитела или фрагмента антитела по пп.1-7.

11. Способ уменьшения вероятности инфицирования субъекта, имеющего риск контакта с вирусом чикунгунья, включающий доставку указанному индивидууму антитела или фрагмента антитела по пп.1-7.

12. Способ по п.11, где указанное антитело или фрагмент антитела вводят до инфицирования.

13. Способ по п.10, где указанное антитело или фрагмент антитела вводят после инфицирования.

14. Способ по п.10, где доставка включает введение антитела или фрагмента антитела, или генетическую доставку последовательности РНК или ДНК, или вектора, кодирующих антитело или фрагмент антитела.

15. Способ по п.11, где доставка включает введение антитела или фрагмента антитела, или генетическую доставку последовательности РНК или ДНК, или вектора, кодирующих антитело или фрагмент антитела.

16. Фармацевтическая композиция для лечения инфекции, вызываемой вирусом чикунгунья, содержащая выделенное и/или рекомбинантное антитело или фрагмент антитела по пп.1-7.

17. Клеточная линия, продуцирующая выделенное и/или рекомбинантное моноклональное антитело или фрагмент антитела по пп.1-7, где указанная клеточная линия содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антитело или фрагмент антитела.

18. Способ получения выделенного и/или рекомбинантного моноклонального антитела или фрагмента антитела по пп.1-7, где указанный способ включает стадии

(a) культивирование клеточной линии по п.17, продуцирующей выделенное и/или рекомбинантное моноклональное антитело или фрагмент антитела;

(b) очистка продуцированного выделенного и/или рекомбинантного моноклонального антитела или фрагмента антитела; и необязательно

(c) составление указанного выделенного и/или рекомбинантного моноклонального антитела или фрагмента антитела в фармацевтическую композицию.

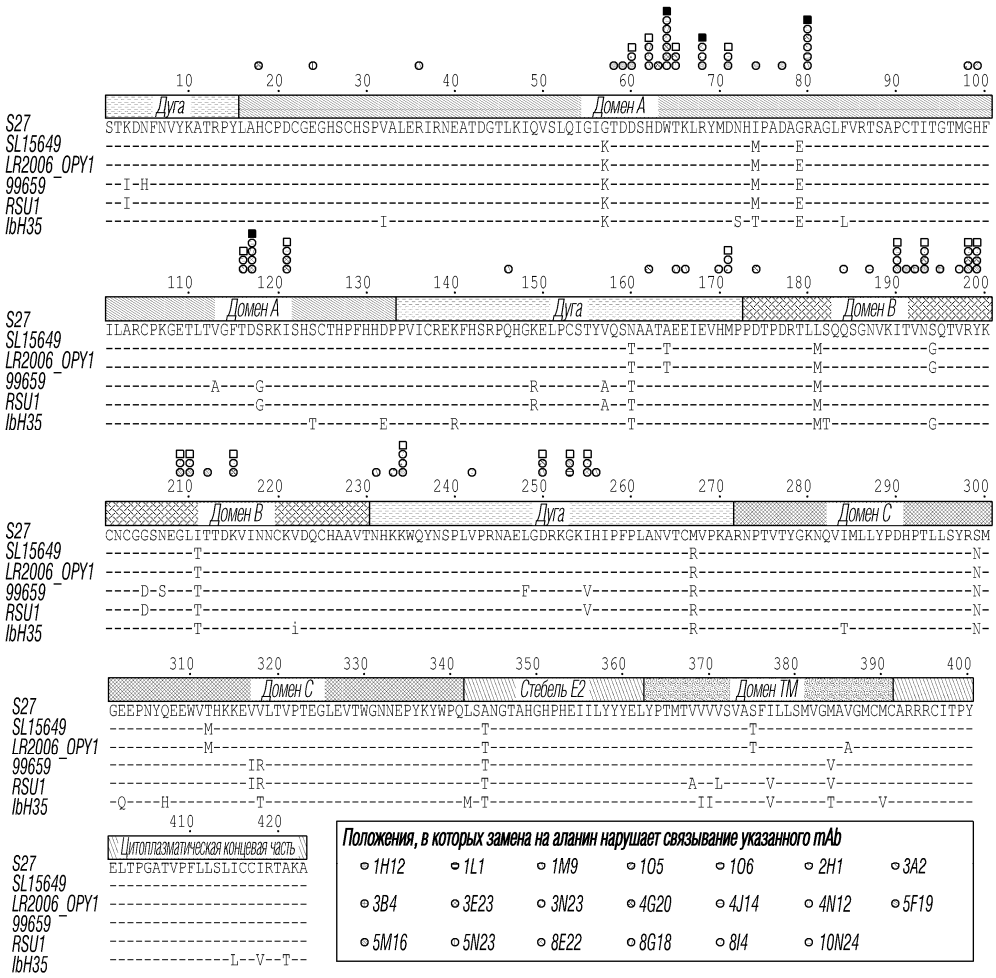
19. Применение выделенного и/или рекомбинантного моноклонального антитела для лечения инфекции, вызываемой вирусом чикунгунья, где антитело или фрагмент антитела получают способом по п.18.

20. Набор для лечения инфекции, вызываемой вирусом чикунгунья, отличающийся тем, что содержит одно выделенное и/или рекомбинантное моноклональное антитело или фрагмент антитела по пп.1-7 и упаковочный материал.

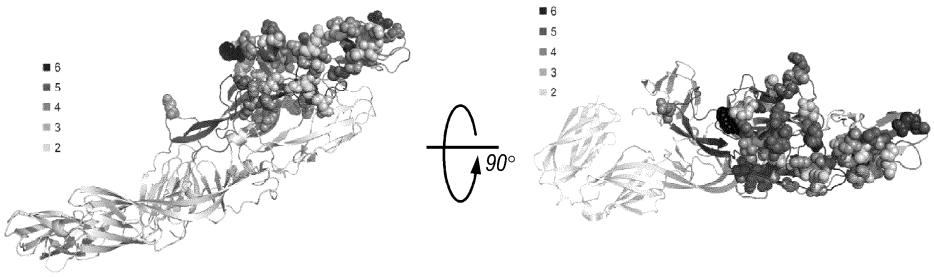
21. Фармацевтическая композиция для диагностики инфекции, вызываемой вирусом чикунгунья, содержащая выделенное и/или рекомбинантное антитело или фрагмент антитела по пп.1-7.

22. Применение выделенного и/или рекомбинантного моноклонального антитела для диагностики инфекции, вызываемой вирусом чикунгунья, где антитело или фрагмент антитела получают способом по п.18.

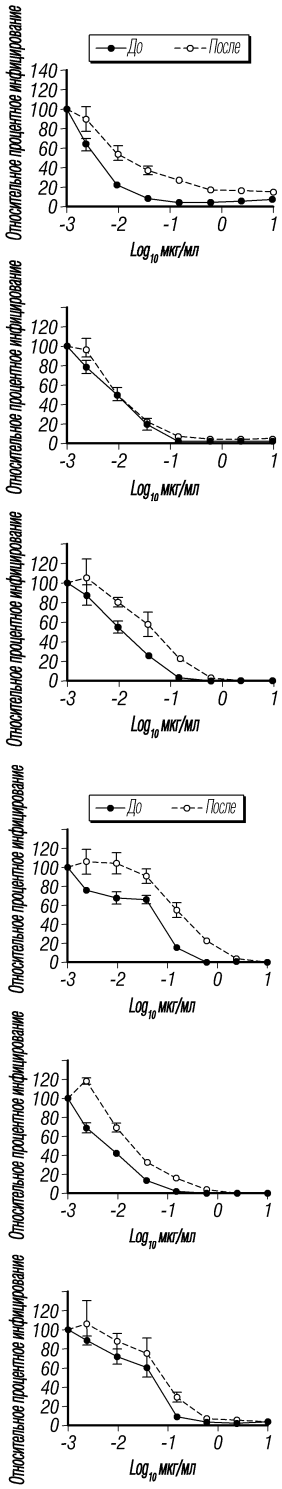
23. Набор для диагностики инфекции, вызываемой вирусом чикунгунья, отличающийся тем, что содержит одно выделенное и/или рекомбинантное моноклональное антитело или фрагмент антитела по пп.1-7 и упаковочный материал.



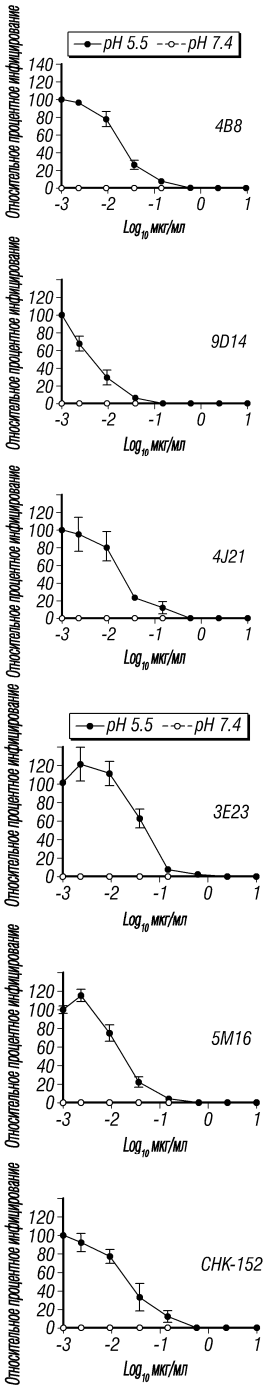
Фиг. 1A



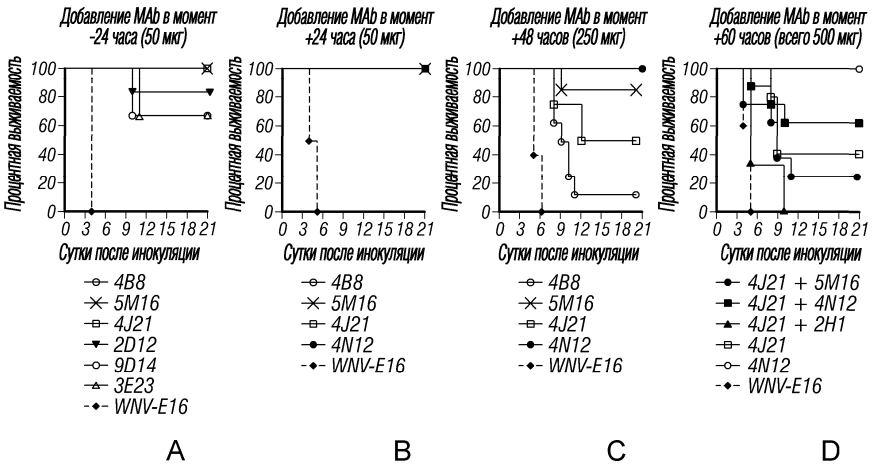
Фиг. 1B-C



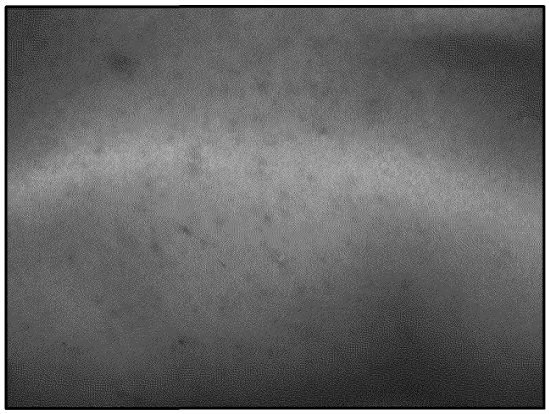
Фиг. 2A


pH 5.5
pH 7.4
Относительное процентное инфицирование
4B8
9D14
4J21
3E23
5M16
CHK-152
Log10 мкг/мл

Фиг. 2B



Фиг. 3



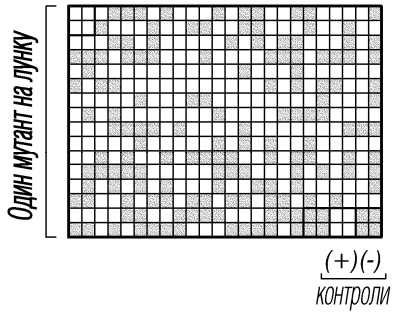
Фиг. 4

Конкурирующее антитело

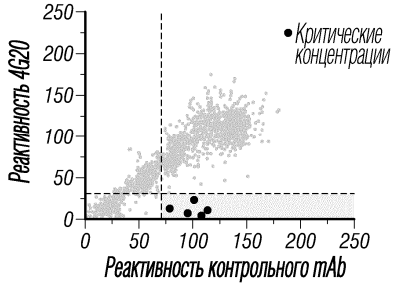
Первичное антитело

mAb	5N23	CHK-84	CHK-141	5O14	5M16	1O6	9D14	4B8	1H12	5F10	CHK-265	CHK-88	3A2	5F19	Домен(ы), идентифицированный посредством исследований с мутагенезом
5N23	0	-1	-3	82	92	111	79	96	-2	103	98	96	108	96	DA, Дуга
CHK-84	5	2	4	5	-2	48	103	102	-4	100	92	90	99	81	DA
CHK-141	5	5	-1	-9	38	65	97	101	30	96	86	85	92	80	DA
5O14	77	47	49	-1	27	15	44	33	1	89	85	89	15	91	NR
5M16	93	21	34	-10	5	-3	20	18	-2	96	84	87	64	88	DA
1O6	89	68	79	-20	-12	-7	34	3	-4	82	85	110	86	87	DA
9D14	98	105	98	26	25	30	23	27	24	118	105	116	114	94	NotR
4B8	92	88	94	-1	6	4	4	6	4	96	92	91	112	103	NR
1H12	31	38	54	5	26	19	48	36	-10	52	52	49	56	91	DA/DB, Дуга
5F10	92	94	101	86	95	97	84	90	45	-3	-3	5	93	99	
CHK-265	100	94	100	77	90	79	80	88	45	2	2	10	101	96	DB
CHK-88	97	85	101	77	91	108	89	91	38	3	3	8	53	97	DB
3A2	92	95	94	37	72	89	71	92	44	88	95	44	3	103	DB

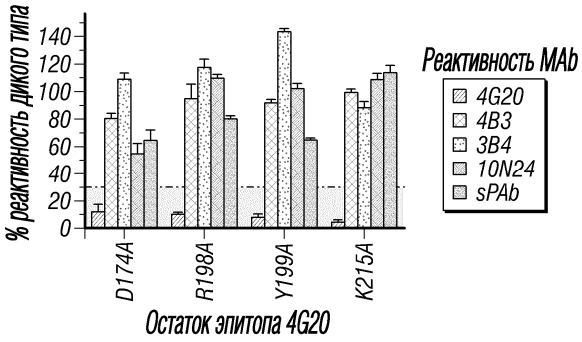
Фиг. 5



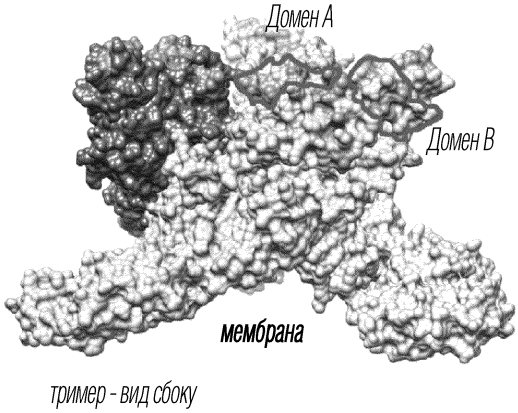
Фиг. 6A



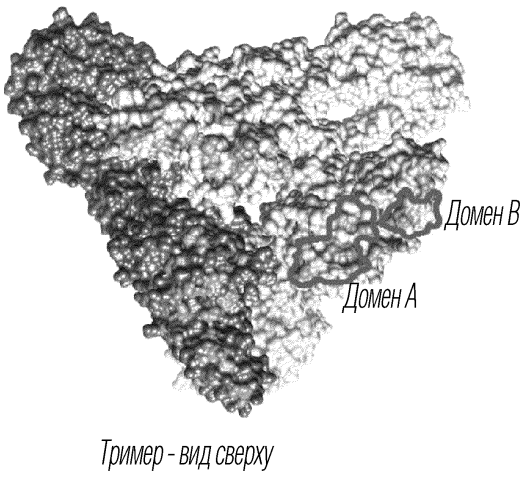
Фиг. 6B



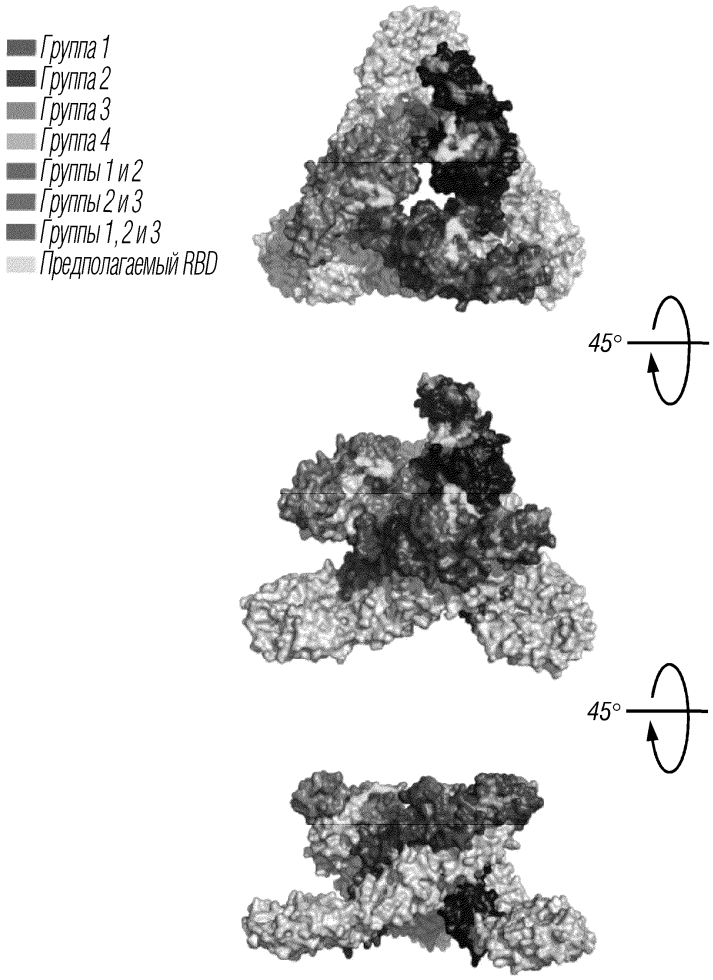
Фиг. 6C



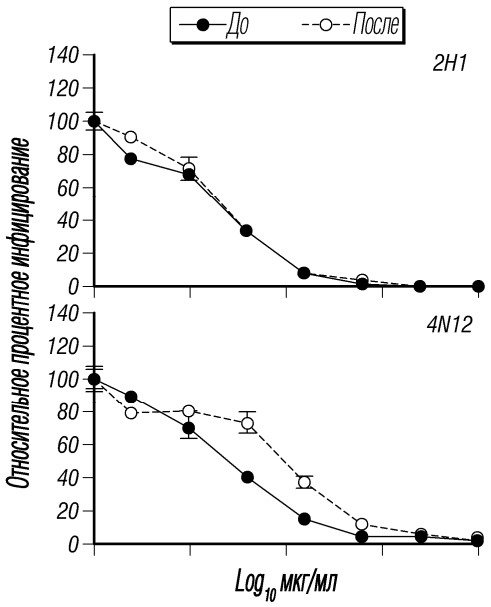
Фиг. 6E


Домен B
Домен A
Тример - вид сверху

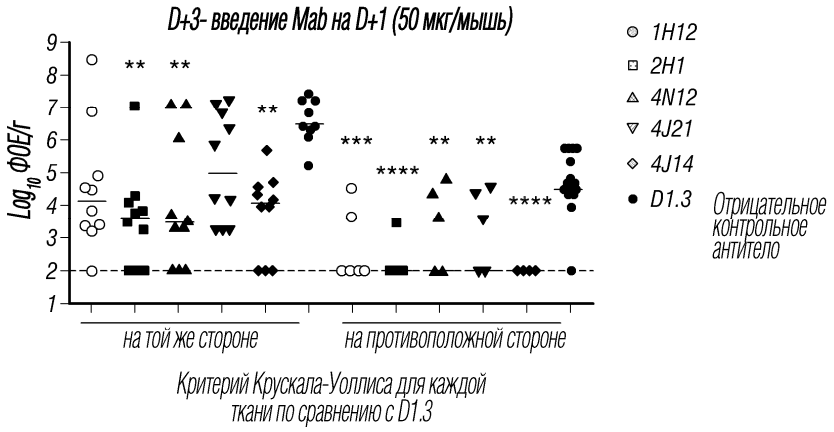
Фиг. 6F


Группа 1
Группа 2
Группа 3
Группа 4
Группы 1 и 2
Группы 2 и 3
Группы 1, 2 и 3
Предполагаемый RBD
45°
45°

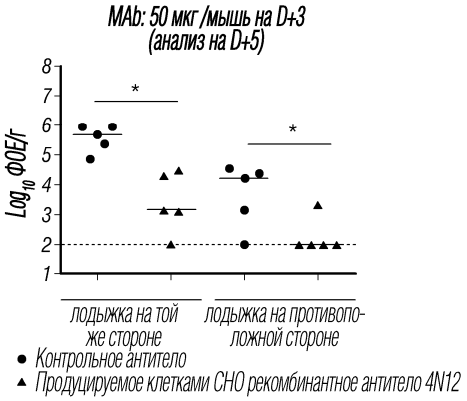
Фиг. 7



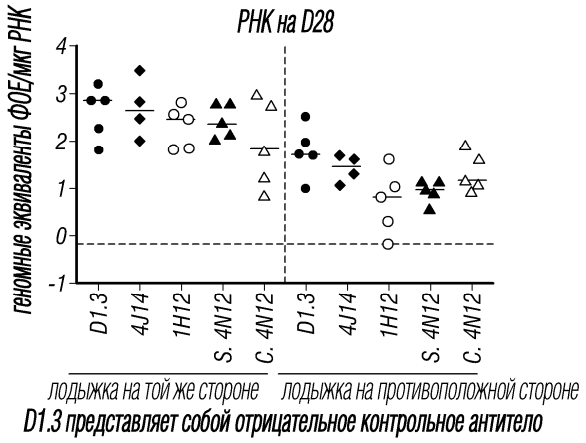
Фиг. 8



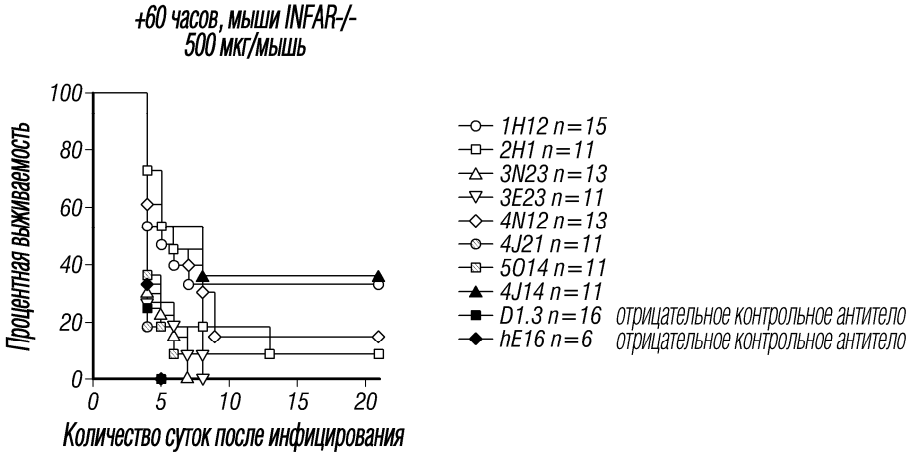
Фиг. 9



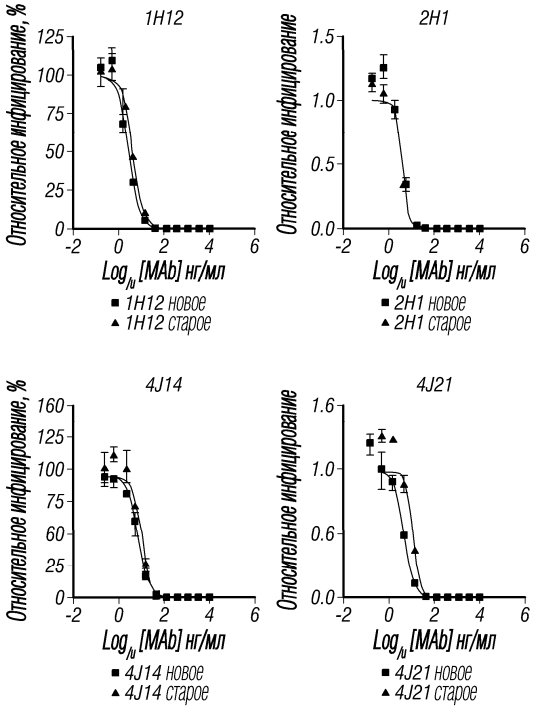
Фиг. 10

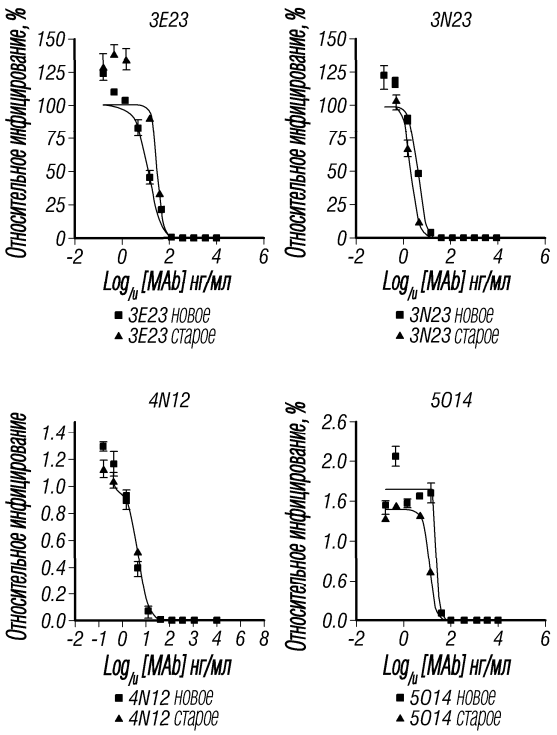

РНК на D28
геномные эквиваленты ФОЕ/мкг РНК
4
3
2
1
0
-1
D1.3
4J14
1H12
S. 4N12
C. 4N12
D1.3
4J14
1H12
S. 4N12
C. 4N12
лодыжка на той же стороне
лодыжка на противоположной стороне
D1.3 представляет собой отрицательное контрольное антитело

Фиг. 11


+60 часов, мыши INFAR-/-
500 мкг/мышь
Процентная выживаемость
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
Количество суток после инфицирования
1H12 n=15
2H1 n=11
3N23 n=13
3E23 n=11
4N12 n=13
4J21 n=11
5O14 n=11
4J14 n=11
D1.3 n=16 отрицательное контрольное антитело
hE16 n=6 отрицательное контрольное антитело

Фиг. 12


1H12
Относительное инфицирование, %
125
100
75
50
25
0
-2
0
2
4
6
Log10 [MAb] нг/мл
1H12 новое
1H12 старое
2H1
Относительное инфицирование
1.5
1.0
0.5
0.0
Log10 [MAb] нг/мл
2H1 новое
2H1 старое
4J14
Относительное инфицирование, %
160
125
100
75
60
25
0
Log10 [MAb] нг/мл
4J14 новое
4J14 старое
4J21
Относительное инфицирование
1.6
1.0
0.6
0.0
Log10 [MAb] нг/мл
4J21 новое
4J21 старое



Фиг. 13

Относительное инфицирование	Клон	Продуцированное гибридомой mAb («старое»)	Продуцируемое рекомбинантными клетками CHO mAb («новое»)
	1H12	4.2	2.7
	2H1	4	3.8
	(3E)23	34	13.8
	3N23	2.1	4.5
	4J14	8.6	5.7
	4J21	11.4	4.8
	4N12	4.8	5
	5M16	5.9	1,094
	5(O)14	14.3	34.8

Фиг. 14

Выравнивание E1/E2 вируса чикунгунья

Генотипы ECSA: LR2006
S27
SL15649

Азиатские генотипы: 181/25
99659

Западно-африканский генотип: IbH35

Выровненные последовательности показаны как Белок_штамм_номер доступа Genbank

CLUSTAL O(1.2.1) множественное выравнивание последовательностей

```
E1_S27_NC004162.2          TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAC
E1_SL15649_GU189061.1      TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAT
E1_LR2006_KT449801.1       TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAT
E1_181/25_L37661.3         TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAC
E1_99659_KJ451624.1        TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAC
E1_IbH35_HM045786.1        TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTTGTCAAC
                           ****************************************************:*****

E1_S27_NC004162.2          AGACCGGGCTACAGCCCCATGGTACTGGAGATGGAGCTACTGTCAGTCACTTTGGAGCCA
E1_SL15649_GU189061.1      AGACCTGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAACTACTGTCAGTCACTTTGGAGCCA
E1_LR2006_KT449801.1       AGACCTGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAACTACTGTCAGTCACTTTGGAGCCA
E1_181/25_L37661.3         AGACCGGGCTACAGCCCCATGGTACTGGAGATGGAGCTTCTGTCAGTCACTTTGGAGCCA
E1_99659_KJ451624.1        AGACCGGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAGCTTCTGTCTGTCACCTTGGAACCA
E1_IbH35_HM045786.1        AGACCGGGTTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAGCTACAATCGGTCACCTTGGAACCA
                           ***** ** *************** **********.**:*:.** ***** *****.***

E1_S27_NC004162.2          ACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAATACAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_SL15649_GU189061.1      ACACTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTACAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_LR2006_KT449801.1       ACACTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTACAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_181/25_L37661.3         ACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTATAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_99659_KJ451624.1        ACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTATAAAACCGTTATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_IbH35_HM045786.1        ACACTGTCACTTGACTACATCACGTGCGAGTACAAAACTGTCATCCCGTCCCCGTACGTG
                           **.**.**.***** **************.** ***** ** ***** ** *********

E1_S27_NC004162.2          AAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTC
E1_SL15649_GU189061.1      AAGTGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTC
E1_LR2006_KT449801.1       AAGTGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTC
E1_181/25_L37661.3         AAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAGAGCCTACCTGATTACAGCTGTAAGGTC
E1_99659_KJ451624.1        AAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGTAAGGACAAGAGCCTACCTGATTACAGCTGTAAGGTC
E1_IbH35_HM045786.1        AAGTGCTGTGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAGAGCCTACCAGACTACAGCTGCAAGGTC
                           **.***** ************** ********.*.******:** ******** ******

E1_S27_NC004162.2          TTCACCGGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACGCTGAAAAC
E1_SL15649_GU189061.1      TTCACCGGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACGCTGAAAAC
E1_LR2006_KT449801.1       TTCACCGGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACGCTGAAAAC
E1_181/25_L37661.3         TTCACCGGCGTCTACCCATTCATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACACTGAAAAT
E1_99659_KJ451624.1        TTCACCGGCGTCTACCCATTCATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACACCGAAAAT
E1_IbH35_HM045786.1        TTTACTGGAGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTTTGCGACGCCGAAAAT
                           ** ** **.*********** ********************** ******.* *****

E1_S27_NC004162.2          ACGCAATTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_SL15649_GU189061.1      ACGCAGTTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_LR2006_KT449801.1       ACGCAGTTGAGCGAAGCACACGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_181/25_L37661.3         ACGCAATTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_99659_KJ451624.1        ACGCAATTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_IbH35_HM045786.1        ACGCAATTGAGCGAGGCACATGTAGAGAAATCTGAATCTTGCAAAACAGAGTTTGCATCG
                           *****.********.***** **.*****.** *****:***********.********.

E1_S27_NC004162.2          GCATACAGGGCTCATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_SL15649_GU189061.1      GCATACAGGGCTCATACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_LR2006_KT449801.1       GCATACAGGGCTCATACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_181/25_L37661.3         GCATATAGGGCTCATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_99659_KJ451624.1        GCATACAGGGCTCATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_IbH35_HM045786.1        GCCTACAGAGCCCACACCGCATCCGCGTCGGCGAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAC
                           **.** **.** ** ******** **.**.** *************************

E1_S27_NC004162.2          AACATCACTGTAACTGCCTATGCAAACGGCGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCCAAA
```

```
E1_SL15649_GU189061.1      AACATCACTGTAACTGCCTATGCAAACGGCGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCCAAA
E1_LR2006_KT449801.1       AACATCACTGTAACTGCCTATGCAAACGGCGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCCAAA
E1_181/25_L37661.3         AATGTTACTGTATCTGCTTATGCAAACGGCGATCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCTAAA
E1_99659_KJ451624.1        AATATCACTGTGGCTGCTTATGCAAACGGCGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCTAAA
E1_IbH35_HM045786.1        AACATTACTGTAGCTGCCTACGCTAACGGCGACCATGCCGTCACAGTAAAGGACGCCAAG
                           ** .* *****. **** ** **:******** **************:******** **.

E1_S27_NC004162.2          TTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTTGACAACAAAATCGTGGTGTAC
E1_SL15649_GU189061.1      TTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTCGACAACAAAATTGTGGTGTAC
E1_LR2006_KT449801.1       TTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTCGACAACAAAATTGTGGTGTAC
E1_181/25_L37661.3         TTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTTGACAATAAAATCGTGGTGTAC
E1_99659_KJ451624.1        TTCATAGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTCGACAATAAAATCGTGGTGTAC
E1_IbH35_HM045786.1        TTTGTCGTGGGACCAATGTCCTCCGCCTGGACACCTTTTGACAACAAAATCGTGGTGTAC
                           ** .* *****.******** **.************** ***** ***** *********

E1_S27_NC004162.2          AAAGGTGACGTTTACAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_SL15649_GU189061.1      AAAGGTGACGTCTATAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_LR2006_KT449801.1       AAAGGTGACGTCTATAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_181/25_L37661.3         AAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCGCCCTTCGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_99659_KJ451624.1        AAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCGCCCTTCGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_IbH35_HM045786.1        AAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCACCTTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
                           ***** ***** ** **************.** ** ************************

E1_S27_NC004162.2          GGCGATATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCAAAGACGTCTATGCTAACACACAACTGGTA
E1_SL15649_GU189061.1      GGCGATATCCAAAGTCGCACACCTGAGAGTAAAGACGTCTATGCTAATACACAACTGGTA
E1_LR2006_KT449801.1       GGCGATATCCAAAGTCGCACACCTGAGAGTAAAGACGTCTATGCTAATACACAACTGGTA
E1_181/25_L37661.3         GGCGACATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCGAAGACGTCTATGCTAACACACAACTGGTA
E1_99659_KJ451624.1        GGCGACATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCGAAGACGTCTATGCTAATACACAACTGGTA
E1_IbH35_HM045786.1        GGTGACATTCAAAGTCGTACACCGGAAAGTAAAGACGTTTATGCCAACACTCAGTTGGTA
                           ** ** ** ******** **.** **.** .******* ***** ** **:**. *****

E1_S27_NC004162.2          CTGCAGAGACCGGCTGCGGGTACGGTACACGTGCCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTT
E1_SL15649_GU189061.1      CTGCAGAGACCGGCTGCGGGTACGGTACACGTGCCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTT
E1_LR2006_KT449801.1       CTGCAGAGACCGGCTGTGGGTACGGTACACGTGCCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTT
E1_181/25_L37661.3         CTGCAGAGACCGTCCGCGGGTACGGTGCACGTGCCGTACTCTCAGGCACCATCTGGCTTC
E1_99659_KJ451624.1        CTGCAGAGACCGTCCGCGGGTACGGTGCACGTGCCGTACTCTCAGGCACCATCTGGCTTC
E1_IbH35_HM045786.1        CTACAGAGGCCAGCAGCAGGCACGGTACATGTACCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTC
                           **.*****.**. * * .** *****.** **.**.************************

E1_S27_NC004162.2          AAGTATTGGTTAAAAGAACGAGGGGCGTCGCTACAGCACACAGCACCATTTGGCTGCCAA
E1_SL15649_GU189061.1      AAGTATTGGCTAAAAGAACGCGGGGCGTCACTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGCCAA
E1_LR2006_KT449801.1       AAGTATTGGCTAAAAGAACGCGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGCCAA
E1_181/25_L37661.3         AAGTATTGGCTAAAAGAACGAGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGTCAA
E1_99659_KJ451624.1        AAGTATTGGCTAAAAGAACGAGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGTCAA
E1_IbH35_HM045786.1        AAGTATTGGCTGAAGGAACGAGGAGCATCGCTACAGCACACGGCACCGTTCGGTTGCCAG
                           ********* *.**.*****.**.**.**.**.********.*****.** ** ** **.

E1_S27_NC004162.2          ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGATGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATC
E1_SL15649_GU189061.1      ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGGTGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATC
E1_LR2006_KT449801.1       ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGGTGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATC
E1_181/25_L37661.3         ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGATGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCTATCTCCATC
E1_99659_KJ451624.1        ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGATGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCTATCTCCATC
E1_IbH35_HM045786.1        ATTGCGACAAACCCGGTAAGAGCTGTAAATTGCGCTGTGGGGAACATACCAATTTCCATC
                           **:**.***************** .*.** ***** **.********.** ** ******

E1_S27_NC004162.2          GACATACCGGATGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCA
E1_SL15649_GU189061.1      GACATACCGGAAGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCG
E1_LR2006_KT449801.1       GACATACCGGAAGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCG
E1_181/25_L37661.3         GACATACCGGACGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCATCTTTAACGGACATGTCG
E1_99659_KJ451624.1        GACATACCGGACGCGGCCTTTACCAGGGTCGTCGACGCGCCATCTTTAACGGACATGTCG
E1_IbH35_HM045786.1        GACATACCGGATGCGGCCTTTACTAGGGTTGTCGATGCACCCTCTGTAACGGACATGTCA
                           *********** ******** ** ***** ***** **.**.*** *************.
```

```
E1_S27_NC004162.2          TGCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTCGCCATTATTAAATAT
E1_SL15649_GU189061.1      TGCGAGGTACTAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTCGCCATTATTAAATAT
E1_LR2006_KT449801.1       TGCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTCGCCATTATTAAATAT
E1_181/25_L37661.3         TGTGAGGTACCAGCCTGCACCCACTCCTCAGACTTTGGGGGCGTAGCCATCATTAAATAT
E1_99659_KJ451624.1        TGTGAGGTATCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTAGCCATCATTAAATAT
E1_IbH35_HM045786.1        TGCGAAGTACCAGCCTGCACTCACTCCTCCGACTTTGGGGGCGTCGCCATCATCAAATAT
                           ** **.***  ********* ** *****.**************.***** ** ******

E1_S27_NC004162.2          GCAGTCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACCAACGCCGTCACTATCCGG
E1_SL15649_GU189061.1      GCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCGG
E1_LR2006_KT449801.1       GCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCGG
E1_181/25_L37661.3         GCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCGG
E1_99659_KJ451624.1        GCAGCCAGTAAGAAAGGCAAGTGTGCAGTGCACTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCGG
E1_IbH35_HM045786.1        ACAGCTAGCAAGAAAGGTAAATGTGCAGTACATTCGATGACCAACGCCGTTACCATTCGA
                           .***  ** ******** **.*****.**.** ******** ******** ** ** **.

E1_S27_NC004162.2          GAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTG
E1_SL15649_GU189061.1      GAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTA
E1_LR2006_KT449801.1       GAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTA
E1_181/25_L37661.3         GAAGCTGAAATAGAAGTAGAAGGGAACTCTCAGTTGCAAATCTCTTTTTCGACGGCCCTA
E1_99659_KJ451624.1        GAAGCTGAAATAGAAGTAGAAGGGAACTCTCAGTTGCAAATCTCTTTTTCGACGGCCCTA
E1_IbH35_HM045786.1        GAAGCCGACGTAGAAGTAGAGGGGAATTCCCAGCTGCAAATATCCTTCTCAACAGCCTTG
                           ***** ** .*******:**.***** ** *** *******.** ** **.**.*** *.

E1_S27_NC004162.2          GCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGC
E1_SL15649_GU189061.1      GCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCTGAGTGC
E1_LR2006_KT449801.1       GCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGC
E1_181/25_L37661.3         GCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGC
E1_99659_KJ451624.1        GCCAGCGCCGAATTTCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGC
E1_IbH35_HM045786.1        GCAAGCGCCGAGTTTCGCGTGCAAGTGTGCTCCACACAAGTACACTGCGCAGCCGCATGC
                           **.********.** *****.***** ** ** ************** ***** *..***

E1_S27_NC004162.2          CACCCTCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCCTCGGGGTCCAG
E1_SL15649_GU189061.1      CACCCCCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCCTCGGGGTCCAG
E1_LR2006_KT449801.1       CACCCCCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCCTCGGGGTCCAG
E1_181/25_L37661.3         CATCCACCGAAAGACCATATAGTCAATTACCCGGCGTCACACACCACCCTCGGGGTCCAA
E1_99659_KJ451624.1        CATCCACCGAAAGACCATATAGTCAATTACCCGGCGTCACACACCACCCTCGGGGTCCAA
E1_IbH35_HM045786.1        CACCCTCCAAAGGACCACATAGTCAATTACCCAGCATCACACACCACCCTTGGGGTCCAG
                           ** ** **.**.***** ******** *****.**.***** ******** ********.

E1_S27_NC004162.2          GACATTTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_SL15649_GU189061.1      GACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_LR2006_KT449801.1       GACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_181/25_L37661.3         GACATTTCCGTTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_99659_KJ451624.1        GACATTTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_IbH35_HM045786.1        GATATATCCACAACGGCAATGTCTTGGGTGCAGAAGATTACGGGAGGAGTAGGATTAATT
                           ** ** ***. :*****.*****:************** ********:**.*** *..**

E1_S27_NC004162.2          GTCGCTGTTGCAGCACTGATTCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTCAGCAGGCAC
E1_SL15649_GU189061.1      GTTGCTGTTGCCGCACTGATTCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTCAGCAGGCAC
E1_LR2006_KT449801.1       GTTGCTGTTGCCGCACTGATTCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTCAGCAGGCAC
E1_181/25_L37661.3         GTCGCTGTTGCAGCACTGATCCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTTAGCAGGCAC
E1_99659_KJ451624.1        GTCGCTGTTGCAGCACTGATCCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTTAGCAGGCAC
E1_IbH35_HM045786.1        GTTGCTGTTGCTGCCTTAATTTTAATTGTGGTGCTATGCGTGTCGTTTAGCAGGCAC
                           ** ******** **. *.**  **** ******************** *********
```

CLUSTAL O(1.2.1) множественное выравнивание последовательностей

```
E1_IbH35_HM045786.1        YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELQSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_S27_NC004162.2          YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_SL15649_GUI89061.1      YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_LR2006_KT449801.1       YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_99659_KJ451624.1        YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_181/25_L37661.3         YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
                           ********************************* *************************

E1_IbH35_HM045786.1        KCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_S27_NC004162.2          KCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_SL15649_GUI89061.1      KCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_LR2006_KT449801.1       KCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_99659_KJ451624.1        KCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDTENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_181/25_L37661.3         KCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDTENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
                           ***********.*************************:**********************

E1_IbH35_HM045786.1        AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVAAYANGDHAVTVKDAKFVVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_S27_NC004162.2          AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_SL15649_GUI89061.1      AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_LR2006_KT449801.1       AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_99659_KJ451624.1        AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVAAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_181/25_L37661.3         AYRAHTASASAKLRVLYQGNNVTVSAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
                           *********************:**:****************:******************

E1_IbH35_HM045786.1        KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAAGTVHVPYSQAPSGF
E1_S27_NC004162.2          KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAAGTVHVPYSQAPSGF
E1_SL15649_GUI89061.1      KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAAGTVHVPYSQAPSGF
E1_LR2006_KT449801.1       KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAVGTVHVPYSQAPSGF
E1_99659_KJ451624.1        KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESEDVYANTQLVLQRPSAGTVHVPYSQAPSGF
E1_181/25_L37661.3         KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESEDVYANTQLVLQRPSAGTVHVPYSQAPSGF
                           ******************************:*************:.**************
```

```
E1_IbH35_HM045786.1        KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCAVGNIPISIDIPDAAFTRVVDAPSVTDMS
E1_S27_NC004162.2          KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPISIDIPDAAFTRVVDAPSLTDMS
E1_SL15649_GUI89061.1      KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCAVGNMPISIDIPEAAFTRVVDAPSLTDMS
E1_LR2006_KT449801.1       KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCAVGNMPISIDIPEAAFTRVVDAPSLTDMS
E1_99659_KJ451624.1        KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPISIDIPDAAFTRVVDAPSLTDMS
E1_181/25_L37661.3         KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPISIDIPDAAFTRVVDAPSLTDMS
                           ****************************:******:*******:***********:****

E1_IbH35_HM045786.1        CEVPACTHSSDFGGVAIIKYTASKKGKCAVHSMTNAVTIREADVEVEGNSQLQISFSTAL
E1_S27_NC004162.2          CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAVSKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_SL15649_GUI89061.1      CEVLACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_LR2006_KT449801.1       CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_99659_KJ451624.1        CEVSACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_181/25_L37661.3         CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
                           *** ****************:.********************::****************

E1_IbH35_HM045786.1        ASAEFRVQVCSTQVHCAAACHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISTTAMSWVQKITGGVGLI
E1_S27_NC004162.2          ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV
E1_SL15649_GUI89061.1      ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV
E1_LR2006_KT449801.1       ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV
E1_99659_KJ451624.1        ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV
E1_181/25_L37661.3         ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISVTAMSWVQKITGGVGLV
                           ****************** ************************.***************:

E1_IbH35_HM045786.1        VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_S27_NC004162.2          VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_SL15649_GUI89061.1      VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_LR2006_KT449801.1       VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_99659_KJ451624.1        VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_181/25_L37661.3         VAVAALILIVVLCVSFSRH
                           ********************
```

CLUSTAL O(1.2.1) множественное выравнивание последовательностей

```
E2_181/25_L37661.3         AGTATTAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCATAAGACCGTACCTAGCTCACTGTCCC
E2_IbH35_HM045786.1        AGTACTAAGGACAATTTTAATGTCTATAAAGCTACAAGACCATATCTAGCTCATTGTCCT
E2_LR2006_KT449801.1       AGCACCAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACTTAGCTCACTGTCCC
E2_SL15649_GU189061.1      AGCACCAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACTTAGCTCACTGTCCC
E2_S27_NC004162.2          AGCACCAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACCTAGCTCACTGTCCC
E2_99659_KJ451624.1        AGTATTAAGGACCACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCGTACCTAGCTCACTGTCCC
                           ** *  ******.* ** ************** * ******.**  ******* *****

E2_181/25_L37661.3         GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCAGAAACGAA
E2_IbH35_HM045786.1        GACTGCGGAGAAGGGCATTCGTGCCACAGCCCTATCGCATTGGAGCGCATCAGAAATGAA
E2_LR2006_KT449801.1       GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAA
E2_SL15649_GU189061.1      GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAA
E2_S27_NC004162.2          GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAA
E2_99659_KJ451624.1        GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCAGAAACGAA
                           ***** *********** ******** ** ** .*.**. *.**.*********** ***

E2_181/25_L37661.3         GCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTTTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGAT
E2_IbH35_HM045786.1        GCAACGGACGGAACGCTGAAAATCCAGGTCTCTTTGCAGATCGGGATAAAGACAGATGAC
E2_LR2006_KT449801.1       GCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGAC
E2_SL15649_GU189061.1      GCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGACGAC
E2_S27_NC004162.2          GCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAATTGGAATAGGGACGGATGAT
E2_99659_KJ451624.1        GCGACAGACGGGACGTTGAAAATCCAGGTTTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGAT
                           **.**.*****.*** ************* ** *****.** **.***..***.** **

E2_181/25_L37661.3         AGCCATGATTGGACCAAGCTGCGTTACATGGACAATCATATGCCAGCAGACGCAGAGAGG
E2_IbH35_HM045786.1        AGCCACGATTGGACCAAGCTGCGCTATATGGATAGCCATACGCCAGCGGACGCGGAGCGA
E2_LR2006_KT449801.1       AGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAACCACATGCCAGCAGACGCAGAGAGG
E2_SL15649_GU189061.1      AGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAACCACATGCCAGCAGACGCAGAGAGG
E2_S27_NC004162.2          AGCCATGATTGGACCAAGCTGCGTTACATGGACAATCACATACCAGCAGACGCAGGGAGG
E2_99659_KJ451624.1        AGCCATGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAATCACATGCCAGCAGACGCAGAGCGG
                           ***** ***************** ** ***** *. ** * .*****.*****.*.*.*.
```

```
E2_181/25_L37661.3          GCCAGGCTATTTGTAAGAACGTCAGCACCGTGCACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
E2_IbH35_HM045786.1         GCCGGATTGCTTGTAAGGACTTCAGCACCGTGCACGATCACCGGGACCATGGGACACTTT
E2_LR2006_KT449801.1        GCCGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCGTGTACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
E2_SL15649_GU189061.1       GCCGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCGTGTACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
E2_S27_NC004162.2           GCCGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCATGCACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
E2_99659_KJ451624.1         GCCGGGCTATTTGTAAGAACGTCAGCACCGTGCACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
                            ** .*. *. *******.** ********.** ***** ** **.**.***********

E2_181/25_L37661.3          ATCCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACGGTAGGAAG
E2_IbH35_HM045786.1         ATTCTGGCCCGATGCCCGAAAGGAGAGACGCTGACAGTGGGATTTACGGACAGCAGAAAG
E2_LR2006_KT449801.1        ATCCTGGCCCGATGTCCAAAAGGGGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAG
E2_SL15649_GU189061.1       ATCCTGGCCCGATGTCCAAAAGGGGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAG
E2_S27_NC004162.2           ATCCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAG
E2_99659_KJ451624.1         ATTCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGCGGGGTTCACTGACGGTAGGAAG
                            ** ** ******** **.*****.**.** *****.* ***.** ** ***.* **.***

E2_181/25_L37661.3          ATCAGTCACTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAA
E2_IbH35_HM045786.1         ATCAGCCACACATGCACACACCCGTTCCATCATGAACCACCTGTGATAGGTAGGGAGAGG
E2_LR2006_KT449801.1        ATTAGTCACTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGTCGGGAAAAA
E2_SL15649_GU189061.1       ATTAGTCATTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGTCGGGAAAAA
E2_S27_NC004162.2           ATTAGTCACTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAA
E2_99659_KJ451624.1         ATCAGTCACTCATGTACGCACCCATTTCACCATGACCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAA
                            ** ** ** :**** **.*****.** ** ** **.**:*********** .****.*..

E2_181/25_L37661.3          TTTCATTCCCGACCGCAGCACGGTAGAGAACTACCTTGCAGCACGTACGCGCAGAGCACC
E2_IbH35_HM045786.1         TTCCACTCTCGACCACAACATGGTAAAGAGTTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCACC
E2_LR2006_KT449801.1        TTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCACC
E2_SL15649_GU189061.1       TTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCACC
E2_S27_NC004162.2           TTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCAAC
E2_99659_KJ451624.1         TTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAGGGAACTACCTTGCAGCACGTACGCGCAGAGCACC
                            ** ** ** *****.**.** ****..**. ****************** ********.*

E2_181/25_L37661.3          GCTGCAACTGCCGAGGAGATAGAGGTACATATGCCCCCAGACACCCCAGATCGCACATTG
E2_IbH35_HM045786.1         GCTGCCACTGCCGAGGAGATAGAGGTGCATATGCCCCCAGATACTCCTGACCGCACGCTG
E2_LR2006_KT449801.1        GCCGCAACTACCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCTGATCGCACATTA
E2_SL15649_GU189061.1       GCCGCAACTACCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCTGATCGCACATTA
E2_S27_NC004162.2           GCCGCAACTGCCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCTGATCGCACATTG
E2_99659_KJ451624.1         GCTGCAACTGCCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCAGATCGCACATTA
                            ** **.***.****************.** *********** ** **:** *****. *.

E2_181/25_L37661.3          ATGTCACAACAGTCCGGTAATGTAAAGATCACAGTCAATAGTCAGACGGTGCGGTACAAG
E2_IbH35_HM045786.1         ATGACGCAGCAGTCTGGCAACGTGAAGATCACAGTTAATGGGCAGACGGTGCGGTACAAG
E2_LR2006_KT449801.1        ATGTCACAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAATGGCCAGACGGTGCGGTACAAG
E2_SL15649_GU189061.1       ATGTCACAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAATGGCCAGACGGTGCGGTACAAG
E2_S27_NC004162.2           CTGTCACAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAATAGTCAGACGGTGCGGTATAAG
E2_99659_KJ451624.1         ATGTCACAACAGTCCGGCAATGTAAAGATCACAGTCAATAGTCAGACGGTGCGGTACAAG
                            .**:*.**.***** ** ** **.*********** ***.* ************** ***

E2_181/25_L37661.3          TGTAATTGCGGTGACTCAAATGAAGGACTAACCACTACAGACAAAGTGATTAATAACTGC
E2_IbH35_HM045786.1         TGCAACTGCGGCGGCTCAAACGAGGGACTGACAACCACAGACAAAGTGATCAATAACTGC
E2_LR2006_KT449801.1        TGTAATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAACAACTACAGACAAAGTGATTAATAACTGC
E2_SL15649_GU189061.1       TGTAATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAACAACTACAGACAAAGTGATTAATAACTGC
E2_S27_NC004162.2           TGTAATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAATAACTACAGATAAAGTGATTAATAACTGC
E2_99659_KJ451624.1         TGCAATTGTGGTGACTCAAGTGAAGGATTAACCACTACAGATAAAGTGATTAATAACTGC
                            ** ** ** ** *.*****. **.*** *.* .** ***** ******** *********

E2_181/25_L37661.3          AAGGTTGATCAATGCCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAATGGCAGTATAATTCCCCT
E2_IbH35_HM045786.1         AAAATTGATCAGTGCCATGCTGCAGTCACTAATCACAAGAAGTGGCAATACAACTCCCCT
E2_LR2006_KT449801.1        AAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCT
E2_SL15649_GU189061.1       AAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCT
E2_S27_NC004162.2           AAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCT
E2_99659_KJ451624.1         AAGGTCGATCAATGCCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAATGGCAGTATAATTCCCCT
                            **..* *****.** ***** **.***** ********.**.*****.** ** ******
```

```
E2_181/25_L37661.3          CTGGTCCCGCGTAATGCTGAACTCGGGGACCGAAAAGGAAAAGTTCACATTCCGTTTCCT
E2_IbH35_HM045786.1         TTAGTCCCGCGTAACGCTGAACTCGGGGACCGTAAAGGAAAGATTCACATCCCATTCCCA
E2_LR2006_KT449801.1        CTGGTCCCGCGTAATGCTGAACTTGGGGACCGAAAAGGAAAAATTCACATCCCGTTTCCG
E2_SL15649_GU189061.1       CTGGTCCCGCGTAATGCTGAACTTGGGGACCGAAAAGGAAAAATTCACATCCCGTTTCCG
E2_S27_NC004162.2           CTGGTCCCGCGTAACGCTGAACTCGGGGACCGAAAAGGAAAAATTCACATCCCGTTTCCG
E2_99659_KJ451624.1         CTGGTCCCGCGTAATGCTGAATTCGGGGACCGGAAAGGAAAAGTTCACATTCCATTTCCT
                             *.*********** ****** * ******** ********..******* **.** **

E2_181/25_L37661.3          CTGGCAAATGTGACATGCAGGGTGCCTAAGGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGAAAA
E2_IbH35_HM045786.1         TTGGCAAACGTGACTTGCAGAGTGCCAAAAGCAAGAAACCCCACAGTAACGTACGGAAAA
E2_LR2006_KT449801.1        CTGGCAAATGTAACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGGAAA
E2_SL15649_GU189061.1       CTGGCAAATGTAACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGGAAA
E2_S27_NC004162.2           CTGGCAAATGTAACATGCATGGTGCCTAAAGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGGAAA
E2_99659_KJ451624.1         CTGGCAAATGTGACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGAAACCCCACCGTGACGTACGGAAAA
                             ******* **.**:**** .*****:**.*****.********.**.********.***

E2_181/25_L37661.3          AACCAAGTCATCATGCTGCTGTATCCTGACCACCCAACGCTCCTGTCCTACCGGAATATG
E2_IbH35_HM045786.1         AACCAAGTCACCATGCTGCTGTATCCTGACCATCCGACACTCTTGTCTTATCGTAACATG
E2_LR2006_KT449801.1        AACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCCAACACTCCTGTCCTACCGGAATATG
E2_SL15649_GU189061.1       AACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCCAACACTCCTGTCCTACCGGAATATG
E2_S27_NC004162.2           AACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCCAACACTCCTGTCCTACCGGAGTATG
E2_99659_KJ451624.1         AACCAAGTCATCATGTTGCTGTATCCTGACCACCCAACGCTCCTGTCCTACAGGAATATG
                            ********** **** *.************** **.**.*** **** ** .* *. ***

E2_181/25_L37661.3          GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGACGCATAAGAAGGAGATCAGGTTAACC
E2_IbH35_HM045786.1         GGACAGGAACCAAATTACCACGAGGAGTGGGTGACACACAAGAAGGAGGTTACCTTGACC
E2_LR2006_KT449801.1        GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGATGCATAAGAAGGAAGTCGTGCTAACC
E2_SL15649_GU189061.1       GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGATGCATAAGAAGGAAGTCGTGCTAACC
E2_S27_NC004162.2           GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGACGCACAAGAAGGAGGTCGTGCTAACC
E2_99659_KJ451624.1         GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGACGCATAAGAAGGAGATCAGGTTAACC
                            *** *.******** ** **.**.********** .** ********..* .   *.***

E2_181/25_L37661.3          GTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCGTACAAGTATTGGCCG
E2_IbH35_HM045786.1         GTGCCTACTGAGGGTCTCGAGGTCACTTGGGGCAACAACGAACCATACAAGTACTGGCCG
E2_LR2006_KT449801.1        GTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAGTATTGGCCG
E2_SL15649_GU189061.1       GTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAGTATTGGCCG
E2_S27_NC004162.2           GTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTTACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAGTATTGGCCG
E2_99659_KJ451624.1         GTGCCGACTGAGGGGCTCGAGGTCACGTGGGGTAACAATGAGCCGTACAAGTATTGGCCG
                            ***** *****.** ** ***** ** ***** ***** **.**.** ***** ******

E2_181/25_L37661.3          CAGTTATCCACAAACGGTACAGCCCACGGCCACCCGCATGAGATAATTTTGTATTATTAT
E2_IbH35_HM045786.1         CAGATGTCTACGAACGGTACTGCTCATGGTCACCCACATGAGATAATCTTGTACTATTAT
E2_LR2006_KT449801.1        CAGTTATCTACAAACGGTACAGCCCATGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTAT
E2_SL15649_GU189061.1       CAGTTATCTACAAACGGTACAGCCCATGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTAT
E2_S27_NC004162.2           CAGTTATCTGCAAACGGTACAGCCCACGGCCACCCGCATGAGATAATCTTGTACTATTAT
E2_99659_KJ451624.1         CAGTTATCCACAAACGGTACAGCCCACGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTAT
                            ***:*.** .*.********:** ** ** *****.***********  **** ******

E2_181/25_L37661.3          GAGCTGTACCCTACTATGACTGTGGTAGTTGTGTCAGTGGCCTCGTTCGTACTCCTGTCG
E2_IbH35_HM045786.1         GAGCTGTACCCCACTATGACTGTAATCATTGTGTCGGTGGCCTCGTTCGTGCTTCTGTCG
E2_LR2006_KT449801.1        GAGCTGTACCCCACTATGACTGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCACGTTCATACTCCTGTCG
E2_SL15649_GU189061.1       GAGCTGTACCCTACTATGACTGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCACGTTCATACTCCTGTCG
E2_S27_NC004162.2           GAGCTGTACCCTACTATGACTGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCTCGTTCATACTCCTGTCG
E2_99659_KJ451624.1         GAGCTGTACCCAACTATGACTGCGGTAGTTTTGTCAGTGGCCTCGTTCATACTCCTGTCG
                            *********** ********** ..*..** ****.******:*****.*.** ******

E2_181/25_L37661.3          ATGGTGGGTGTGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATTACACCGTAC
E2_IbH35_HM045786.1         ATGGTGGGCACAGCAGTGGGGATGTGTGTGTGCGCACGGCGCAGATGCATTACACCATAT
E2_LR2006_KT449801.1        ATGGTGGGTATGGCAGCGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCGTAT
E2_SL15649_GU189061.1       ATGGTGGGTATGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCGTAT
E2_S27_NC004162.2           ATGGTGGGTATGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCATAC
E2_99659_KJ451624.1         ATGGTGGGTGTGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATTACACCGTAC
                            ******** . .**** ********* .**** *****.*********** *****.**

E2_181/25_L37661.3          GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATTAGAACA
E2_IbH35_HM045786.1         GAATTAACACCAGGAGCCACCGTTCCCTTTCTGCTCAGCCTGCTATGTTGCGTCAGAACG
E2_LR2006_KT449801.1        GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACA
E2_SL15649_GU189061.1       GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACA
E2_S27_NC004162.2           GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACA
E2_99659_KJ451624.1         GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATTAGAACA
                            *** *.*********** ***** ** ** ***** *****..**** ***.* *****.

E2_181/25_L37661.3          GCTAAAGCG
E2_IbH35_HM045786.1         ACCAAGGCG
E2_LR2006_KT449801.1        GCTAAAGCG
E2_SL15649_GU189061.1       GCTAAAGCG
E2_S27_NC004162.2           GCTAAAGCG
E2_99659_KJ451624.1         GCTAAAGCG
                            .* **.***
```

```
CLUSTAL O(1.2.1) множественное выравнивание последовательностей

E2_IbH35_HM045786.1         STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPIALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
E2_99659_KJ451624.1         SIKDHFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
E2_181/25_L37661.3          SIKDNFNVYKAIRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
E2_S27_NC004162.2           STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDD
E2_SL15649_GU189061.1       STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
E2_LR2006_KT449801.1        STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
                            * **.****** *******************:************************ ***

E2_IbH35_HM045786.1         SHDWTKLRYMDSHTPADAERAGLLVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
E2_99659_KJ451624.1         SHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTAGFTDGRK
E2_181/25_L37661.3          SHDWTKLRYMDNHMPADAERARLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDGRK
E2_S27_NC004162.2           SHDWTKLRYMDNHIPADAGRAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
E2_SL15649_GU189061.1       SHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
E2_LR2006_KT449801.1        SHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
                            ***********.* **** ** *:****************************.****.**

E2_IbH35_HM045786.1         ISHTCTHPFHHEPPVIGRERFHSRPQHGKELPCSTYVQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_99659_KJ451624.1         ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_181/25_L37661.3          ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_S27_NC004162.2           ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYVQSNAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_SL15649_GU189061.1       ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_LR2006_KT449801.1        ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDRTL
                            ***:*******:*******:********:*******.**.***:****************

E2_IbH35_HM045786.1         MTQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKIDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_99659_KJ451624.1         MSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGGSSEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_181/25_L37661.3          MSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGDSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_S27_NC004162.2           LSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_SL15649_GU189061.1       MSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_LR2006_KT449801.1        MSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
                            ::*********** ********** * *** **********:******************

E2_IbH35_HM045786.1         LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_99659_KJ451624.1         LVPRNAEFGDRKGKVHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVIMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_181/25_L37661.3          LVPRNAELGDRKGKVHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_S27_NC004162.2           LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCMVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRSM
E2_SL15649_GU189061.1       LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_LR2006_KT449801.1        LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRNM
                            *******:******:*********** **************** **************.*

E2_IbH35_HM045786.1         GQEPNYHEEWVTHKKEVTLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQMSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_99659_KJ451624.1         GEEPNYQEEWVTHKKEIRLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_181/25_L37661.3          GEEPNYQEEWVTHKKEIRLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_S27_NC004162.2           GEEPNYQEEWVTHKKEVVLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSANGTAHGHPHEIILYYY
E2_SL15649_GU189061.1       GEEPNYQEEWVMHKKEVVLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_LR2006_KT449801.1        GEEPNYQEEWVMHKKEVVLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
                            *:****:**** ****: ************************:*:****************

E2_IbH35_HM045786.1         ELYPTMTVIIVSVASFVLLSMVGTAVGMCVCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLLCCVRT
E2_99659_KJ451624.1         ELYPTMTAVVLSVASFILLSMVGVAVGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
E2_181/25_L37661.3          ELYPTMTVVVVSVASFVLLSMVGVAVGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
E2_S27_NC004162.2           ELYPTMTVVVVSVASFILLSMVGMAVGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
E2_SL15649_GU189061.1       ELYPTMTVVVVSVATFILLSMVGMAVGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
E2_LR2006_KT449801.1        ELYPTMTVVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
                            *******.:::***:*:****** *.***:************************:**:**

E2_IbH35_HM045786.1         TKA
E2_99659_KJ451624.1         AKA
E2_181/25_L37661.3          AKA
E2_S27_NC004162.2           AKA
E2_SL15649_GU189061.1       AKA
E2_LR2006_KT449801.1        AKA
                            :**
```

Фиг. 15