

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038407**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.24

(21) Номер заявки
201791735

(22) Дата подачи заявки
2016.02.05

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **15153957.4**

(32) **2015.02.05**

(33) **EP**

(43) **2017.11.30**

(86) **PCT/EP2016/052556**

(87) **WO 2016/124768 2016.08.11**

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

(72) Изобретатель:
**Бранденбург Буррис, Вогелс Роналд,
Колкман Йост А., Фризен Роберт
Хайнц Эдвард (NL)**

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

(56) **WO-A1-2013007770**

EKIERT DAMIAN C ET AL.: "Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop", NATURE (LONDON), vol. 489, no. 7417, September 2012 (2012-09), pages 526-532+3pp, XP002742148, abstract, figures 1-4; tables 1, 2, page 531, last paragraph

WO-A2-2009121004

DAVIDE CORTI ET AL.: "A Neutralizing Antibody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins", SCIENCE, vol. 333, no. 6044, 12 August 2011 (2011-08-12), pages 850-856, XP002689150, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US; THE INSTITUTION OF ELECTRICAL ENGINEERS, STEVENAGE, GB, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1205669 [retrieved on 2011-07-28] abstract; page 851; figures 1-6

RICHARD H. GLAVEN ET AL.: "Linking Single Domain Antibodies that Recognize Different Epitopes on the Same Target", BIOSENSORS, vol. 2, no. 4, 1 February 2012 (2012-02-01), pages 43-56, XP055171796, DOI: 10.3390/bios2010043, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к мономерным и мультимерным связывающим молекулам, способным специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, при этом указанные штаммы содержат НА двух различных подтипов НА из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В. Связывающие молекулы предпочтительно также способны нейтрализовать по меньшей мере два штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способны нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способны специфично нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа В.

038407 B1

038407 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области медицины. В настоящем изобретении предусматриваются связывающие молекулы, в частности однодоменные антитела и мультидоменные антитела, связывающиеся с гемагглютинином вируса гриппа вирусов гриппа А и/или В. Предпочтительно связывающие молекулы также способны нейтрализовать вирусы гриппа А и/или В. В настоящем изобретении также предусматриваются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие однодоменные антитела и мультидоменные антитела, а также композиции, содержащие таковые. Настоящее изобретение дополнительно относится к диагностике, профилактике и/или лечению инфекции, вызванной вирусами гриппа А и/или гриппа В.

Введение

Сезонный вирус гриппа А является основной проблемой общественного здравоохранения, из-за которой ежегодно погибает более 250000 человек по всему миру и которая создает экономическое бремя для миллионов людей. Пандемический грипп, который возникает в случае появления нового вируса, и при этом он инфицирует людей по всему миру со слабым иммунитетом или без иммунитета, представляет собой еще большую угрозу для здоровья человека; например, в 1918 году пандемический "испанский грипп" стал причиной примерно 50 млн смертей. По-прежнему вызывает беспокойство высокопатогенный птичий грипп (HPAI), который продемонстрировал уровень смертности более 50% у инфицированных людей. Вирусы гриппа подтипов H5, а также H7 являются эндемическими для домашней птицы в некоторых частях мира. В настоящее время эти вирусы, вероятно, не способны легко передаваться от человека к человеку, однако новые данные касательно вируса птичьего гриппа H5 указывают на то, что достаточно лишь нескольких аминокислотных изменений для обеспечения распространения данного вируса посредством аэрозольной передачи в модельной системе *in vivo* млекопитающих.

На сегодняшний день вирусам гриппа В уделяется меньше внимания. Это может быть связано с тем фактом, что, в основном ограничиваясь в качестве хозяев людьми, для вирусов гриппа В отсутствуют большие резервуары возбудителя инфекции, которые являются ключевыми для возникновения пандемических штаммов вируса гриппа А. Тем не менее, совокупное влияние ежегодных эпидемий превышает влияние пандемий, и хотя уровни заболеваемости и смертности, связанные с гриппом В, ниже таковых, например, у вирусов H3N2, они, как правило, выше, чем таковые у вирусов H1N1.

Несмотря на то, что вакцины являются основой борьбы с инфекцией, вызванной вирусом гриппа, их своевременное применение представляет несколько технических проблем. Они включают (i) прогнозирование того, какие штаммы вирусов появятся и инфицируют популяцию человека, (ii) период задержки между возникновением нового штамма вируса и доступностью клинически одобренной вакцины, (iii) низкая иммуногенность в определенных группах пациентов, например у людей пожилого возраста, малолетних детей или людей с ослабленным иммунитетом и (iv) ограниченные возможности производства во всем мире.

Противовирусные лекарственные средства, такие как ингибиторы нейраминидазы осельтамивир и занамивир и ингибиторы M2 амантадин и римантадин, представляют собой важное дополнение к комплексу вариантов лечения как сезонного, так и пандемического гриппа. Тем не менее, данные лекарственные средства имеют ограниченную эффективность при введении на поздних стадиях инфекции, а широкое применение, вероятно, приводит к появлению устойчивых штаммов вирусов. Кроме того, применение осельтамивира у взрослых связано с нежелательными реакциями, такими как тошнота, рвота, психические эффекты и явления, связанные с почками.

Антитела представляют собой один из наиболее ранних классов защитных средств, и во время предыдущих пандемий гриппа успешно применяли пассивное переливание сыворотки от выздоравливающих пациентов. Тем не менее, данный подход имеет ограниченный потенциал для осуществления в мировом масштабе в связи с (i) ограниченным обеспечением соответствующих сывороток, (ii) высоким риском токсичности, (iii) большим разбросом характеристик от партии к партии, (iv) неопределенным дозированием и (v) сложностями введения.

Преимущества технологии рекомбинантных моноклональных антител сделали данную стратегию заслуживающей дальнейшего исследования, не в последнюю очередь по той причине, что могут быть получены и накоплены неограниченные количества защитных антител с целью обеспечения оперативной защиты при появлении пандемии. Для эффективности данной стратегии может потребоваться нейтрализующая активность таких антител в отношении совокупности различных подтипов вирусов. Это представляет собой основную проблему, поскольку белки вирусной оболочки вирусов гриппа, в частности гемагглютинин (HA), постоянно изменяются.

Гемагглютинин или HA представляет собой тримерный гликопротеин, который заякорен в вирусной оболочке вируса гриппа и имеет двойную функцию: он отвечает за связывание с рецепторами поверхности клетки-хозяина, содержащими сиаловую кислоту, а после поглощения он опосредует слияние вирусной и эндосомальной мембраны, что приводит к высвобождению вирусной РНК в цитозоль клетки. HA содержит крупный и вариабельный домен головки и меньший более консервативный стеблевой домен. Большинство нейтрализующих антител к HA распознают эпитопы в гипервариабельных областях в области, представляющей собой головку, и, таким образом, препятствуют связыванию с клетками-

хозяевами. Однако недавно были идентифицированы новые моноклональные антитела, которые связываются со стеблевой областью НА и препятствуют слиянию мембран (Corti et al., 2011; Dreyfus et al., 2012; Ekiert et al., 2009; Ekiert et al., 2011 и Ekiert et al., 2012; Kashyap et al., 2010; Krause et al., 2012; Lee et al., 2012; Sui et al., 2009; Tan et al., 2012; Throsby et al., 2008; Tsibane et al., 2012; Wang et al., 2010; Yoshida et al., 2009).

По меньшей мере, некоторые из этих нейтрализующих антител широкого спектра действия продемонстрировали беспрецедентный широкий спектр перекрестной реактивности, делая возможной нейтрализацию ими многих различных штаммов в пределах подтипа, филогенетической группы или даже между различными группами и подтипами вируса гриппа. Терапевтический и профилактический потенциал этих антител был продемонстрирован как в мышинной модели, так и в модели на хорьках, и некоторые из них на данный момент оцениваются в клинических испытаниях с участием людей. Тем не менее, эти моноклональные антитела также могут иметь некоторые неотъемлемые ограничения, которые представляют собой основную проблему для их широкого применения в предупреждении и/или лечении гриппа. Эти ограничения могут включать (i) необходимость парентерального введения; (ii) высокую стоимость изделий; (iii) неполное покрытие распространяющихся штаммов гриппа; (iv) низкую биодоступность в участке инфекции и (v) риск возникновения устойчивости к лекарственному средству.

Однодоменные антитела (sdAb) представляют собой фрагменты антител, состоящие из единственного антигенсвязывающего вариабельного домена. Данные фрагменты имеют несколько преимуществ по сравнению с обычными моноклональными антителами, в том числе (i) небольшой размер (15 кДа), (ii) малозатратное микробиологическое получение, (iii) простое конструирование в многовидовые форматы, (iv) высокая стабильность с возможностью поддержки путей введения, отличных от инъекционных, и/или (iv) возможность доступа к внутренним или скрытым эпитопам. Эти благоприятные свойства делают sdAb привлекательной альтернативой моноклональным антителам, в частности в области инфекционных заболеваний. В литературе были описаны нейтрализующие sdAb к нескольким различным вирусам, в том числе HIV, вирусу гепатита В, респираторно-синцитиальному вирусу, вирусу бешенства, FMDV, вирусу полиомиелита и ротавирусу (Vanlandschoot et al., 2011).

Связывающие НА sdAb, которые способны нейтрализовать вирус гриппа, также были описаны в литературе. Таким образом, в Hultberg et al. (2011) идентифицировано sdAb (Infl-C8) с нейтрализующей активностью в отношении многих вирусов H5N1. Димеры и тримеры Infl-C8 продемонстрировали улучшенную и расширенную активность в отношении вирусов H5N1. Тем не менее, перекрестную нейтрализацию вирусов гриппа PR8 (H1N1) или X47 (H3N2) не наблюдали.

В WO 2009/147248 раскрыто несколько sdAb, демонстрирующих гетеросубтипическую активность связывания в ELISA. Тем не менее, никакие из таких sdAb, за исключением одного, не были активными в анализе нейтрализации вируса. Это одно нейтрализующее sdAb, называемое IV146, продемонстрировало ограниченное связывание филогенетической группы 1 в ELISA и было способно нейтрализовать 2 различных вируса H5.

В Tillib et al. (2013) описано множество sdAb с нейтрализующей активностью в отношении штамма H5N2 A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 in vitro и in vivo.

В Hufton et al. (2014) идентифицировано несколько sdAb с перекрестно-субтипической нейтрализующей активностью в отношении вирусов H1, H2, H5 и/или H9. Тем не менее, ни одно из этих sdAb не было способно нейтрализовать H7N2. Димеризация одного из sdAb обеспечила повышение его активности в отношении H1, H2, H5 и H9, но не обеспечила в результате перекрестно-групповую нейтрализацию вирусов H7N2 или H3N2.

Таким образом, ни одно из мономерных или мультимерных sdAb, идентифицированных на сегодняшний день, не способно нейтрализовать все соответствующие сезонные (H1N1, H3N2 и В) и пандемические (например, H5N1 и H7N9) штаммы вируса гриппа. Учитывая тяжесть респираторного заболевания, вызванного вирусами гриппа А и гриппа В, а также сильное экономическое влияние сезонных эпидемий и постоянный риск пандемий, все еще существует потребность в новых эффективных ингибиторах с широким спектром активности в отношении вирусов гриппа А и В, которые можно применять в качестве лекарственных препаратов для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусматриваются новые однодоменные антитела (sdAb), способные специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, при этом указанные по меньшей мере два штамма вируса гриппа содержат НА двух различных подтипов из филогенетической группы 2; или способные специфично связываться по меньшей мере с одним штаммом гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере одним штаммом вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способные специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В. В определенных вариантах осуществления sdAb также способны нейтрализовать по меньшей мере два различных штамма вируса гриппа А, содержащих два различных подтипа НА из филогенетической группы 2; или по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической

группы; или по меньшей мере один штамм вируса гриппа В.

В настоящем изобретении дополнительно предусматриваются так называемые мультидоменные антитела, т.е. связывающие молекулы, содержащие по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, более предпочтительно по меньшей мере четыре или еще более предпочтительно по меньшей мере пять вышеописанных однодоменных антител. В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела способны нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 2. В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела способны нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 1, по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 2 и по меньшей мере один штамм вируса гриппа В, предпочтительно по меньшей мере один штамм вируса гриппа В линии В/Yamagata и по меньшей мере один штамм вируса гриппа линии В/Victoria. В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела способны нейтрализовать вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н1 (такие как штаммы вируса гриппа Н1N1), вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н3 (такие как штаммы вируса гриппа Н3N2), вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н5 (такие как штаммы вируса гриппа Н5N1), и вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н7 (такие как штаммы вируса гриппа Н7N9), и по меньшей мере один вирус гриппа В, предпочтительно по меньшей мере один штамм вируса гриппа В линии В/Yamagata и по меньшей мере один штамм вируса гриппа линии В/Victoria.

Кроме того, в настоящем изобретении предусматриваются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие sdAb или мультидоменные антитела, а также векторы и клетки-хозяева, содержащие указанные молекулы нуклеиновых кислот.

В настоящем изобретении также предусматриваются (фармацевтические) композиции, содержащие одно или несколько из sdAb, мультидоменных антител, молекул нуклеиновых кислот и/или векторов, описанных в данном документе.

В соответствии с настоящим изобретением предусматриваются новые молекулы, связывающие гемагглютинин вируса гриппа. Связывающие молекулы могут представлять собой однодоменные антитела или мультидоменные антитела. По меньшей мере, некоторые из связывающих молекул по настоящему изобретению отличаются тем, что они являются перекрестно-нейтрализующими между филогенетическими группами, т.е. способны связываться по меньшей мере с одним штаммом вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере одним штаммом вируса гриппа А из филогенетической группы 2 и нейтрализовать их. В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы способны специфично связываться по меньшей мере с одним штаммом вируса гриппа В, предпочтительно по меньшей мере одним штаммом вируса гриппа В линии В/Yamagata и по меньшей мере одним штаммом вируса гриппа линии В/Victoria, и нейтрализовать их. Связывающие молекулы и последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению подходят для применения в качестве диагностических, профилактических и/или лечебных средств при инфекциях, вызванных вирусом гриппа, независимо от подтипа возбудителя гриппа.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показан анализ иммунного ответа у ламы № 3 и № 4 с помощью ELISA.

На фиг. 2 показана *in vivo* эффективность SD1016, SD1038 и SD1045 в отношении летального заражения вирусом A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 0,5 мг/кг sdAb за день до заражения (в день 0).

На фиг. 3 показана *in vivo* эффективность SD1036, SD1046 и SD1048 в отношении летального заражения вирусом A/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 5 или 0,5 мг/кг sdAb за день до заражения (в день 0).

На фиг. 4 показана *in vivo* эффективность SD1083 и SD1084 в отношении летального заражения вирусом B/Florida/4/2006. Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 5 или 0,5 мг/кг sdAb за день до заражения (в день 0).

На фиг. 5 показана *in vivo* эффективность SD1038, MD1211, MD1212 или смеси 1:1 SD1038 и SD1036 в отношении летального заражения вирусом A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных однодоменным или мультидоменным антителом за день до заражения (в день 0).

На фиг. 6 показана *in vivo* эффективность SD1036, MD1211, MD1212 или смеси 1:1 SD1036 и SD1038 в отношении летального заражения вирусом A/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных однодоменным или мультидоменным антителом за день до заражения (в день 0).

На фиг. 7 показана *in vivo* эффективность SD1038 и MD1212 в отношении летального заражения вирусом A/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 5, 1,7, 0,6 или 0,2 мг/кг однодоменного или мультидоменного антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 8 показана *in vivo* эффективность MD1221, MD1222 и MD1224 в отношении летального заражения вирусом B/Florida/4/2006. Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей,

обработанных 5 или 0,5 мг/кг мультидоменного антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 9 показана *in vivo* эффективность MD1301, MD2601 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 3 мг/кг мультидоменного антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 10 показана *in vivo* эффективность MD1301, MD2601 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 0,2, 0,05 или 0,01 мг/кг мультидоменного антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 11 показана *in vivo* эффективность MD2617 в отношении летального заражения вирусом A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных интраназально (вверху) или внутривенно (внизу) с помощью MD2617 за день до заражения (в день 0).

На фиг. 12 показана *in vivo* эффективность MD2617 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом B/Florida/4/2006 (вверху) или A/Hong Kong/1/1968-MA (внизу). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных интраназально или внутривенно (мультидоменным) антителом за день до заражения (в день 0).

На фиг. 13 показана *in vivo* эффективность MD2407, MD3606 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом B/Florida/4/2006. Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 0,02, 0,1 или 0,5 мг/кг (мультидоменного) антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 14 показана *in vivo* эффективность MD3606 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом B/Florida/4/2006. Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 0,2, 1 или 5 мг/кг (мультидоменного) антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 15 показана *in vivo* эффективность MD2407, MD3606 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом B/Florida/4/2006. Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 0,02, 0,1 или 0,5 мг/кг (мультидоменного) антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 16 показана *in vivo* эффективность MD3606 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом A/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 0,6, 1,7 или 5 мг/кг (мультидоменного) антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 17 показана *in vivo* эффективность MD2407, MD3606 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 0,01, 0,05 или 0,25 мг/кг (мультидоменного) антитела за день до заражения (в день 0).

На фиг. 18 показана *in vivo* эффективность MD3606 и CR9114 в отношении летального заражения вирусом A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1). Показаны кривые выживания (слева) и потери веса (справа) мышей, обработанных 0,6, 1,7 или 5 мг/кг (однодоменного) антитела за день до заражения (в день 0).

Определения

Ниже даны некоторые определения терминов, используемых в настоящем изобретении.

Термин "связывающая молекула", используемый в данном документе, относится как к однодоменным антителам (мономерные связывающие молекулы), так и к мультидоменным антителам (мультимерные связывающие молекулы) в соответствии с настоящим изобретением.

В контексте данного документа однодоменное антитело (sdAb) представляет собой связывающую молекулу, состоящую из одного мономерного вариабельного домена антитела, который специфично связывается с антигеном или эпитопом независимо от других V-областей или доменов. Однодоменные антитела известны из уровня техники, и их обычно получают из природных антител, содержащих "только тяжелую цепь", т.е. антител с тяжелой цепью, лишенных легких цепей. Такие антитела, содержащие только тяжелую цепь, могут быть получены от видов семейства Camelidae, например у верблюда, ламы, одногорбого верблюда или альпаки (их также называют антителами верблюдовых). Вариабельная область, полученная из указанного антитела, содержащего только тяжелую цепь, в целом известна как VHH-домен или однодоменное антитело (sdAb). В контексте данного документа однодоменное антитело также относится к выделенному одному вариабельному домену (VL или VH) из обычного иммуноглобулина, содержащего две тяжелые цепи и две легкие цепи. Данный иммуноглобулин преимущественно является человеческим, однако может включать также иммуноглобулины от других видов млекопитающих, в том числе грызунов.

Выражение "мультидоменное антитело", используемое в данном документе, относится к связывающей молекуле, содержащей по меньшей мере два однодоменных антитела, связанных между собой либо непосредственно, либо с помощью линкерной последовательности.

Термин "подтип вируса гриппа" в отношении вирусов гриппа А относится к штаммам вируса гриппа А, которые характеризуются различными комбинациями вирусных поверхностных белков, гемагглютинина (H) и нейраминидазы (N). Подтипы вируса гриппа А можно называть по числу их H, как, например, "вирус гриппа, содержащий НА подтипа H1 или H3" или "вирус гриппа H1", "вирус гриппа H3", или по комбинации числа H и числа N, как, например, "подтип H3N2 вируса гриппа" или "H5N1". Термин "подтип" вируса гриппа включает, в частности, все отдельные "штаммы" вируса гриппа в пределах дан-

ного подтипа, которые обычно образуются в результате мутаций и характеризуются различными патогенными профилями, и включают природные изоляты, а также искусственные мутанты или реассортанты и т.п. Такие штаммы также можно называть различными "изолятами" подтипа вируса. Соответственно в контексте данного документа термины "штаммы" и "изоляты" можно использовать взаимозаменяемо.

Подтипы вируса гриппа А можно дополнительно классифицировать с помощью ссылки на их филогенетическую группу. Филогенетический анализ показал, что гемагглютинины вируса гриппа подразделяются на две основные группы: среди прочего, на подтипы Н1, Н2, Н5 и Н9 в филогенетической группе 1 (вирусы гриппа "группы 1") и подтипы Н3, Н4, Н7 и Н10 в филогенетической группе 2 (вирусы гриппа "группы 2").

Антигенная изменчивость НА в штаммах вируса гриппа типа В меньше, чем наблюдаемая в штаммах типа А. Два генетически и антигенно различающихся подтипа или "линии" вируса гриппа В, циркулирующие у людей, представлены линиями В/Yamagata/16/88 (также называемой В/Yamagata) и В/Victoria/2/87 (В/Victoria). В контексте данного документа штаммы вируса гриппа В называются штаммами вируса гриппа, полученными из "линии В/Yamagata" или "линии В/Victoria".

Термин "нейтрализующие", используемый в данном документе в отношении связывающих молекул по настоящему изобретению, относится к связывающим молекулам, которые подавляют репликацию вируса гриппа, *in vitro* и/или *in vivo*, у субъекта, независимо от механизма, с помощью которого достигается нейтрализация. Таким образом, нейтрализация также может достигаться путем ингибирования контакта или адгезии вируса с поверхностью клетки, или путем ингибирования слияния вирусной и клеточной мембран после контакта вируса с клеткой-мишенью, или путем ингибирования выхода вируса из инфицированных клеток и т.п. Выражения "осуществление перекрестной нейтрализации" или "перекрестная нейтрализация", используемые в данном документе в отношении связывающих молекул по настоящему изобретению, относятся к способности связывающих молекул по настоящему изобретению нейтрализовать различные подтипы вирусов гриппа А и/или В.

В отношении связывающих молекул по настоящему изобретению выражение "(иммуно)специфичное связывание" относится к связывающим молекулам, которые связываются с эпитопами представляющего интерес белка, но которые по сути не распознают и не связывают другие молекулы в образце, содержащем смесь антигенных биологических молекул. Связывание может быть опосредовано ковалентными или нековалентными взаимодействиями или комбинацией и тех, и других.

Термины "грипп" или "заболевание, вызванное вирусом гриппа", используемые в данном документе, относятся к патологическому состоянию, возникающему в результате инфицирования клетки или субъекта вирусом гриппа А или В. В конкретных вариантах осуществления данный термин относится к респираторной болезни, вызываемой вирусом гриппа А или В. Термин "инфекция, вызванная вирусом гриппа", используемый в данном документе, означает инвазию, размножение и/или наличие вируса гриппа в клетке или у субъекта.

Подробное описание фигур

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предусматриваются новые однодоменные антитела (sdAb), способные специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, содержащих НА двух различных подтипов из филогенетической группы 2, т.е. sdAb, способные специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух различных штаммов вируса гриппа А, при этом указанные штаммы содержат НА двух различных подтипов НА из филогенетической группы 2. Кроме того, предусматриваются sdAb, способные связываться с НА по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и с НА по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2. Кроме того, предусматриваются sdAb, способные специфично связываться с НА по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В. Однодоменные антитела, способные специфично связываться с НА двух различных подтипов штаммов вируса гриппа А из филогенетической группы 2 или способные связываться с НА штаммов вируса гриппа А как из филогенетической группы 1 (таких как вирусы гриппа НА подтипа Н1, Н2 и/или Н5), так и филогенетической группы 2 (таких как вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н3, Н7 и/или Н10), ранее не были описаны. Кроме того, sdAb, способные специфично связываться с НА вирусов гриппа В, также ранее не были описаны.

sdAb по настоящему изобретению связываются с консервативными, подлежащими нейтрализации эпитопами в НА. В определенных вариантах осуществления sdAb связываются с эпитопом в стеблевой области белка НА вируса гриппа А или В. В других вариантах осуществления sdAb связываются с эпитопом в области, представляющей собой головку белка НА. В определенных вариантах осуществления sdAb связывается с эпитопом в области, представляющей собой головку белка НА вирусов гриппа В.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления sdAb также способны нейтрализовать по меньшей мере два штамма вируса гриппа А, содержащих НА двух различных подтипов из филогенетической группы 2. В определенных вариантах осуществления sdAb способны нейтрализовать предпочтительно по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 1 (например, такой как вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н1 или Н5) и по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 2 (например, такой как вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н3 или

H7); или по меньшей мере один штамм вируса гриппа В, предпочтительно по меньшей мере один штамм вируса гриппа В линии В/Yamagata и по меньшей мере один штамм вируса гриппа линии В/Victoria.

В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело по настоящему изобретению представляет собой VHH-домен верблюдовых, т.е. вариабельный домен так называемого (содержащего только тяжелую цепь) антитела верблюдовых. В дополнительных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой гуманизированный VHH-домен верблюдовых. Для гуманизации однодоменных антител верблюдовых требуется введение и мутагенез ограниченного количества аминокислот в одной полипептидной цепи. Это отличается от гуманизации scFv, Fab, (Fab) 2 и IgG, для которой требуется введение аминокислотных изменений в двух цепях, легкой и тяжелой цепях, и сохранение сборки обеих цепей. Способы гуманизации VHH-доменов верблюда известны из уровня техники, как, например, описано в WO 2008/020079, WO 2008/142164, WO 2010/139808. Гуманизация sdAb по настоящему изобретению описана в примере 11.

В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело по настоящему изобретению содержит:

одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 227, 228 и 229;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 230, 231 и 232;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 233, 234 и 235;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 236, 237 и 238;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 239, 240 и 241;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 242, 243 и 244;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 245, 246 и 247;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 248, 249 и 250;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 251, 252 и 253;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 254, 255 и 256;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 257, 258 и 259;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 260, 261 и 262;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 263, 264 и 265;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 266, 267 и 268;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 269, 270 и 271;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 272, 273 и 274;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 275, 276 и 277;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 278, 279 и 280;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 281, 282 и 283;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 284, 285 и 286;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 287, 288 и 289;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 290, 291 и 292;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 293, 122 и 123;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 124, 125 и 126;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 127, 128 и 129;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 130, 131 и 132;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 133, 134 и 135;
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 136, 137 и 138; или
 одну или несколько последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 139, 140 и 141.

Термин "определяющие комплементарность области" (CDR), используемый в данном документе, означает последовательности в вариабельных областях связывающих молекул, которые обычно вносят большой вклад в антигенсвязывающий участок, который комплементарен по форме и распределению зарядов эпитопу, распознаваемому на антигене. CDR-области могут быть специфичными по отношению к линейным эпитопам, прерывистым эпитопам или конформационным эпитопам белков или фрагментов белков, либо как присутствующих на белке в их нативной конформации, либо в некоторых случаях как присутствующих на белках, которые денатурированы, например с помощью солиubilизации в SDS.

В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело выбрано из группы, состоящей из:

- однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO:227, область CDR2 под SEQ ID NO: 228 и область CDR3 под SEQ ID NO: 229;
- однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO:230, область CDR2 под SEQ ID NO: 231 и область CDR3 под SEQ ID NO: 232;
- однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO:233, область CDR2 под SEQ ID NO: 234 и область CDR3 под SEQ ID NO: 235;
- однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO:236, область CDR2 под SEQ ID NO: 237 и область CDR3 под SEQ ID NO: 238;
- однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO:239, область CDR2 под SEQ ID NO: 240 и область CDR3 под SEQ ID NO: 241;
- однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO:242, область CDR2 под

бретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-29 или гомологичной аминокислотной последовательности. Гомологичная аминокислотная последовательность по настоящему изобретению, применяемая в данном документе, может содержать добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот, которые по сути не изменяют функциональные характеристики связывающих молекул по настоящему изобретению. Если гомологичная последовательность указывает на идентичность аминокислотной последовательности, то это означает, что последовательность, которая предусматривает высокую идентичность аминокислотной последовательности (идентичную аминокислотной последовательности более чем на 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98%) исходной последовательности.

В определенных вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в аминокислотных последовательностях, описанных в данном документе, могут быть подвергнуты мутации, т.е. замещены другой аминокислотой. Такие мутации могут быть введены для предотвращения возникновения посттрансляционных модификаций. Наиболее преобладающие модификации включают протеолизис, гликозилирование, окисление метионина и дезаминирование аспарагиновых и глутаминовых осадков. Другие модификации включают образование пироглутамата, изомеризацию аспартата и окисление триптофана. Следующие аминокислотные остатки и мотивы последовательностей являются восприимчивыми к посттрансляционной модификации, а, следовательно, их можно изменять путем сайт-направленного мутагенеза: N-концевая глутамовая кислота или глутамин, мотив N-гликозилирования Asn-Xxx-Ser/Thr, доступные для растворителя остатки метионина или триптофана, участок протеолитического отщепления Asp-Pro, мотивы деаминирования Asn-Gly и Gln-Gly и/или мотив изомеризации Asp Asp-Gly.

В определенных вариантах осуществления sdAb по настоящему изобретению является гуманизированным. Таким образом, в определенных вариантах осуществления sdAb содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146-226 и 340.

В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 177-187 и SEQ ID NO: 340; SEQ ID NO: 17 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146-156; SEQ ID NO: 20 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 157-176; SEQ ID NO: 24 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 188-197; SEQ ID NO: 25 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 198-203; и SEQ ID NO: 27 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 204-226.

В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 340, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 221.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения предусматриваются так называемые мультидоменные антитела, т.е. связывающие молекулы, содержащие по меньшей мере два вышеописанных однодоменных антитела. Например, C-конец первого однодоменного антитела может быть связан с N-концом следующего однодоменного антитела с образованием димерной связывающей молекулы. В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела содержат по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять вышеописанных однодоменных антител, с образованием мультимера, такого как тример, тетрамер, пентамер и т.д. Связанные sdAb могут быть одинаковыми или различными sdAb, т.е. sdAb с различными аминокислотными последовательностями и специфичностью в отношении эпитопов.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела представляют собой одноцепочечные молекулы. В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела представляют собой двухцепочечные молекулы, т.е. содержат по меньшей мере две цепи, каждая из которых предусматривает по меньшей мере одно однодоменное антитело. Две цепи могут быть идентичны или могут отличаться.

Однодоменные антитела могут быть связаны с образованием каких-либо из мультидоменных антител, раскрытых в данном документе, с применением каких-либо способов, известных из уровня техники. Таким образом, однодоменные антитела могут быть связаны посредством химической связи или могут быть связаны между собой либо непосредственно, либо с помощью коротких полипептидных линкеров. Такая линкерная последовательность может представлять собой природную последовательность или последовательность, не встречающуюся в природе. Линкерная последовательность предпочтительно обеспечивает достаточную гибкость для мультидоменного антитела и в то же время является устойчивой к протеолитическому расщеплению.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере два однодоменных антитела генетически слиты посредством пептидных линкеров. Таким образом, однодоменные антитела генетически слиты на уровне ДНК путем формирования полинуклеотидной конструкции (или последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующей полную полипептидную конструкцию, т.е. связывающей молекулы, содержащей два или более однодоменных антител.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере два однодоменных антитела связаны с помощью линкерной последовательности, содержащей от 1 до 100 аминокислот, предпочтительно от 1 до 80 аминокислот, или от 1 до 60 аминокислот, или от 10 до 60 аминокислот. Примеры линкеров включают без ограничения линкерные последовательности в таблице 15. Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 142-145.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела содержат по меньшей мере два sdAb в соответствии с настоящим изобретением. По меньшей мере два sdAb могут быть выбраны из табл. 14 и/или табл. 40. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере два sdAb выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-29 и SEQ ID NO: 146-226. По меньшей мере два sdAb могут быть одинаковыми (гомомультимер) или могут отличаться (гетеромультимер).

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела содержат по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, более предпочтительно по меньшей мере четыре sdAb, выбранных из группы, состоящей из

- a) однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO: 275, область CDR2 под SEQ ID NO: 276 и область CDR3 под SEQ ID NO: 277;
- b) однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO: 284, область CDR2 под SEQ ID NO: 285 и область CDR3 под SEQ ID NO: 286;
- c) однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO: 124, область CDR2 под SEQ ID NO: 125 и область CDR3 под SEQ ID NO: 126;
- d) однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO: 127, область CDR2 под SEQ ID NO: 128 и область CDR3 под SEQ ID NO: 129;
- e) однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO: 263, область CDR2 под SEQ ID NO: 264 и область CDR3 под SEQ ID NO: 265; и
- f) однодоменного антитела, содержащего область CDR1 под SEQ ID NO: 133, область CDR2 под SEQ ID NO: 134 и область CDR3 под SEQ ID NO: 135.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, более предпочтительно по меньшей мере четыре sdAb, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 177-187 и SEQ ID NO: 340; SEQ ID NO: 17 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146-156; SEQ ID NO: 20 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 157-176; SEQ ID NO: 24 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 188-177; SEQ ID NO: 25 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 198-203; и SEQ ID NO: 27 или ее гуманизированный вариант, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 204-226.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30-73.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела по настоящему изобретению способны нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 1 (например, такой как вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н1 или Н5) и по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 2 (например, такой как вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н3 и/или Н7). В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела по настоящему изобретению способны нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 1 (например, такой как вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н1 и/или Н5) и по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 2 (например, такой как вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н3 и/или Н7) и по меньшей мере один штамм вируса гриппа В, предпочтительно по меньшей мере один штамм вируса гриппа В линии В/Yamagata и по меньшей мере один штамм вируса гриппа линии В/Victoria.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела способны нейтрализовать вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н1 (как, например, штаммы вируса гриппа Н1N1), вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н3 (как, например, штаммы вируса гриппа Н3N2), вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н5 (как, например, штаммы вируса гриппа Н5N1), вирусы гриппа, содержащие НА подтипа Н7 (как, например, штаммы вируса гриппа Н7N9), и по меньшей мере один вирус гриппа В, предпочтительно по меньшей мере один штамм вируса гриппа В линии В/Yamagata и по меньшей мере один штамм вируса гриппа линии В/Victoria.

Таким образом, мультидоменные антитела по настоящему изобретению можно соответствующим образом применять для предупреждения и/или лечения инфекций, вызванных вирусом гриппа, даже независимо от подтипа возбудителя гриппа.

Было показано, что в соответствии с настоящим изобретением перекрестно нейтрализующие мультидоменные антитела по настоящему изобретению предоставляют несколько преимуществ по сравнению

с другими небольшими и большими противогриппозными молекулами. Таким образом, аффинность и эффективность мультидоменных антител, а также спектр нейтрализации превосходят аффинность, эффективность и спектр нейтрализации опубликованных нейтрализующих Ab широкого спектра действия (bnAbs), нацеленных на HA вируса гриппа, как, например, CR9114 (WO 2013/007770) и FI6v3 (Corti et al., 2011). Кроме того, в случае мультидоменных антител, нацеленных на несколько независимых эпитопов, подлежащих нейтрализации, наблюдается меньшая тенденция к развитию устойчивости штаммов вируса гриппа к лекарственным средствам по сравнению с CR9114 и FI6v3.

Таким образом, как описано в данном документе, в настоящем изобретении предусматриваются новые молекулы, связывающие вирус гриппа, и перекрестно нейтрализующие связывающие молекулы. Связывающие молекулы могут быть мономерными, т.е. представлять собой однодоменные антитела, или мультимерными, т.е. представлять собой мультидоменные антитела. Связывающие молекулы по настоящему изобретению связываются со своей мишенью с высокой аффинностью и специфичностью. В этом состоит отличие от низкомолекулярных лекарственных средств, таких как противовирусные препараты, которые зачастую демонстрируют нецелевое связывание, что приводит в результате к нежелательным побочным эффектам. Кроме того, связывающие молекулы по настоящему изобретению связываются с рядом эпитопов HA, некоторые из которых недоступны для обычных антител. HA вируса гриппа содержит множество участков гликозилирования как в области, представляющей собой головку, так и в стеблевой области. Углеводы, присоединенные в данных участках, делают некоторые части на молекуле HA недоступными для обычных антител. Меньшие связывающие молекулы по настоящему изобретению сохраняют способность нацеливаться на эти потенциально функционально важные эпитопы. Кроме того, связывающие молекулы по настоящему изобретению стабильны в широком диапазоне экстремальных условий. Как правило, они являются устойчивыми к повышенным температурам (до 100°C), экстремальным значениям pH, денатурирующим средствам и протеолитическому расщеплению. Благоприятная стабильность связывающих молекул может обеспечивать продукты, которые можно хранить вне холодильной цепи и которые имеют более длительный срок хранения, чем другие лекарственные средства на основе белка, такие как моноклональные антитела. Кроме того, все связывающие молекулы по настоящему изобретению представляют собой отдельные белки, которые можно получать и очищать, следуя только одному способу.

Как правило, связывающие молекулы в соответствии с настоящим изобретением связываются с HA вируса гриппа А группы 1 (таким как H1N1), и/или вируса гриппа А группы 2 (таким как H3N2), и/или вируса гриппа В и/или его фрагментами с константой аффинности (K_d -значение) ниже $1,0 \times 10^{-6}$ М, $1,0 \times 10^{-7}$ М, предпочтительно ниже $1,0 \times 10^{-8}$ М, более предпочтительно ниже $1,0 \times 10^{-9}$ М. Константы аффинности можно измерять, например, с применением поверхностного плазмонного резонанса, например с применением системы BIACORE (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция) или так, как описано в примере 8.

В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы проявляют нейтрализующую активность в отношении вирусов гриппа А и/или В. В определенном варианте осуществления связывающие молекулы по настоящему изобретению обеспечивают предотвращение инфицирования клеток-хозяев вирусом А или В по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 10% по сравнению с инфицированием клеток-хозяев указанным вирусом гриппа в отсутствие указанных связывающих молекул. Например, нейтрализующую активность можно измерить так, как описано в данном документе. Альтернативные анализы, с помощью которых измеряют нейтрализующую активность, описаны, например, в WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva: World Health Organisation, 2005, version 2002.5. Как правило, связывающие молекулы в соответствии с настоящим изобретением обладают нейтрализующей активностью, составляющей 1000 нМ или меньше, предпочтительно 100 нМ или меньше, более предпочтительно нейтрализующей активностью, составляющей 10 нМ или меньше, еще более предпочтительно 1 нМ или меньше, которую измеряют в анализе нейтрализации вируса (VNA) *in vitro*, например так, как описано в примерах.

В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы (то есть однодоменные антитела или мультидоменные антитела) дополнительно содержат Fc-концевую часть. Таким образом, в определенных вариантах осуществления вышеописанные связывающие молекулы связаны с Fc-фрагментом антитела, предпочтительно антитела человека, например Fc-фрагментом антитела к IgG человека, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgG4. В соответствии с настоящим изобретением мономерные или мультимерные молекулы, описанные в данном документе, могут быть генетически слиты с Fc-фрагментом либо непосредственно, либо с помощью линкера. В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы связаны с Fc-фрагментом с помощью линкерной последовательности, содержащей от 1 до 100 аминокислот, предпочтительно от 1 до 80 аминокислот, или от 1 до 60 аминокислот, или

от 10 до 60 аминокислот. Примеры линкеров включают без ограничения линкерные последовательности в табл. 15. Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 142-145. В определенных вариантах осуществления sdAb или мультидоменное антитело генетически слиты с С-концом Fc-фрагмента. В дополнительных вариантах осуществления однодоменное антитело или мультидоменное антитело слиты как с N-, так и с С-концом Fc-фрагмента.

В определенных вариантах осуществления Fc-фрагмент сконструирован так, что он характеризуется минимальными эффекторными функциями. Fc-фрагменты с минимальной эффекторной функцией и сохраненным временем полужизни описаны в уровне техники и включают, например, IgG2, негликозилированный IgG1 (IgG1 agly), IgG4 с заменами S228P/L234A/L235A (IgG4 ProAlaAla), IgG2 с изменениями H268Q/309L/A330S/P331S (IgG2m4) и Fc-вариант IgG2, обозначенный как IgG2σ, содержащий замены V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S. Что касается мутантных версий IgG4, то определенная аффинность к FcγR была устранена с помощью замен L234A/L245A.

В определенных вариантах осуществления Fc-фрагмент сконструирован так, что он характеризуется усиленными эффекторными функциями. Таким образом, связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть сконструированы с усилением опосредованных Fc эффекторных функций, которые, как было показано в доклинических моделях инфекции, вызванной вирусом гриппа, способствуют эффективности лекарственного средства. В уровне техники описаны несколько мутаций в домене CH2 IgG1 человека, связанные с усиленной эффекторной функцией. Такие мутации включают без ограничения мутацию по аланину в положении 333, которая обеспечивает повышение как ADCC, так и CDC, тройной мутант (S239D/I332E/A330L) с более высокой аффинностью к FcγRIIIa и более низкой аффинностью к FcγRIIb, что приводит в результате к повышению ADCC, и еще один тройной мутант (S239D/I332E/G236A) с улучшенной аффинностью к FcγRIIIa и соотношением FcγRIIIa/FcγRIIb, что опосредует усиленный фагоцитоз. Другие мутации в Fc, влияющие на эффекторные функции, были описаны в литературе, например Strohl, 2009. В определенных вариантах осуществления Fc-фрагмент сконструирован так, что он характеризуется увеличенным временем полужизни в сыворотке. Несколько сконструированных Fc-остовов с увеличенным временем полужизни в сыворотке известны из уровня техники. Эти Fc-варианты включают без ограничения Fc hIgG1 с мутациями M252Y/S254T/T256E (YTE), Fc hIgG1 или hIgG2, несущий мутации T250Q/M428L (QL), Fc hIgG1 с мутацией N434A, Fc hIgG1 с мутациями T307A/E380A/N434A (AAA) или Fc hIgG1 с заменами M428L/N434S (LS) (Kuo et al., 2011). В дополнительных вариантах осуществления связывающие молекулы (то есть однодоменные антитела или мультидоменные антитела в соответствии с настоящим изобретением) генетически слиты с сывороточным альбумином человека или однодоменным антителом, связывающимся с сывороточным альбумином. В других вариантах осуществления однодоменные антитела или мультидоменные антитела в соответствии с настоящим изобретением химически конъюгированы с PEG. Таким образом, связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть сконструированы так, что они характеризуются периодами полужизни в сыворотке в диапазоне от, например, всего нескольких часов до нескольких недель или даже месяцев. Это открывает возможность лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа, с помощью однократной дозы вместо схемы 2х в сутки, применяемой в настоящее время для ингибиторов нейраминидазы, таких как осельтамивир и занамивир.

В дополнительных вариантах осуществления вышеописанные однодоменное антитело или мультидоменное антитело могут быть слиты с Fc-концевой частью, предпочтительно Fc-концевой частью, сконструированной для содействия образованию гетеродимерной молекулы с Fc. Мутации, способствующие Fc-гетеродимеризации, описаны в уровне техники (Klein et al., 2012). В определенных вариантах осуществления мутации, способствующие Fc-гетеродимеризации, представляют собой мутации "выступы-вопадины", описанные в EP 0812357 B1 и EP 0979281 B1.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат по меньшей мере одну цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-107, SEQ ID NO: 110-121 и SEQ ID NO: 293-339.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела содержат две цепи, при этом аминокислотные последовательности двух цепей идентичны. В определенных вариантах осуществления две цепи содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74-105 и SEQ ID NO: 293-298. В определенных вариантах осуществления две аминокислотные цепи содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 293-298.

В определенных вариантах осуществления мультидоменные антитела содержат две различные аминокислотные цепи. В определенных вариантах осуществления две различные аминокислотные цепи выбраны из группы, состоящей из

одной цепи, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 299, и одной цепи, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 300;

одной цепи, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 301, и одной цепи, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 302;

кислотную последовательность.

Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением относится к полимерной форме нуклеотидов и включает РНК, mRNA, кДНК, геномную ДНК и синтетические формы и сочетания вышеуказанных полимеров. Нуклеотид относится к рибонуклеотиду, дезоксинуклеотиду или модифицированной форме любого типа нуклеотида. Термин также включает одно- и двухцепочечные формы ДНК. Специалист в данной области техники поймет, что функциональные варианты данных молекул нуклеиновых кислот также предусматриваются как часть настоящего изобретения. Функциональные варианты представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, которые могут непосредственно транслироваться с помощью стандартного генетического кода с получением аминокислотной последовательности, идентичной транслированной с исходных молекул нуклеиновых кислот.

В предпочтительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающие молекулы в соответствии с настоящим изобретением, являются кодон-оптимизированными для экспрессии в дрожжевых клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки человека. Способы оптимизации по кодонам известны или были описаны ранее (например, WO 96/09378). Последовательность считается оптимизированной по кодонам, если по меньшей мере один кодон, не являющийся предпочтительным, по сравнению с последовательностью дикого типа замещен кодоном, который является более предпочтительным. В данном документе кодон, не являющийся предпочтительным, представляет собой кодон, который используется менее часто в организме, чем другой кодон, кодирующий такую же аминокислоту, и кодон, являющийся более предпочтительным, представляет собой кодон, который используется более часто в организме, чем кодон, не являющийся предпочтительным. Частоту использования кодонов для конкретного организма можно найти в таблицах частоты использования кодонов, таких как на сайте <http://www.kazusa.or.jp/codon>.

Предпочтительно более одного кодона, не являющегося предпочтительным, предпочтительно большинство или все кодоны, не являющиеся предпочтительными, замещают кодонами, которые являются более предпочтительными. Предпочтительно наиболее часто используемые кодоны в организме используют в кодон-оптимизированной последовательности. Как правило, замещение предпочтительными кодонами приводит к более высокой экспрессии.

Специалисту в данной области также будет понятно, что несколько различных молекул нуклеиновых кислот могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области могут с помощью традиционных методик проводить нуклеотидные замены, которые не влияют на аминокислотную последовательность, кодируемую молекулами нуклеиновых кислот, для отражения частоты использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором полипептиды будут экспрессироваться. Следовательно, если конкретно не указано иное, то выражение "последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Последовательности нуклеиновых кислот можно клонировать с помощью стандартных методик молекулярной биологии или образовывать *de novo* путем синтеза ДНК, который можно осуществлять с помощью стандартных процедур с участием компаний, предоставляющих услуги в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScript, Life Technologies, Eurofins).

В настоящем изобретении также предусматриваются векторы, содержащие по меньшей мере одну вышеописанную последовательность нуклеиновой кислоты. Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, в которую может быть вставлена вторая молекула нуклеиновой кислоты для введения хозяину, где она будет реплицироваться и в некоторых случаях экспрессироваться. Другими словами, вектор способен транспортировать молекулу нуклеиновой кислоты, с которой он был связан. Термин "вектор", используемый в данном документе, охватывает клонирующие векторы, а также векторы экспрессии. Определенные векторы способны к автономной репликации в хозяине, которому они введены (например, векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, могут реплицироваться в бактериях). Другие векторы можно встроить в геном хозяина после введения в клетку-хозяина, и, таким образом, они реплицируются наряду с геномом хозяина. Векторы в соответствии с настоящим изобретением легко могут быть получены с помощью способов, известных специалисту в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления предусматриваются векторы, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, функционально связанные с одной или несколькими регулируемыми экспрессию последовательностями нуклеиновых кислот. Выражение "регулирующая экспрессию последовательность нуклеиновой кислоты", используемое в данном документе, относится к последовательностям нуклеиновых кислот, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности и/или затрагивающим такую экспрессию, у конкретного организма-хозяина. Последовательности нуклеиновой кислоты, регулирующие экспрессию, такие как, среди прочих, подходящие последовательности для инициации, терминции транскрипции, промоторные, энхансерные последовательности; репрессорные или активаторные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую mRNA; последовательности,

которые повышают эффективность трансляции (например, сайты связывания с рибосомами); последовательности, которые повышают стабильность белка; и при необходимости последовательности, которые повышают секрецию белка, могут представлять собой любую последовательность нуклеиновой кислоты, проявляющую активность у предпочтительного организма-хозяина, и могут быть получены из генов, кодирующих белки, которые либо гомологичны, либо гетерологичны по отношению к организму-хозяину. Выявление и применение последовательностей, регулирующих экспрессию, не составят труда для специалиста в данной области техники.

Подходящие векторы в соответствии с настоящим изобретением представляют собой например векторы на основе аденовирусов, такие как, например, Ав26 или Ad35, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), векторы на основе лентивирусов, альфавирусов, парамиксовирусов, на основе вируса коровьей оспы, вируса герпеса, ретровирусов и т.п.

В определенных вариантах осуществления векторы применяют для целей генной терапии, как описано, например, Adam et al. (2014), Johnson et al. (2009) и Suscovich and Alter (2015).

В настоящем изобретении дополнительно предусматриваются клетки-хозяева, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеописанные однодоменное антитело или мультидоменное антитело. Выражение "клетки-хозяева", используемое в данном документе, относится к клеткам, в которые был введен вектор, например клонирующий вектор или вектор экспрессии. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими или эукариотическими.

В настоящем изобретении дополнительно предусматриваются фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько из вышеописанных однодоменных антител, мультидоменных антител, молекул нуклеиновых кислот и/или векторов. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель. Под "фармацевтически приемлемым наполнителем" подразумевается любое инертное вещество, которое объединяют с активной молекулой, такой как связывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением, для получения подходящей композиции. Фармацевтически приемлемый наполнитель представляет собой наполнитель, который в применяемых дозах и концентрациях нетоксичен для пациентов, и является совместимым с другими ингредиентами состава. Фармацевтически приемлемые наполнители широко применяются и известны из уровня техники.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать по меньшей мере одно отличающееся терапевтическое, профилактическое и/или диагностическое средство. Указанные дополнительные терапевтические и/или профилактические средства могут представлять собой, например, средства, которые также способны обеспечивать предупреждение и/или лечение инфекции, вызванной вирусом гриппа, такие как ингибиторы М2 (например, амантидин, римантадин) и/или ингибиторы нейраминидазы (например, занамивир, осельтамивир). Их можно применять в комбинации со связывающими молекулами по настоящему изобретению. Выражение "в комбинации" в данном документе означает одновременно, в виде отдельных составов, или в виде одного комбинированного состава, или в соответствии со схемой последовательного введения в виде отдельных составов, в любом порядке.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предусматриваются описанные в данном документе однодоменные антитела, мультидоменные антитела, молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы для применения в диагностике, предупреждении и/или лечении инфекции, вызванной вирусом гриппа. Кроме того, в настоящем изобретении предусматривается применение описанных в данном документе однодоменных антител, мультидоменных антител, молекул нуклеиновых кислот и/или векторов в изготовлении лекарственного препарата для диагностики, предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа. Такие инфекции могут возникать в небольших популяциях, но также могут распространяться по всему миру во время сезонных эпидемий или, что хуже, во время глобальных пандемий, при которых риску подвергаются миллионы людей. В настоящем изобретении предусматриваются связывающие молекулы, которые способны нейтрализовать инфекцию, вызванную штаммами вируса гриппа, которые являются причиной таких сезонных эпидемий, а также возможных пандемий. Важно отметить, что теперь защита и лечение обеспечиваются связывающими молекулами по настоящему изобретению независимо от вызывающего заболевания вируса гриппа, поскольку, как было раскрыто, связывающие молекулы по настоящему изобретению способны перекрестно нейтрализовать различные подтипы вирусов как филогенетической группы 1, охватывающей, например, подтипы H1, H2, H5, H6, H8, H9 и H11, так и филогенетической группы 2, охватывающей, например, подтипы H3, H4, H7 и H1, а также подтипы вируса гриппа В.

В настоящем изобретении дополнительно предусматриваются способы предупреждения и/или лечения гриппа у субъекта, предусматривающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества описанных в данном документе однодоменного антитела, мультидоменного антитела, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству определенной в данном документе связывающей молекулы или молекулы нуклеиновой кислоты, которое является эффективным для предупреждения, облегчения и/или лечения состояния, являющегося результатом инфицирования вирусом гриппа. Выражение "улучшение состоя-

ния", используемое в данном документе, может относиться к ослаблению видимых или ощутимых симптомов заболевания, виремии или любых других поддающихся измерению проявлений инфекции, вызванной вирусом гриппа. Предупреждение охватывает ингибирование или снижение распространения вируса гриппа, или ингибирование, или ослабление начала проявления, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов.

Предупреждение и/или лечение может быть нацелены на группы пациентов, которые являются восприимчивыми к инфекции, вызванной вирусом гриппа. Такие группы пациентов включают без ограничения, например, пожилых (например, в возрасте ≥ 50 лет, в возрасте ≥ 60 лет и предпочтительно в возрасте ≥ 65 лет), молодых (например, в возрасте ≤ 5 лет, в возрасте ≤ 1 года), госпитализированных пациентов и уже инфицированных пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, однако продемонстрировали неудовлетворительный противовирусный ответ.

Схемы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Подходящий диапазон доз может, например, составлять 0,01-100 мг/кг веса тела, предпочтительно 0,1-50 мг/кг веса тела, предпочтительно 0,01-15 мг/кг веса тела. Кроме того, например, можно вводить однократную болюсную дозу, можно вводить несколько доз в течение некоторого периода времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать по мере необходимости.

Связывающие молекулы, молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением можно вводить субъекту, например, внутривенно, интраназально, посредством пероральной ингаляции, легочным путем, подкожно, внутривожно, интравитреально, перорально, внутримышечно и т.д. На оптимальный путь введения будут влиять несколько факторов, включая физико-химические свойства активных молекул, неотложность клинической ситуации и взаимосвязь концентраций активных молекул в плазме крови с требуемым терапевтическим эффектом.

Высокая стабильность связывающих молекул по настоящему изобретению открывает возможность альтернативной безыгольной доставки, например путем интраназального введения с применением капель для носа или назального спрея или путем ингаляции с применением аэрозольного аппарата или порошкового ингалятора. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или вектор, кодирующие по меньшей мере одно- или мультидоменное антитело в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, вводят интраназально, как описано, например, Limberis et al. (2013).

В отличие от обычных антител и многих других биофармацевтических препаратов, связывающие молекулы по настоящему изобретению можно с высокой эффективностью получать в микробных системах. Примерами микробных клеток-хозяев, применяемых в крупномасштабном производстве, являются, например, дрожжи (*P. pastoris*) и *E. coli*. Эти микробные системы считаются наиболее экономически выгодным вариантом для производства биофармацевтических препаратов. Низкие показатели COG являются необходимым условием для широкого применения лекарственных средств против гриппа при лечении и профилактике гриппа. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусматриваются способы получения связывающих молекул (то есть однодоменных антител или мультидоменных антител) в соответствии с настоящим изобретением, предусматривающие культивирование описанной в данном документе клетки-хозяина в условиях, способствующих экспрессии связывающей молекулы, и необязательно извлечение экспрессированной связывающей молекулы. Способы извлечения связывающих молекул из культуральной среды хорошо известны специалисту в данной области техники.

В определенном варианте осуществления клетки-хозяева представляют собой микробные клетки, такие как, без ограничения, дрожжевые клетки или *E. coli*.

В дополнительных вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих, такие как, без ограничения, клетки CHO, клетки HEK или клетки PER.C6.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу выявления вируса гриппа в образце, при этом способ предусматривает стадии:

а) приведение указанного образца в контакт с диагностически эффективным количеством связывающей молекулы в соответствии с настоящим изобретением и

б) определение того, специфично ли связывающая молекула связывается с молекулой в образце.

Образец может представлять собой биологический образец, в том числе без ограничения кровь, сыроворотку крови, ткань или другой биологический материал от (потенциально) инфицированных субъектов. (Потенциально) инфицированные субъекты могут представлять собой субъектов-людей, однако животных, которые предположительно являются носителями вируса гриппа, также можно подвергать тестированию на предмет наличия вируса гриппа с использованием связывающих молекул по настоящему изобретению. Предпочтительно связывающие молекулы по настоящему изобретению приводят в контакт с образцом в условиях, обеспечивающих образование иммунологического комплекса между связывающими молекулами и вирусом гриппа или его антигенными компонентами, которые могут присутствовать в образце. Образование иммунологического комплекса, если таковое случается, указывающее на наличие вируса в образце, затем выявляют и измеряют с помощью подходящих способов. Помимо прочего, такие

способы включают гомогенный и гетерогенный иммунологические анализы связывания, такие как радиоиммунологические анализы (RIA), ELISA, иммунофлуоресцентный анализ, иммуногистохимический анализ, FACS, BIACORE и вестерн-блоттинг. Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1. Иммунизации.

С целью индукции иммунного ответа, зависящего от антитела с тяжелыми цепями, четырех лам (Lama glama) иммунизировали антигенами вируса гриппа (коммерческая вакцина Inflexal® и рекомбинантный белок) в присутствии адъюванта Фрейнда в соответствии со схемой, описанной в табл. 1.

Таблица 1. Схема иммунизации ламы

	Иммун. 1	Иммун. 2	Забор небольшого объема крови А (1)	Иммун. 3	Забор небольшого объема крови В (2)	Иммун. 4	Забор большого объема крови С (3)	Иммун. 5	Последний забор крови D (4)
День	1	14	28	28	42	42	63	102	112
4 ламы	Inflexal (1 доза) SC, CFA	Inflexal (1 доза) SC, IFA	250 мл	Inflexal (1 доза) + rH7 (50 мкг) SC, IFA	250 мл	rH7 (100 мкг) SC, IFA	100 мл	rH7+rH2 (2×50 мкг) SC, IFA	250 мл
Inflexal 09/10: A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), B/Brisbane/60/2008; вирус H1N1: A/New Caledonia/20/99; rH: рекомбинантный белок HA от Protein Sciences; rH1: A/New Caledonia/20/99; rH7: A/Netherlands/219/03; rH2: A/Japan/305/1957; B1: B/Florida/04/06; B2: B/Brisbane/60/08; Иммун.: Иммунизация; SC: подкожно; CFA: полный адъювант Фрейнда; IFA: неполный адъювант Фрейнда									

С помощью венопункции у лам собирали периферическую кровь в пробирки с цитратом для антикоагуляции образца в указанные моменты времени после 2, 3, 4 и 5-й иммунизации (табл. 1).

Гомологичный и гетерологичный иммунные ответы у каждого животного анализировали путем сравнения антигенспецифичных сывороточных титров образца, отобранного до иммунизации (день 0), и образца сыворотки, отобранного после введений антигена (день 28 и день 112) в ELISA с использованием HA. С данной целью рекомбинантный белок HA захватывали в 96-луночных микротитрационных планшетах Maxisorp. После блокирования добавляли образцы сыворотки в серийных разбавлениях и связанный IgG ламы выявляли путем добавления IgG-HRP козы к IgG ламы. Результаты показаны на фиг. 1. Эти данные показывают, что у всех иммунизированных животных вырабатывался гомологичный и гетерологичный иммунные ответы на HA.

Пример 2. Конструирование фаговой библиотеки.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из свежей крови с применением Ficoll-Paque plus (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями производителя. Общая РНК, экстрагированная из PBMC, служила исходным материалом для RT-PCR с целью амплификации кодирующих VHH фрагментов генов. Эти фрагменты клонировали с помощью сайтов рестрикции для SfiI и NotI во фагмидный вектор на основе M13 pDV-LucStuffer (производный от pDV-C06; как описано в WO 02/103012) для создания слияния VHH-домена с белком рIII фага M13 (включая стоп кодон AMBER между двумя белками). Цитированные векторы трансформировали в бактерии TG-1 (Agilent), и 100-150 отдельных колоний анализировали с помощью PCR для определения качества каждой библиотеки. Как правило, частота вставки и завершенность составляла более 95%. Характеристики сконструированных библиотек показаны в табл. 2. Фаговые библиотеки от отдельных животных получали с применением хелперных фагов СТ, главным образом так, как описано (WO 02/103012), стерилизовали фильтрацией и применяли для отборов. Как показано в данном документе, комплексные фаговые библиотеки могли быть образованы от всех иммунизированных лам.

Таблица 2. Характеристики фаговых библиотек, экспрессирующих VHH

	№	№ интактных	% интактных	из которых	длина CDR3	комплексность
	клоны	ORF	ORF	% уникальных	аминокислоты	Cfu
L01	104	100	96	98	5-21 АА	6,8E+06
L02	117	114	97	95	5-27 АА	1,4E+07
L03	111	109	98	98	6-28 АА	1,7E+07
L04	111	109	98	96	5-23 АА	1,6E+07

Пример 3. Отборы однодоменных антител к НА вируса гриппа.

Фрагменты антител отбирали с использованием вышеописанных библиотек фагового дисплея VHH, а также обычной технологии фагового дисплея и технологии MABSTRACT®, главным образом так, как описано в патенте США № 6265150, в WO 98/15833 и в "Phage display, A Laboratory Manual" by T. Kuhlman, 2001 (которые включены в данные документ с помощью ссылки). Кроме того, в настоящем изобретении применяли способы и хелперные фаги, описанные в WO 02/103012 (который включен в данные документ с помощью ссылки).

Отборы специфичных связывающих молекул осуществляли с использованием гемагглютинина (НА) вируса гриппа А (H1 A/California/07/2009, H1 A/New Caledonia/20/1999, H2 A/Japan/305/1957, H3 A/Brisbane/10/2007, H7 A/Netherlands/219/2003) и/или вируса гриппа В (Victoria clade B/Brisbane/60/2008, Yamagata clade B/Florida/04/2006) в качестве белка-мишени. Источником белка-мишени была либо клетка насекомого, либо полученный рекомбинантный белок (Protein Sciences, Коннектикут, США), или НА, экспрессируемый на поверхности инфицированных вирусом гриппа и фиксированных (3% параформальдегидом) клеток MDCK. Применяли различные условия отбора и они обобщены в табл. 3. "SD" относится к однодоменному антителу. Если не указано иное, то отборы осуществляли при pH 7,4 и с 5 мкг/мл белка НА. CR8033 и CR8071 представляют собой моноклональные антитела (IgG), связывающиеся с головкой и шейкой НА вируса гриппа В (Dreyfus et al. 2012).

Таблица 3. Условия отбора с использованием фагового дисплея

Однодомен- ное	Библиоте- ка	Отбор 1	Отбор 2	Отбор 3
SD1014	L03	H1 A/New Cal/20/99	H7 A/Neth/219/03, pH5	
SD1016	L04	H1 A/New Cal/20/99, 10 мкг/мл	H7 A/Neth/219/03, 2 мкг/мл	
SD1017	L03	H1 A/New Cal/20/99, 10 мкг/мл	H5 A/Vietnam/1203/04, 2 мкг/мл	
SD1018	L03	H1 A/New Cal/20/99, 10 мкг/мл	H7 A/Neth/219/03	
SD1025	L03	H1 A/New Cal/20/99	H7 A/Neth/219/03, pH5	
SD1027	L04	H1 A/New Cal/20/99	H7 A/Neth/219/03, pH5	
SD1034	L04	H3 A/Brisbane/10/07	H1 A/New Cal/20/99, pH5	
SD1035	L03	H3 A/Brisbane/10/07	H1 A/New Cal/20/99, pH5	
SD1036	L03	H3 A/Brisbane/10/07	H1 A/New Cal/20/99, pH5	
SD1038	L04	H3 A/Brisbane/10/07	H1 A/New Cal/20/99, pH5	
SD1045	L01	H1 A/New Cal/20/99,	H3 A/Brisbane/10/07, pH5	
SD1046	L01	H3 A/Brisbane/10/07	H1 A/California/07/09, pH5	
SD1047	L01	H3 A/Brisbane/10/07	H1 A/California/07/09, pH5	
SD1048	L02	H3 A/Brisbane/10/07	H1 A/California/07/09, pH5	
SD1049	L02	H3 A/Brisbane/10/07	H1 A/California/07/09,	

			pH5	
SD1069	L03	H7 A/Netherl/219/03	H2 A/Japan/305/57, pH5	
SD1070	L03	H7 A/Netherl/219/03	H2 A/Japan/305/57, pH5	
SD1071	L04	H5 A/Vietnam/1203/04	H3 A/Uruguay/716/07, pH5	
SD1072	L04	H7 A/Netherl/219/03	H2 A/Japan/305/57, 5 мкг/мл, pH5	
SD1073	L04	H7 A/Netherl/219/03	H2 A/Japan/305/57, pH5	
SD1074	L04	H7 A/Netherl/219/03	H2 A/Japan/305/57, pH5	
SD1076	L07	H7 A/Netherl/219/03	H2 A/Japan/305/1957, pH5	
SD1083	L03	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06, блокированный CR8033 и CR8071	
SD1084	L03	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06, блокированный CR8033 и CR8071	
SD1085	L04	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06	
SD1086	L04	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06	
SD1087	L04	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06	
SD2020	L03	MDCK, инфицированные H3 A/Wisconsin/67/05	H3 A/Brisbane/10/07 блокированный CR8057	
SD2086	L03	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06, блокированный CR8033 и CR8071	H3 A/Brisba ne/10/07 Блоки- рованный CR8057

Для первого раунда отборов пробирки для иммуноанализа покрывали в течение ночи НА (5,0 мкг/мл, разбавленным в PBS) и промывали блокирующим буфером (2% обезжиренное сухое молоко (ELK) в PBS). Аликвоты (5-10 мкл) из библиотек фагового дисплея блокировали в 2 мл блокирующего буфера (5% неинaktivированная нагреванием фетальная бычья сыворотка (FBS), 1% сыворотка крови мыши и 2% ELK в PBS) и добавляли в пробирки для иммуноанализа. Спустя 2 ч инкубации при комнатной температуре (RT) пробирки промывали (5-15 раз 0,05% Tween-20 в PBS и 3-5 раз PBS). Связавшиеся фаги элюировали в течение 10 мин триэтиламиноом (100 мМ) и pH доводили до 7,5. E.coli XLI-Blue инфицировали элюированными фагами, высевали и инкубировали в течение ночи при 37°C. Колонии подсчитывали (от 1E+04 до 1E+06 CFU) и соскабливали с чашек для получения обогащенной фагами библиотеки (как описано в WO 02/103012).

Второй раунд отборов осуществляли с применением фагов, полученных в результате первого раунда, и следуя в основном аналогичному протоколу, за исключением применения измененных антигенов, pH и добавления моноклональных антител, блокирующих эпитоп. Различные стратегии пэннинга применяли для отбора сильных связывающих молекул, специфично нацеленных на консервативную стеблевую

область НА. Для отбора клонов с перекрестно-реактивным доменом также применяли меньшие количества различных НА-антигенов, в отличие от первого раунда отбора. Стадия отмывки с низким pH была включена в протокол для повышения вероятности отбора фагов, которые могут связываться со стеблем и блокировать конформационное изменение НА, происходящее при pH 5,0 (Brandenburg et al. 2013). Для этого покрытые НА пробирки для иммуноанализа инкубировали в течение 10 мин с разбавленным в 5 раз Tryple Select (рекомбинантный трипсин; Invitrogen) с целью расщепления покрывающего НА₀ (на НА₁-НА₂) с последующими стадиями промывки и блокирования. После инкубации с фагами пробирки промывали, как описывалось ранее, с последующей 20-минутной инкубацией в цитрат-натрий-фосфатном буфере при pH 5,1. После трех стадий промывки PBS продолжали элюирование фагов, как описано выше. Добавление антител IgG1 (10 мкг/мл) в ходе отборов обеспечивало блокирование иммунодоминантных эпитопов в пределах головки или шейки НА и также могло обеспечивать повышение вероятности отбора фагов, экспрессирующих однодоменные антитела, связывающихся со стеблем НА. В ходе блокирования покрытых НА пробирок для иммуноанализа и в ходе инкубации с фаговыми библиотеками добавляли антитела CR8033 и CR8071 (Dreyfus et al. 2012).

До выделения отдельных sdAb осуществляли два или три последовательных раунда отборов. Каждый продукт отбора подвергали анализу последовательностей на предмет коэффициента обогащения и наилучшие продукты отбора выбирали для дополнительного анализа. Отдельные колонии *E. coli* отбирали для получения периплазматических экстрактов, содержащих неочищенные моноклональные sdAb. Вкратце, элюированные фаги применяли для инфицирования культур штамма SF110 *E. coli* (среда 2YT, 10 мкг/мл тетрациклина, 4% глюкоза), отдельные колонии собирали и выращивали в 96-луночных планшетах с глубокими лунками (1 мл среды 2YT-ATG). Экспрессию VHH-домена индуцировали путем добавления IPTG (1 мМ). Периплазматические экстракты получали путем растворения осадков с бактериями в 150 мкл TES-буфера (100 мМ Трис-HCl, 1 мМ EDTA, 500 мМ сахараза, pH 8,0) в течение 30 мин на льду. В результате осмотического шока высвобождалась периплазматическая фракция, и прозрачный и стерилизованный фильтрованием супернатант, содержащий sdAb, применяли для функционального скрининга (см. пример 4).

SdAb из выработок в малом масштабе (1 мл в 96-луночных планшетах с глубокими лунками) очищали и концентрировали с применением центрифужных 96-луночных планшетов с Ni-NTA в соответствии с инструкциями производителя.

Параллельно с получением периплазматических экстрактов, оставшуюся культуру отдельных клонов применяли для образования маточных культур в глицерине и для выделения плазмидной ДНК для секвенирования генов VHH. Уникальные последовательности подвергали дополнительному тестированию.

Перекрестные отборы с применением белков НА вируса гриппа группы 1, группы 2 или В, а также стадии жесткой отмывки при низком pH, обеспечили выделение фагов, связывающихся НА в широком диапазоне. Периплазматические экстракты из выработок в *E. Coli* в малом масштабе давали в результате воспроизводимые уровни белка, подходящие для функционального скрининга.

Пример 4. Функциональный скрининг в отношении однодоменных антител, нейтрализующих вирус гриппа.

Периплазматические экстракты, содержащие SdAb, анализировали в анализе нейтрализации вируса (VNA) на предмет их способности предупреждать вызванную вирусом гриппа инфекцию клеток млекопитающих. Для данной цели клетки MDCK (ATCC, № CCL-34 по каталогу) высевали в 96-луночные планшеты (4E+04 клеток/лунку) и через 4 ч инкубировали со смесью вируса гриппа (100 TCID₅₀/лунку) и стерилизованного фильтрованием периплазматического экстракта (15 мкл/лунку или его разбавлений). Спустя 3 дня инкубации при 37°C и 10% CO₂ количество вновь произведенного вируса в супернатанте клеточной культуры оценивали по гемагглютинации 1% эритроцитов индюка (TRBC) в планшетах с лунками с V-образным дном (нейтрализующие sdAb снижают вирусную нагрузку в супернатанте, что приводит к предотвращению гемагглютинации TRBC). Поскольку начальная концентрация sdAb для периплазматических экстрактов неизвестна, то образцы оценивали только как положительные или отрицательные в отношении нейтрализации вируса. Параллельно тестировали несколько штаммов вируса гриппа для отбора предпочтительно нейтрализующих sdAb широкого спектра действия (см. табл. 3а).

В заключение, в результате функционального скрининга было выявлено, что sdAb можно классифицировать как нейтрализующие вирусы гриппа А группы 1, А группы 2, А группы 1 и 2 или В.

Таблица 3а. Функциональный скрининг в отношении нейтрализующих вирус гриппа однодоменных антител ("+" отображает нейтрализацию, "-" отображает отсутствие нейтрализации, A g1 относится к вирусу гриппа А группы 1, A g2 относится к вирусу гриппа А группы 2, В относится к вирусу гриппа В; пустые ячейки означают "не тестировали")

		A/New Caledonia/20/99	A/Puerto Rico/8/34-MA	A/PR8 H5N1 HK97	A/Vietnam/1194/04	A/Brisbane/10/2007	A/HK/1/68-MA	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06	B/Lee/40
		А группы 1				А группы 2			В		
Класс	Однодоменное	H1N 1	H1N 1	H5N 1	H5N 1	H3N 2	H3N 2	H7N 3			
A g1	SD1016	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A g1	SD1018	+			+	-		-			
A g1	SD1027	+			+	-		-			
A g1	SD1071	+			+	-		-			
A g1	SD1072	+			+	-		-			
A g1	SD1074	+			+	-	-	-	-	-	-
A g1	SD1076	+	+	+	+	-	-	-			
A g1	SD1034	+	+		+	-	-	-	-	-	-
A g1	SD1035	+			-	-		-			
A g2	SD1014	-	-		-	+	-	+			
A g2	SD1017	-	-		-	-	+	+			
A g2	SD1025	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
A g2	SD1036	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
A g2	SD1046	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
A g2	SD1047		-		-		-	+			
A g2	SD1048	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
A g2	SD1049	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
A g2	SD1070	-	-	-	-	+		+		-	
A g2	SD2020				-	+		-			
A g1+g2	SD1038	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
A g1+g2	SD1045	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A g1+g2	SD1069	+	+	+	+	-	-	+			
A g1+g2	SD1073	+	+	+	+	-	-	+			
B	SD1083	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
B	SD1084	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
B	SD1085	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
B	SD1086	-				-			+	-	+
B	SD1087	-				-			+	-	+
B	SD2086	-				-			-	-	+

Пример 5. Экспрессия и очистка однодоменных антител.

Соответствующие последовательности sdAb клонировали в стандартный эукариотический вектор экспрессии, подходящий для применения в суспензионной культуре клеток Expi293. Циклы продукции осуществляли в течение 5-6 дней. Экспрессированные sdAb секретировались в среду для культивирования клеток. Перед полным истощением глюкозы из среды супернатант собирали, центрифугировали и стерилизовали фильтрованием. SdAb очищали с применением содержащей ионы никеля смолы для связывания His (колонка для очистки с использованием HIS-метки complete ; Roche, № 067 81543001 по каталогу) и элюировали с применением высокой концентрации имидазола (300 мМ). Для элюата осуществляли замену буфера на его конечный буфер для составления (20 мМ NaAc, 75 мМ NaCl, 5% сахароза, pH 5,5) с применением обессоливающей колонки (обессоливающая колонка HiPrep 26/10, GEHC № 17-5087 по каталогу) и концентрировали с применением центробежного фильтра Amicon Ultra 3K (Millipore, № UFC900324 по каталогу). После определения концентрации аликвоты очищенных sdAb дополнительно характеризовали с помощью SDS-PAGE, HPSEC, SEC-MALS и определения эндотоксина. Для каждой конструкции получали минимальный выход 5 мг очищенного sdAb из полученного после трансфекции объема 600 мл. Для дополнительного определения характеристик применяли только партии sdAb с содержанием мономеров более 95% и соответствующей молекулярной массой.

Для выбранных применений необходимыми были sdAb без меток (например, HIS-меток). Немеченные sdAb очищали посредством многостадийной ионообменной хроматографии (IEX). Прозрачный и отфильтрованный супернатант разбавляли в два раза в dH₂O для снижения проводимости, pH доводили до 8,0 и образец загружали на положительно заряженную смолу Capto Q Impress (GEHC, № 17-5470-02 по каталогу). Незаряженные sdAb оставались в фильтрате, который затем доводили до pH 3,5. Теперь положительно заряженные sdAb захватывали на отрицательно заряженной колонке HiTrap Capto SP ImpRes (GEHC, № 17-54 68-55 по каталогу) и элюировали с применением высокой концентрации хлорида натрия, pI sdAb может в значительной степени варьироваться, и данный способ применяли для молекул с зарядом от отрицательного до +1,0 при pH 8 и по меньшей мере зарядом более +10 в диапазоне pH 3-5. Элюированные sdAb дополнительно обрабатывали, как описано выше.

Как описано в данном документе, стратегии экспрессии в суспензионной культуре клеток Expi293 и очистки из них основывались на использовании HIS-метки и ионном обмене на конструкции без метки, которые обеспечивали большое количество и качество мономерных конструкций sdAb.

Пример 6. Определение характеристик однодоменных антител.

Охват нейтрализации вируса гриппа.

Нейтрализующие титры очищенных sdAb оценивали посредством тестирования диапазона концентраций в большой панели штаммов вируса гриппа с применением анализа нейтрализации вируса, описанного в примере 4. Титры приведены в таблицах 4-7. На основании их активности, sdAb можно разделить на молекулы, нейтрализующие вирус гриппа А группы 1 (охватывая вирусы H1, H5, H2, H6, H11, H9, H8 и H12), молекулы, нейтрализующие вирус гриппа А группы 2 (охватывая вирусы H3, H4, H14, H7 и H10) и молекулы, нейтрализующие вирус гриппа В (охватывая вирусы Yamagata, Victoria и Predecessor/Old). Интересно, что некоторые из sdAb были способны нейтрализовать вирусы гриппа А как группы 1, так и группы 2 (табл. 6).

Таблица 4. Средние титры нейтрализации (нМ) для однодоменных антител к классу вирусов гриппа А группы 1 (пустые ячейки означают "не тестировали")

Подтип	Штамм вируса гриппа	SD1016	SD1018	SD1027	SD1034	SD1035	SD1071	SD1072	SD1074	SD1076
H1N1	A/California/07/09	9,1								3,1
	A/New Caledonia/20/99	7,1	>1000	862,0	160,6	74,8	1256,4	78,5	112,9	22,1
	A/Puerto Rico/8/34-MA	15,7			756,1					8,7
H5N1	A/PR8 H5N1 HK97	27,8								66,8
	A/Vietnam/1194/04	29,3	614,6	>1000	721,5	>1000	111,1	443,9	638,4	84,7
H2N2	A/Guizhou/1/57									>1000
	A/WF/HK/MPU3156/05									38,5
H3N2	A/Brisbane/10/07	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	A/HK/1/68-MA	>1000			>1000					>1000
	A/Panama/2007/99	>1000								
	A/Wisconsin/67/05	>1000								>1000
H4	A/WF/HK/MPA892/06	>1000								>1000
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	>1000								
H10N7	A/Chick/Germany/N/49	>1000								>1000
Victoria	B/Brisbane/60/08	>1000								
Yamagata	B/Florida/04/06	>1000								

Таблица 5. Средние титры нейтрализации (нМ) для однодоменных антител к классу вирусов гриппа А группы 2 (пустые ячейки означают "не тестировали")

Подтип	Штамм вируса гриппа	SD1014	SD1017	SD1025	SD1036	SD1046	SD1047	SD1048	SD1049	SD1070	SD2020
H1N1	A/California/07/09	>100 0	>100 0		>1000	>1000		>100 0	>100 0	>100 0	
	A/New Caledonia/20/99	>100 0	>100 0	>100 0	>1000	>1000		>100 0	>100 0	>100 0	
	A/Puerto Rico/8/34-MA	>100 0	>100 0	>100 0	>1000	>1000	>100 0	>100 0	>100 0	>100 0	
	A/Brisbane/59/07	>100 0	>100 0	>100 0	>1000	>1000	>100 0	>100 0	>100 0		
	A/Mississippi/03/01 274H				>1000						
	A/Solomon Islands/3/2006 (IVR 145)				>1000						
	A/WSN/33				>1000						
	A/HK/54/98				>1000						
	A/Christchurch/16/10				>1000						
H1N2	A/Env/HK/MPU3156/05				>1000						
H5N1	A/PR8 H5N1 HK97				>1000	>1000		>100 0			
	A/Vietnam/1194/04	>100 0	>100 0	>100 0	>1000	>1000	>100 0	>100 0	>100 0	>100 0	>100 0
	A/Indonesia/5/05				>1000						
H5N2	A/Eurasian Wigeon/MPF461/07				>1000						
	A/Eurasian Wigeon/HK/MPF333/07				>1000						
H2N2	A/Guiyang/1/57				>1000						
	A/AnnArbor/23/57				>1000						
	A/Env/HK/MPU3156/05				>1000						
H6N1	A/Eurasian Wigeon/MPG1884/09				>1000						
	A/Taiwan/2/2013				>1000						
H6N8	A/Eurasian				>1000						

	Wigeon/MPD411/07										
H11N9	A/Northern Pintail/MPC2085/ 07				>1000						
H9N2	A/Ck/HK/SSP176/0 9				>1000						
	A/Great Cormorant/MP2934 /04				677,4						
	A/HK/466419/09				>1000						
H8N4	A/Eurasian Wigeon/MPH571/08				>1000						
H8N2	A/Env/MPJ1258/09				>1000						
H12N5	A/Env/MPK659/09				>1000						
H3N2	A/Brisbane/10/07	>100 0	>100 0	>100 0	86,7	6,6		19,5	19,1	15,3	9,3
	A/HK/1/68				114,6	202,0					
	A/HK/1/68 (D375N, I395V)				>1000	>1000					
	A/HK/1/68 (E443K)				>1000	202,0					
	A/HK/1/68 (G379R)				>1000	570,7					
	A/HK/1/68 (I395V)				>1000	>1000					
	A/HK/1/68 (L331I, E443K)				>1000	202,0					
	A/HK/1/68 (N8S, E443K)				>1000	202,0					
	A/HK/1/68 (R201G, L331I, E443K)				>1000	339,3					
	A/HK/1/68-MA	>100 0	>100 0	>100 0	73,2	26,4	>100 0	110, 4	76,1		
	A/Panama/2007/99				>1000	>1000		>100 0			
	A/Wisconsin/67/0 5	>100 0	>100 0		>1000	>1000		>100 0	>100 0	>100 0	304, 0
	A/Fukui/45/04				>1000						
	A/Aichi/2/68				6,5						
	A/Hiroshima/52/0 5				>1000						

	A/Johannesburg/33/94				600,6						
	A/Perth/16/09				76,4						
	A/Victoria/210/09				540,2						
	A/HK/1174/99				>1000						
H3N?	A/Env/MPJ193/09				41,0						
H4	A/WF/HK/MPA892/06				40,4	34,3		34,3			
H4N1	A/Northern Pintail/MPB1368/06				80,7						
H4N6	A/Great Cormorant/MPB1683/06				44,5						
H14N5	A/Mallard/Astrakhan/263/1982				16,2						
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	136,8	34,7	52,0	10,9	26,4	509,7	20,6	114,6	366,2	>1000
H7N7	A/PR8 H7N7-NY				8,8	25,9		93,0			
	A/Northern Shoveler/MPF518/08				44,7						
	A/Netherlands/219/2003				28,9						
	A/Common Teal/MPF139/07				18,3						
H7N9	A/Anhui/1/13				65,9	46,1					
	A/Shanghai/1/13				101,2						
	A/Shanghai/2/13				33,0						
H10N7	A/Chick/Germany/N/49				22,2	34,3		34,3			
H10N8	A/Jiangxi/346/2013				83,9						
H10N3	A/Common Teal/MPH11/08				28,9						
H10N9	A/Northern Shoveler/MPE2531/08				19,9						
Victoria	B/Brisbane/60/08				>1000	>1000		>1000			
Yamagata	B/Florida/04/06				>1000	>1000		>1000		>1000	

Таблица 6. Средние титры нейтрализации (нМ) для однодоменных антител к классу вирусов гриппа А группы 1 и 2 (пустые ячейки означают "не тестировали")

Подтип	Образец	SD1038	SD1045	SD1069	SD1073
H1N1	A/California/07/09	17,5	85,9	3,3	30,3
	A/New Caledonia/20/99	10,1	165,6	20,8	98,9
	A/Puerto Rico/8/34-MA	8,8	206,4	12,8	89,6
	A/Brisbane/59/07	3,1			
	A/Mississippi/03/01 274H	4,7			
	A/Solomon Islands/3/2006 (IVR 145)	4,1			
	A/WSN/33	5,0			
	A/HK/54/98	16,5			
	A/Christchurch/16/10	2,6			
H1N2	A/Env/HK/MPU3156/05	40,5			
H5N1	A/PR8 H5N1 HK97	9,7	117,2	241,7	179,1
	A/Vietnam/1194/04	30,1	63,5	74,0	223,9
	A/Indonesia/5/05	32,8			
H5N2	A/Eurasian Wigeon/MPF461/07	18,8			
	A/Eurasian Wigeon/HK/MPF333/07	11,0			
H2N2	A/Guiyang/1/57	101,7			
	A/WF/HK/MPU3156/05	31,4			
	A/AnnArbor/23/57	33,0			
	A/Env/HK/MPU3156/05	23,2			
H6N1	A/Eurasian Wigeon/MPG1884/09	16,2			
	A/Taiwan/2/2013	15,3			
H6N8	A/Eurasian Wigeon/MPD411/07	13,2			
H11N9	A/Northern Pintail/MPC2085/07	160,0			

H9N2	A/Ck/HK/SSP176/09	90,8			
	A/Great Cormorant/MP2934/04	104,6			
	A/HK/466419/09	700,0			
H8N4	A/Eurasian Wigeon/MPH571/08	53,4			
H8N2	A/Env/MPJ1258/09	58,7			
H12N5	A/Env/MPK659/09	>1000			
H3N2	A/Brisbane/10/07	19,0	640,9	>1000	>1000
	A/HK/1/68	40,2	>1000	>1000	>1000
	A/Fukui/45/04	632,5			
	A/Aichi/2/68	127,2			
	A/Johannesburg/33/94	442,7			
	A/Perth/16/09	253,0			
	A/Victoria/210/09	253,0			
H3N?	A/Env/MPJ193/09	185,4			
H4	A/WF/HK/MPA892/06	>1000	492,4	>1000	>1000
H4N1	A/Northern Pintail/MPB1368/06	484,7			
H4N6	A/Great Cormorant/MPB1683/06	275,2			
H14N5	A/Mallard/Astrakhan/263/1982	253,0			
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	>1000	>1000	>1000	135,1
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	80,6	>1000		
	A/Northern Shoveler/MPF518/08	441,4			
	A/Netherlands/219/2003	180,6			
	A/Common Teal/MPF139/07	359,1			
H7N9	A/Anhui/1/13	253,0			
	A/Shanghai/1/13	503,0			
	A/Shanghai/2/13	239,1			
H10N7	A/Chick/Germany/N/49	468,6	984,7	>1000	316,6
H10N8	A/Jiangxi/346/2013	239,1			
H10N3	A/Common Teal/MPH11/08	300,6			
H10N9	A/Northern Shoveler/MPE2531/08	327,0			
Victoria	B/Brisbane/60/08	>1000	>1000		
Yamagata	B/Florida/04/06	>1000	>1000		

Таблица 7. Средние титры нейтрализации (нМ) для однодоменных антител к классу вирусов гриппа В (пустые ячейки означают "не тестировали")

Подтип	Образец	SD1083	SD1084	SD1085	SD1086	SD1087	SD2086
Victoria	B/Brisbane/60/08	178,5	20,5	40,7	826,6	10,2	934,2
	B/Malaysia/2506/04	293,8	34,9	66,3	>1000	79,1	546,1
Yamagata	B/Florida/04/06	219,7	68,8	186,9	>1000	>1000	814,7
	B/Harbin/7/94	258,9	240,0	631,2	>1000	503,0	963,8
	B/Massachusetts/02/12		40,0				
Old	B/Lee/40	216,7	>1000			6,5	273,1

Охват связывания с НА.

Платформу для интерферометрии биослоев Octet Red384 (Forte Bio, Pall) применяли для проведения безмаркерного анализа белок-белковых взаимодействий на основе связывания в режиме реального времени в быстром способе Dip and Read на поверхности специфических сенсоров. Смещение выявленной массы на кончике функционализированного сенсора позволило исследовать связывание sdAb с рекомбинантным НА. При выполнении в диапазоне концентраций определяли не только связывание как таковое, но также K_D sdAb.

Очищенные sdAb с С-концевой HIS-меткой захватывали на сенсоре с антителами к His (фаза загрузки, сенсоры с антителами к пента-His, Forte Bio, № 18-0020 по каталогу). Далее сенсоры с загруженными sdAb инкубировали с различными подтипами НА (20 мкг/мл) для тестирования связывания (фаза ассоциации). Последняя стадия анализа включала инкубацию сенсоров в буфере для измерения кинетики с целью определения скорости диссоциации комплекса НА-sdAb. Связывающие способности тестируемых sdAb приведены в табл. 8. Во многих случаях sdAb связывали НА большего количества штаммов, чем они способны нейтрализовать. Более широкий спектр связывания связан с их индивидуальной аффинностью к НА (см. также табл. 9 со значениями K_D).

Таблица 8. Безмаркерное выявление связывания sdAb с HA ("+" отображает связывание с HA, "-" отображает отсутствие связывания, A g1 относится к вирусу гриппа А группы 1, A g2 относится к вирусу гриппа А группы 2, В относится к вирусу гриппа В; пустые ячейки означают "не тестировали")

		A/New Caledonia/20/99 A/Puerto Rico/8/34-MA	A/Brisbane/59/07	A/PR8 H5N1 HK97	A/Vietnam/1194/04	A/Brisbane/10/07	A/HK/1/68	A/Wisconsin/67/05	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06	B/Lee/40
		А группы 1					А группы 2				В	
Класс	Однодоменное	H1N1	H1N1	H1N1	H5N1	H5N1	H3N2	H3N2	H3N2	H7N3		
A g1	SD1016	+	+	+	+	+	-	-		-	-	
A g1	SD1018	+				+						
A g1	SD1071	+				+	-			-	-	
A g1	SD1072	+				+	-			-	-	
A g1	SD1074	+				+	-			-	-	
A g1	SD1076	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
A g1	SD1035	+		+				-		-	-	
A g2	SD1017	-		-		-	+	+		+	-	
A g2	SD1025						+			+	-	
A g2	SD1070					-	+			+	-	
A g2	SD2020						+					
A g1+g2	SD1014	+		-		+	+	+	-	+	-	
A g1+g2	SD1027	+				+	+			+	-	
A g1+g2	SD1034	+	+	+		+	+	+		-	-	
A g1+g2	SD1036	+		-		+	+	+		+	-	
A g1+g2	SD1038	+	+	+	+	+	+	+		+	-	
A g1+g2	SD1045	+	+	+	+	+	+	-		-	-	
A g1+g2	SD1046	+		+		+	+	+		+	-	
A g1+g2	SD1047	+				+		+		+	-	
A g1+g2	SD1048	+		-		+	+	+		+	-	
A g1+g2	SD1049	+		-		+	+	+	-	+	-	

A g1+g2	SD1069	+	+	+	+	+	+		-	+	-	-	
A g1+g2	SD1073	+	+		+	+	-			+	-	-	
B	SD1083	-					-				+	+	+
B	SD1084	-					-				+	+	
B	SD1085	-					-				+	+	
B	SD1086	-					-				+	+	+
B	SD1087	-					-				+	+	+

Безмаркерную интерферометрию биослоев применяли для определения равновесных констант диссоциации (значений K_D) как меры сил связывания между sdAb и рекомбинантными молекулами НА различных штаммов вируса гриппа. Значения K_D определяли с помощью аппроксимации ответов связывания sdAb в диапазоне концентраций в устойчивом состоянии (средний ответ связывания в последние 10 с, измеренный при достижении плато в фазе ассоциации) с получением концентрации при 50% насыщения, которая отображала значение K_D ($R=R_{\max} \cdot [\text{sdAb}] / (K_D + [\text{sdAb}])$). Измерения для серийных разбавлений проводили в двух повторях, и средние геометрические значения K_D приведены в табл. 9.

Таблица 9. Аффинность отобранных sdAb. Средние геометрические значения K_D (нМ) связывания sdAb с НА (пустые ячейки означают "не тестировали")

	H1N1	H1N1	H3N2	H3N2	H3N2	H7N3	H7N9	Victoria
	A/New Caledonia/20/1999	A/Brisbane/59/07	A/HK/1/68	A/Wisconsin/67/05	A/Brisbane/10/2007	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	A/Hangzhou/1/2013	B/Brisbane/60/08
SD1036	230	290	2	122	10	2	3	
SD1038	4	3	44	42	14	88	57	
SD1016	6							
SD1045	5							
SD1046					2	3		
SD1048					3	3		
SD1083								3
SD1084								109

Конкуренция однодоменных антител с другими молекулами, связывающими НА.

Исследования конкуренции за связывание были разработаны для скрининга sdAb на предмет конкуренции между собой и в отношении других связывающих НА белков, в том числе хорошо изученных моноклональных антител (IgG) с известными эпитопами на НА. Если наблюдалась конкуренция, то предполагалось, что обе молекулы связываются с одним и тем же или, по меньшей мере, перекрывающимся эпитопом на поверхности НА.

Для этого был разработан конкурентный анализ AlphaLISA (Perkin Elmer), основанный на связывании НА (Protein Sciences, 10 мкл, конечная концентрация 0,5 нМ в 50 мкл) IgG или His-меченными sdAb (Perkin Elmer, 10 мкл, конечная концентрация 0,3 нМ в 50 мкл). Взаимодействие между НА и связывающей молекулой выявляли через 1 ч инкубации при RT с двумя типами гранул, донорной гранулой со стрептавидином, распознающей НА (10 мкл, 10 мкг/мл) и акцепторной гранулой с антителами к Fc или His (10 мкг/мл), распознающей либо IgG, либо используемые sdAb. Если спустя дополнительный час инкубации возбужденная донорная гранула (при 680 нМ) и акцепторная гранула оказывались в непосредственной близости, то перенос энергии (образование синглетного кислорода) можно было измерить

в виде сигнала люминесценции акцепторной гранулы. Интенсивность сигнала в данном гомогенном формате анализа прямо пропорциональна силе связывания (аффинность/авидность) между обоими партнерами по связыванию. Конкурирующая молекула, в зависимости от ее аффинности и концентрации (обычно тестируемая в диапазоне от 100 нМ до 0,5 пМ), могла нарушать сигнал AlphaLISA, что давало в результате сигмоидальную кривую ингибирования, которую аппроксимировали с применением стандартной четырехпараметрической логистической модели нелинейной регрессии в SPSS. Средние рассчитанных значений pIC50 показаны в табл. 10 и 11.

В табл. 10 и 11 показаны средние значений pIC50 в AlphaLISA (отрицательный log концентрации полумаксимального ингибирования, более высокие значения указывают на более высокую эффективность, растущую экспоненциально). "H1_Cal_HA" относится к H1N1 A/California/07/2009, "H1_NCa_HA" относится к HA H1N1 A/New Caledonia/20/1999, "H5_Vie_HA" относится к HA H5N1 A/Vietnam/1203/2004, "H3_Bri_HA" относится к HA H3N2 A/Brisbane/10/2007, "H3_Wis_HA" относится к HA A/Wisconsin/67/2005, "H7_Net_HA" относится к HA H7N7 A/Netherlands/219/2003; B_Bri_HA" относится к HA B/Brisbane/60/2008; "B_Flo_HA" относится к HA B/Florida/04/2006 "CR8033", "CR8071" и "CR9114" представляют собой HA, связывающие IgG, охарактеризованные Dreyfus et al. 2012. "2D1" относится к IgG, связывающемуся с рецептор-связывающим участком HA, охарактеризованному Xu et al. (2010). "CR8020" представляет собой IgG, связывающийся со стеблем HA, охарактеризованный Ekiert et al. (2011). "39.29" представляет собой IgG, связывающийся со стеблем HA, охарактеризованный в WO 2014/078268. Все SDxxxx имеют His-метку, применяемую для выявления, за исключением указанных версий "без меток". Пустые ячейки означают "не тестировали".

Таблица 10. Конкуренция SdAb за связывание с HA вируса гриппа А

	SD1014	SD1016	SD1036	SD1038	SD1046	SD1083	SD1084	SD1087
H1_Cal_HA_2D1			< 7	< 7	< 7			< 7
H1_Cal_HA_CR9114	< 7	10,3	< 7	9,9	< 7			< 7
H1_NCa_HA_CR9114	< 7	9,9	< 7	10,1				
H1_Cal_HA_SD1038			< 7	9,9		< 7	< 7	< 7
H5_Vie_HA_CR9114	< 7	9,6	< 7	9,3				
H3_Bri_HA_CR8020	7,2	< 7	9,2	7,8	9,6			
H3_Bri_HA_CR8057	< 7	< 7	< 7	< 7	< 7			
H3_Bri_HA_CR9114	7,8	< 7	9,4	8,6	9,9			< 7
H3_Bri_HA_SD1036			9,1	7,9				< 7
H3_Bri_HA_SD1038			9,3	8,3		< 7	< 7	< 7
H3_Bri_HA_39,29			9,2	8,3				< 7
H3_Wis_HA_CR9114	< 7	< 7	7,8	8,0				
H3_Wis_HA_CR8020	< 7	< 7	7,2	7,2				
H3_Wis_HA_CR8057	< 7	< 7	< 7	< 7				
H7_Net_HA_CR9114	9,2	< 7	9,3	7,5				
H7_Net_HA_SD1038						< 7	< 7	

Таблица 11. Конкуренция SdAb за связывание с HA вируса гриппа В

	SD1014	SD1036	SD1038	SD1083	SD1084	SD1085	SD1086	SD1087
B_Bri_HA_CR8071				< 7	< 7		< 7	< 7
B_Bri_HA_CR9114	< 7	< 7	< 7	9,4	7,4		8,6	7,5
B_Bri_HA_SD1083		< 7		8,9				
B_Bri_HA_SD1084		< 7		< 7	9,7			
B_Bri_HA_SD1085		< 7		8,7				
B_Bri_HA_SD1086		< 7		9,1				
B_Bri_HA_SD1087		< 7		9,0	< 7			
B_Flo_HA_CR8033				< 7	8,5	< 7	< 7	< 7
B_Flo_HA_CR8071				< 7	< 7		< 7	
B_Flo_HA_CR9114				9,3	8,0		8,0	8,8
B_Flo_HA_SD1083		< 7		9,0				
B_Flo_HA_SD1084		< 7		< 7				
B_Flo_HA_SD1085		< 7		8,9				
B_Flo_HA_SD1086		< 7		9,2				
B_Flo_HA_SD1087		< 7		9,1				

Блокирование связывания с рецептором - ингибирование гемагглютинации.

Анализ ингибирования гемагглютинации, общепринятый вариант анализа HA, применяли для тестирования sdAb на предмет их способности связываться вблизи верхней части области, представляющей собой головку, и физически блокировать взаимодействие с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту, на клетках-мишенях, в данном случае эритроцитах. Если sdAb в достаточной концентрации блокировало взаимодействие с сиаловой кислотой, то "агглютинация" (эритроциты агрегируют вместе) ингибировалась. Серийное разбавление sdAb готовили в PBS (25 мкл/лунка) и добавляли 25 мкл вируса в разбавлении 8 HAU/50 мкл, перемешивали. После инкубации в течение 1 ч при 37°C добавляли 50 мкл 1% эритроцитов индюка (TRBC) и перемешивали. После инкубации в течение 30-60 мин при RT визуально оценивали профиль агглютинации (образование "капель"). Кроме образцов в четырех повторностях и антител положительного контроля, брали образец после обратного титрования исходного вируса. Титр ингибирования гемагглютинации, минимальная концентрация, при которой полностью блокируется взаимодействие вируса с рецепторами на TRBC, содержащими сиаловую кислоту, рассчитывали с использованием формулы Спирмена-Карбера.

Результаты показаны в табл. 12. Все sdAb, связывающие вирус гриппа А, были отрицательными (то есть характеризовались титрами HI>50 мкг/мл).

Таблица 12. Титры ингибирования гемагглютинации (мкг/мл)
однодоменных антител (пустые ячейки означают "не тестировали")

	В				H5N1
	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06	B/Harbin/7/94	B/Lee/40	A/Vietnam/1194/04
SD1083	>50	>50	>50	>50	>50
SD1084	0,07	0,42	1,10		>50
SD1087	>50	>50	>50	>50	>50

Наряду с его профилем связывания и нейтрализации, было показано, что SD1084 является эффективной молекулой, связывающей головку HA, и предотвращает связывание с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту.

Ингибирование конформационного изменения HA посредством связывания sdAb в стебле.

Для подтверждения того, что связывание sdAb стебля, аналогично связыванию антител, с которыми они конкурируют, предотвращает конформационное изменение HA, и тем самым блокирует слияние вируса и последующее инфицирование, был разработан анализ, с помощью которого определяют присутствие головки HA (HA1) после обработки при низком pH и восстановления соединяющего дисульфидного мостика между HA1 и HA2 (Brandenburg et al., 2013).

Анализ конформационного изменения основан на безмаркерном выявлении и осуществляется с применением платформы для интерферометрии биослоев Octet Red384 (Forte Bio, Pall). Сперва партию биотинилированного по С-концу рекомбинантного HA расщепляли (250 мкг HA инкубировали с 10 мкл 0,05% трипсин-EDTA в течение 20 мин при 37°C, затем добавляли 30 мкл DTT для остановки активности трипсина). Затем HA (2 мкг/мл) захватывали на сенсорах со стрептавидином (Forte Bio, № 18-5020 по каталогу) на приборе Octet с последующим инкубированием с партнером по связыванию (sdAb, антитела положительного и отрицательного контроля в концентрации до 50 нМ). После данной стадии инкубации сенсоры будут подвергаться воздействию в диапазоне pH (pH 6,5-5,0 с шагом 0,2 pH). Если партнер по связыванию не стабилизировал и не блокировал HA, то он будет претерпевать конформационное изменение; домен HA1 головки отдаляется, тогда как домен HA2, охватывающий механизм слияния, разворачивает и выпячивает пептид слияния наружу. HA1 теперь соединен только с HA2 посредством дисульфидного мостика, который может быть восстановлен путем воздействия DTT на заключительной стадии анализа (50 mM DTT в PBS). Затем HA1 будет диссоциировать от биотинилированного домена HA2, что обеспечит выявление значительной потери массы на детекторе. Результаты обобщены в табл. 13.

Таблица 13. Предотвращение конформационного изменения НА с помощью однодоменных антител "++" обозначает сильное и "+" обозначает среднее ингибирование конформационного изменения НА. "-" обозначает отсутствие ингибирования. Пустые ячейки означают "не тестировали"

	H1	H3	H7	H7	Victoria
	A/Brisbane/59/07	A/HK/1/68-MA	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	A/Hangzhou/1/2013	B/Brisbane/60/08
SD1036	-	++	++	++	-
SD1038	++	+	+/-	+/-	-
SD1046	+	++			-
SD1069	++	++			-
SD1083	-	-			++
SD1084	-	-			-
SD1087	-	-			++

Результаты показывают, что sdAb, связывающие стебель НА, способны предотвращать конформационное изменение НА в соответствии с их профилем нейтрализации. Для такой способности необходимо, чтобы sdAb оставалось связанным при низком pH, аналогично условиям в поздних эндосомах. Уровень блокирования конформационного изменения положительно коррелирует с их титром нейтрализации соответствующих штаммов вируса.

Последовательности однодоменных антител.

Последовательности отобранных и охарактеризованных sdAb в соответствии с настоящим изобретением представлены в табл. 14. Последовательности CDR-областей представлены в табл. 14a.

Таблица 14. Последовательности однодоменных антител в соответствии с настоящим изобретением

Класс	Однодо- менное	Последовательность	SEQ ID NO:
A g1	SD1018	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGQTYHMGWFRQTPGNERESVAAVTWSGAV TRYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLPEDTAIYYCAATRSMAPIIQLSPG SYDYWGPGTQVTVSS	1
A g1	SD1071	EVQLVESGGGLVQTGESLRLSCAFSGFTYSTYWMYWVRQGPEKGLKWSSTNAA GTVTYAANVRDRFTASKDNAKNTLYLQMNRLKPEDTGLYYCASKDGLIVAATL DDYDYGQGTQVTVSS	2
A g1	SD1035	EVQLVESGGGLVQAGGTLRLSCAASGSASVISRMAWYRQAPGKQRELVDIFSG GGTNYADSVKGRFTISRDNANKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCSARSAAVIAHWDQ YDYWGQGTQVTVSS	3
A g1	SD1016	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGMFFGIAAMGWYRQAPGKQRELVANITSD FSTNYADSVKDRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSLGTGWRHYY YWGQGTQVTVSS	4
A g1	SD1072	EVQLVESGGGLVEAGGSLRLSCAVSGRTFSMYATGWFRQAPGKEREVFAAINSS GDKTTYADSVGRFTISRDIGTVYLQMNNLNPEDTAVYYCAAARTLAVVTIPGG YEYWGQGTQVTVSS	5
A g1	SD1074	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRNFDAGAMGWYRQAPGKQRELVAEITSD GSTNYTDSVKGRFTISRDNALRTMYLQMNALPEPDTAVYYCKADISYGLTNFP YWGQGTQVTVSS	6
A g1	SD1076	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAGSGFAFSIATMGWYRQAPGKQRELVDITSG GSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNADSLATGWRQYS YWGKGTQVTVSS	7
A g2	SD1017	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYAMAWFRQAPGKEREVFAHINALGTR AYYSDSVGRFTISRDNANKNTGYLQMNSLEPDTAVYVCAAGGQWRAAPVADAA QYDFWGQGTQVTVSS	8
A g2	SD1025	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYAMAWFRQAPGKEREVFAHINALGTR TYYSDSVQGRFTISRDNANKNTEYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGQWRAAPVADAA QYDFWGQGTQVTVSS	9
A g2	SD1070	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSIYSMGWFRQAPGKEREVATIGWN SGRTFYADSMKERFTISADNARNLTLYLQMNSLKFEDTAVYYCAAAGPLRLSSQ ADYWGQGTQVTVSS	10
A g2	SD2020	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGAFNRQLVAWFRQAPGKKREFVATVTTS GGSSYYADSVKGRFTISRDTAKNTVALQMNSLKAEDAAVYYCAARDSFTVAPYY PPESYAYWGQGTQVTVSS	11
A g1+g2	SD1069	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFGMSAMGWFRQAPGKEREVFAAISGL GNPNYSDDVKGRFTISRENGRNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAQRKVYHVQGGDR	12

		PQAYDYWGQGTQVTVSS	
A g1+g2	SD1046	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGRTLSIYSMGWFRQAPGKEREFFVATIGWN SGRTFYFDSLKGRTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQ ADYWGQGTQVTVSS	13
A g1+g2	SD1048	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGRTSSMYSIGWFRQAPGKEREFFVAVIGWY SGRTFYTDMSKGRFTISRDNARNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAANGPLRLSNQ ADYWGQGTQVTVSS	14
A g1+g2	SD1049	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLSLYSVGWFRQAPGKEREFFVATIGWN SGRTFYVDSMKGRFTISRDNANKTVYLQMNDLKVEDTAVYYCAAAGPLRLSNQ ADYWGQGTQVTVSS	15
A g1+g2	SD1027	EVQLVESGGGMVQAGGSLRLSCAASGGTFSLYHMGWFRQAPGEEREFFVAISGS GGNTYYADSVKGRFTISRDNKNKTVYLQMSLLEPEDTAVYFCAAMKWPGILRDA NAYDYWGQGTQVTVSS	16
A g1+g2	SD1036	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFFVAHINALGTR TYYSDSVKGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAA EYEFWGQGTQVTVSS	17
A g1+g2	SD1014	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAASGRTYAMAWFRQAPGKEREFFVAHINALGTR TYYSDSVKGRFTISRDNANKTEYLQMNLSLNPEDTAVYYCAAGGQWRAAPVADAA QYDFWGQGTQVTVSS	18
A g1+g2	SD1047	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLISCAASGRTYAMAWFRQAPGKEREFFVAHINALGTR TYYSDSVKDRFTISRDNANKTEYLQMNLSLKPEDTAVYYCVAGGQWRAAPVAAAE SYDFWGQGTQVTVSS	19
A g1+g2	SD1038	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVLVATSRFD GSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYLCVSLYRDPLGVAG GMGVYWGKGALVTVSS	20
A g1+g2	SD1045	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSFSINVMGWYRQAPGKQRELVATITYG GSTNYVDSVKGRFTISRDNANKTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNSRLAQINYWGQG TQVTVSS	21
A g1+g2	SD1073	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSAFSAAMGWYRQAPGKQRELVATITTG GSTNYADSVKGRFTISRDNKNTAYLQMNLSLKPEDTAVYYCTAKSVVAETFGDL YNYWGQGTQVTVSS	22
A g1+g2	SD1034	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTIFGIRVNTMGWYRQAPGEQRELVATIT RSGGTNYADSVKDRFTISGDFAKDTVYLQMMHLKPEDTAVYYCNGRWALTDYWG QGTQVTVSS	23
B	SD1083	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKS GSWTTYTDMSMRGFTISRDNANTVYLQMSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWD GTTFSRLASSWGQGTQVTVSS	24
B	SD1084	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTD GGTTYADSVKDRFTISRDNAKDTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQ GTQVTVSS	25
B	SD1085	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREGITCISSG HGMTYYADSVKGRFTVSTDNAKNTVYLQMNLQPEDTARYYCATESRYYCSDNW PAPQRYIYWGGGTQVTVSS	26
B	SD1087	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREGITCISSG HGMTYYADSVKGRFTVSTDNAKNTVYLQMNLQPEDTARYYCATESRYYCSDNW PAPQRYIYWGGGTQVTVSS	27
B	SD1086	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSISSIDYMRWYRQYPGKHRELVATITSG GAADSRDSVKGRFTVSRGNAANTMYLQMNLSLKPEDTAVYYCNAYGLEIGHWGR	28

		GTQVTVSS	
B	SD2086	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGQTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWN GGSTYYADSVKGRFTISRESPENLVYLQMNLSKPEDTAVYYCAARGAYYTGSY LGSTYDYWGQGTQVTVSS	29

Таблица 14а. Последовательности CDR-областей однодоменных антител в соответствии с настоящим изобретением

	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
SD1018	QTYHMG (227)	AVTWSGAV (228)	AATRSMAPIIQLSPGSYDY (229)
SD1071	FTYSTYWMY (230)	STNAAGTV (231)	ASKDGLIVAATLDDYDY (232)
SD1035	SAVSISRMA (233)	DIFSGGG (234)	SARSAVAIIHWDQYDY (235)
SD1016	MFFGIAAMG (236)	NITSDFS (237)	AADSLGTGWRHYYY (238)
SD1072	RTFSMYATG (239)	AINSSGDK (240)	AAARTLAVVTIPGGYDY (241)
SD1074	NFDAIGAMG (242)	EITSDGS (243)	KADISIYGLTNFPY (244)
SD1076	FAFSIATMG (245)	DITSGGS (246)	NADSLATGWRQYSY (247)
SD1017	RTYAMA (248)	HINALGTR (249)	AAGGQWRAAPVADAAQYDF (250)
SD1025	RTYAMA (251)	HINALGTR (252)	AAGGQWRAAPVADAAQYDF (253)
SD1070	RTFSIYSMG (254)	TIGWNSGR (255)	AAAKGPLRLSSQADY (256)
SD2020	GAFNRQLVA (257)	TVTTSGGS (258)	AARDSFTVAPYPPESYAY (259)
SD1069	PTFGMSAMG (260)	AISGLGN (261)	AQRKVYHVQGGDRPQAYDY (262)
SD1046	RTLSIYSMG (263)	TIGWNSGR (264)	AAAKGPLRLSSQADY (265)
SD1048	RTSSMYSIG (266)	VIGWYSGR (267)	AAANGPLRLSNQADY (268)
SD1049	RTLSLYSVG (269)	TIGWNSGR (270)	AAAKGPLRLSNQADY (271)
SD1027	GTFSLYHMG (272)	AISGSGGN (273)	AAMKWPGILRDANAYDY (274)
SD1036	RTYAMG (275)	HINALGTR (276)	TAQGQWRAAPVAVAAEYEF (277)
SD1014	RTYAMA (278)	HINALGTR (279)	AAGGQWRAAPVADAAQYDF (280)
SD1047	RTYAMA (281)	HINALGTR (282)	VAGGQWRAAPVAAAESYDF (283)
SD1038	SIFDIYAMD (284)	TSFRDGS (285)	HVSLYRDPLGVAGGMGVY (286)
SD1045	SSFSINVMG (287)	TITYGGS (288)	NSRLAQINY (289)
SD1073	SAFSIAAMG (290)	TITTGGS (291)	TAKSVVAETFGDLNY (292)
SD1034	TIFGIRVNTMG (293)	TITRSGG (122)	NGRWALTDY (123)
SD1083	FTLENKAIG (124)	CISKSGSW (125)	ATTAGGGGLCWDGTTFSRLASS (126)
SD1084	FTFSTSWMY (127)	VINTDGG (128)	AKDWGGPEPT (129)
SD1085	LSLDYAVG (130)	CISSGHGM (131)	ATESRYYCSDNWPAPQRYIY (132)
SD1087	LSLDYAVG (133)	CISSGHGM (134)	ATESRYYCSDNWPAPQRYIY (135)
SD1086	SISSIDYMR	TITSGGA (137)	NAYGLEIGAH (138)
	(136)		
SD2086	QTFSSYAMG (139)	AISWNGGS (140)	AARGAYYTGSYLSTYDY (141)

В заключение, анализы нейтрализации вируса, проведенные с использованием очищенных конст-рукций мономерных sdAb, подтвердили наличие четырех различных классов sdAb: sdAb, нейтрализую-

щих вирус гриппа А группы 1, А группы 2, А группы 1 и группы 2 или вирус гриппа В. Тем не менее, исследования по связыванию показали, что многие sdAb, нейтрализующие вирусы гриппа А группы 1 или А группы 2, также могут связывать НА, принадлежащие к группе, которую они не нейтрализуют. Это дает в результате значительно большее число sdAb, связывающих вирусы гриппа А группы 1 и А группы 2. SdAb, которые могут нейтрализовать или, по меньшей мере, связывать вирусы гриппа А и В, не были обнаружены. SdAb, способные связывать и нейтрализовать в широком диапазоне, были отобраны для дополнительного определения характеристик (в том числе SD1038, SD1036, SD1083 и SD1084). Определение аффинности к НА показало положительную корреляцию между силой связывания и титром нейтрализации отобранных sdAb. С помощью картирования эпитопов посредством конкурентных анализов с использованием известных молекул, связывающих НА, было выявлено, что все из них, кроме SD1084, связываются с консервативным участком стебля НА. Концентрация, при которой происходило конкурентное связывание, положительно коррелирует с титром нейтрализации, что означает, что более сильное связывание и конкуренция обеспечивают более низкие титры нейтрализации. С другой стороны, SD1084 связывается с участком связывания сиаловой кислоты головки НА или вблизи него, как продемонстрировано в анализе ингибирования гемагглютинации, и может обеспечивать предупреждение проникновения вируса гриппа в клетку за счет блокирования связывания с рецептором. Все остальные sdAb могут связывать НА1 и НА2 в стебле НА и предотвращать конформационное изменение НА во время процесса слияния, как показано в анализе конформационного изменения.

Пример 7. Образование и определение характеристик гомо- и гетеродимеров sdAb.

Образование гомо- и гетеродимеров sdAb.

Для создания гомо- и гетеродимеров sdAb последовательности, кодирующие sdAb, либо клонировали вместе, либо непосредственно синтезировали полноразмерный ген (Genscript) и лигировали в эукариотический вектор экспрессии. В конструкциях димерных sdAb С-конец первого sdAb (передняя сторона) был связан с N-концом второго sdAb (задняя сторона). Линкерные последовательности различной длины (10, 15, 35 и 57 аминокислот) состоят из аминокислот, представляющих собой глицин (G) и серин (S). При клонировании вместе сайт рестрикции (NotI) расположен непосредственно после первого sdAb, что приводит к образованию трех дополнительных аланиновых (A) остатков. Линкерные последовательности показаны в табл. 15, а полные аминокислотные последовательности димеров sdAb показаны в табл. 16 (конструкции, нацеленные на вирус гриппа А) и в табл. 17 (конструкции, нацеленные на вирус гриппа В). Расположение sdAb (спереди или сзади) в конструкциях варьировалось с целью обеспечения наиболее оптимальной комбинации. Экспрессию и очистку осуществляли, как описано в примере 5.

Таблица 15. Линкерные последовательности для образования конструкций мультидоменных антител

Тип	Последовательность
10GS-линкер	GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 142)
15GS-линкер	GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 143)
35GS-линкер	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 144)
57GS-линкер	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 145)

Таблица 16. Последовательности гомо- и гетеродимеров SD103 6 и SD1038

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO:
MD1213	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRITYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTY YSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGTQVTVSSAAAGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGR ITYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNL KPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS	30
MD1209	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRITYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTY YSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGTQVTVSSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQAGGSLKLSCAASGRITYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKG RFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQV TVSS	31

MD1215	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTY YSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGTQVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKE REFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQG QWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS	32
MD1214	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGS TNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGV YWKGALVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASG RTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNN LKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS	33
MD1211	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGS TNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGV YWKGALVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVK GRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQ VTVSS	34
MD1210	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTY YSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGTQVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNYADSV KGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWKGAL VTVSS	35
MD1212	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGS TNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGV YWKGALVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNYADS VKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWKGAL LTVTVSS	36
MD1216	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGS TNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGV YWKGALVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGK EREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQ GQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS	37

Таблица 17. Последовательности гомо- и гетеродимеров SD1083 и SD1084

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO:
MD1221	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGS WTTYTDSMRGRFTISRDN AENTVY LQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTF SRLASSWGQGTQVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSW TTYTDSMRGRFTISRDN AENTVY LQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTF'S RLASSWGQGTQVTVSS	38
MD1222	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGS WTTYTDSMRGRFTISRDN AENTVY LQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTF SRLASSWGQGTQVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGT YYADSVKDRFTISRDN AKDTLY LQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVT VSS	39
MD1223	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGG TTYADSVKDRFTISRDN AKDTLY LQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQV TVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTTYTDSMRGRFTI SRDN AENTVY LQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVT VSS	40
MD1224	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGG TTYADSVKDRFTISRDN AKDTLY LQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQV TVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRFTIS RDN AKDTLY LQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS	41

Нейтрализация вируса гриппа гомо- и гетеродимерами sdAb.

Очищенные гомо- и гетеродимеры sdAb тестировали в анализах нейтрализации вируса гриппа, как описано в примере 6, и они показали улучшенную эффективность и спектр нейтрализации по сравнению со структурными блоками sdAb. Результаты для димеров, нейтрализующих вирус гриппа А, показаны в табл. 18, а для димеров, нейтрализующих вирус гриппа В, - в табл. 19.

Таблица 18. Титры нейтрализации вируса гриппа гомо- и гетеродимеров SD1036 и SD1038 (для сравнения также приведены титры sdAb SD1036 и SD1038, пустые ячейки означают "не тестировали")

	H1N1	H1N1	H5N1	H3N2
Конструкция	A/California/07/09	A/Puerto Rico/8/34-MA	A/Vietnam/1194/04	A/Wisconsin/67/05
SD1036	<1000	<1000	<1000	<1000
SD1038	17,5	8,8	30,1	<1000
MD1213	2,4	27,8	<1000	18,6
MD1209	10,1	221,2	<1000	109,1
MD1215	4,1	39,6	917,9	34,1
MD1212	3,7	11,7	14,8	49,5
SD1036+SD1038		6,8	19,3	<1000
MD1214	1,4	7,5	0,9	12,5
MD1211	4,0	9,9	7,6	19,3
MD1210	2,5	21,9	21,4	118,3
MD1216	1,4	9,7	3,4	12,1

Таблица 19. Титры нейтрализации вируса гриппа гомо- и гетеродимеров SD1083 и SD1084 (для сравнения также приведены титры sdAb SD1083 и SD1084, пустые ячейки означают "не тестировали")

	Victoria		Yamagata		Old
Конструкция	B/Brisbane/60/08	B/Malaysia/2506/04	B/Florida/04/06	B/Harbin/7/94	B/Lee/40
SD1083	178,5	293,8	219,7	258,9	216,7
SD1084	20,5	34,9	68,8	240,0	<1000
MD1221	23,4		76,4		32,5
MD1222	3,0	3,6	2,1	7,2	12,7
MD1223			2,3		18,0
MD1224	4,1	2,7	0,8	4,5	33,0

Связывание НА гомо- и гетеродимерами sdAb.

Очищенные гомо- и гетеродимеры sdAb тестировали в анализах связывания, как описано в примере 6, и они показали увеличенную силу связывания (авидность) по сравнению со структурными блоками

sdAb. Результаты для димеров, нейтрализующих вирус гриппа А, показаны в табл. 20.

Таблица 20. Средние геометрические значения K_D (нМ) для гомо- и гетеродимеров SD1036 и SD1038 (пустые ячейки означают "не тестировали")

	H1N1	H3N2	H3N2	H7N3
	A/New Caledonia/20/1999	A/Wisconsin/67/05	A/Brisbane/10/2007	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)
MD1210	0,7		1,7	1,2
MD1212	1,4	0,8	2,3	1,5
MD1211	1,7	0,9	1,8	2,1
MD1209	1,9		1,8	1,4

Пример 8. Образование и определение характеристик конструкций мультидоменных антител.

Образование мультимеров sdAb.

Для создания мультимеров sdAb (тримеров, тетрамеров и пентамеров) последовательности, кодирующие sdAb, либо клонировали вместе, либо непосредственно синтезировали полноразмерный ген (Genscript) и лигировали в эукариотический вектор экспрессии. Линкерные последовательности различной длины (10 или 35) состояли из аминокислот, представляющих собой глицин (G) и серин (S). При клонировании вместе сайт рестрикции (NotI) расположен непосредственно после первого sdAb, что приводит к образованию трех дополнительных аминокислот, представляющих собой аланин (A), и при этом 2 последовательных сайта рестрикции (PacI и XhoI) расположены непосредственно после второго sdAb, что приводило к образованию пяти дополнительных аминокислот (LINLE). Линкерные последовательности показаны в табл. 15 и полные аминокислотные последовательности тримеров sdAb показаны в табл. 23, а тетрамеры и пентамеры sdAb показаны в табл. 24. Расположение sdAb в конструкциях варьировалось с целью обеспечения наиболее оптимальной комбинации. Экспрессию и очистку осуществляли, как описано в примере 5.

Таблица 23. Последовательности тримерных конструкций мультидоменных антител

Конструкция (SEQ ID NO:)	Последовательность
MD1301 (42)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYAD SVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTV SSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLS CAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNN LKPEDTAVYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSLINLEGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPAGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFR QTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATT TAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD1302 (43)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYAD SVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTV SSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLS CAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNN LKPEDTAVYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSLINLEGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPAGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLR QAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNAKDTLYLQMSLSKSEDTAVYYCAKDW GGPEPTRGQGTQVTVSS
MD2301 (44)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYT DSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQ GTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQ RDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLG VAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMG WFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNNLKPEDTAVYYC TAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
MD2302 (45)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYAD SVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTV SSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVL CISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGT TFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMG WFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNNLKPEDTAVYYC TAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
MD2303 (46)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYAD SVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTV SSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHIN

	ALGTRTTYSDSVKGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQQQWRAAPVAVAAEY EFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFR QTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATT TAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2304 (47)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYT DSMRGRFTISRDNAAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQ TQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQ RDLVATSFDRGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRDPLG VAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIY AMDWYRQAPGKQRDLVATSFDRGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVY LCVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
MD2305 (48)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSFDRGSTNYAD SVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTV SSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVL CISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDGT TFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIY AMDWYRQAPGKQRDLVATSFDRGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVY LCVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
MD2306 (49)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSFDRGSTNYAD SVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTV SSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVA TSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRDPLGVAGGM GVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWF RQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAT TTAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2307 (50)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYT DSMRGRFTISRDNAAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQ TQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGRTLSIYSMGWFRQAPGKE REFVATIGWNSGRTFYFDSLKGRTISRDNARNTLYLQMNNLRPEDTAVYYCAAAGPLRL SSQADYWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGPTFGMSAM GWFRQAPGKEREFVAAISGLGNPNYSDDVKGRFTISRENGRNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AQRKVYHVQGGDRPQAYDYWGQGTQVTVSS
MD2308 (51)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGRTLSIYSMGWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYF DSLKGRTISRDNARNTLYLQMNNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGTQVTVSS GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDGTTF SRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGPTFGMSAM GWFRQAPGKEREFVAAISGLGNPNYSDDVKGRFTISRENGRNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AQRKVYHVQGGDRPQAYDYWGQGTQVTVSS
MD2309	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGRTLSIYSMGWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYF

(52)	DSLKGRFTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGTQVTVSS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFGMSAMGWFRQAPGKEREFVAAI SGLGNPNYSDDVKGRFTISRNGRNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAQRKVYHVQGGDRPQAY DYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFR QTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNARENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATT TAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2310 (53)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYT DSMRGRFTISRDNARENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFGMSAMGWFRQAPGKE REFVAAISGLGNPNYSDDVKGRFTISRNGRNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAQRKVYHVQ GDRPQAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTLSI YSMGWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYPDLSKGRFTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTA VYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGTQVTVSS
MD2311 (54)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFGMSAMGWFRQAPGKEREFVAAISGLGNPNYS DDVKGRFTISRNGRNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAQRKVYHVQGGDRPQAYDYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGV LCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNARENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDG TTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTLSI YSMGWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYPDLSKGRFTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTA VYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGTQVTVSS
MD2312 (55)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFGMSAMGWFRQAPGKEREFVAAISGLGNPNYS DDVKGRFTISRNGRNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAQRKVYHVQGGDRPQAYDYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTLSIYSMGWFRQAPGKEREFV ATIGWNSGRTFYPDLSKGRFTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQA DYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFR QTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNARENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATT TAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2313 (56)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTLSIYSMGWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFY PDLSKGRFTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGTQVTVSS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTLSIYSMGWFRQAPGKEREFVATI GWNSGRTFYPDLSKGRFTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQADY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQ TPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNARENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATT TAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2314 (57)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFGMSAMGWFRQAPGKEREFVAAISGLGNPNYS DDVKGRFTISRNGRNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAQRKVYHVQGGDRPQAYDYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFGMSAMGWFRQAPGKEREFV AAISGLGNPNYSDDVKGRFTISRNGRNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAQRKVYHVQGGDRP QAYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIG WFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNARENTVYLQMDSLKPEDTAVYYC

	ATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2317 (58)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGRTL SIYSMGWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFY PDSLKGRFTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2320 (59)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLISCAASGRTL SIYSMGWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFY PDSLKGRFTISRDNARNTLYLQMNLRPEDTAVYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2322 (60)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSS

Таблица 24. Последовательности тетрамерных и пентамерных конструкций мультидоменных антител

Конструкция (SEQ ID NO:)	Последовательность
MD2401 (61)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNMLKPEDTAVYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSLINLEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSPAGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2402 (62)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAG

	GSKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNKN TEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSLINLEGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPAGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATG FTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMD LKPEDTAVYYCATTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSAAAGGGSGGGSGG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYW LRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNKDTLYLQMSLKSSEDVAVYYC AKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS
MD2403 (63)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNY ADSVKGRFTISRDNKNLTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAG GSKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNKN TEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSLINLEGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPAGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNKDTLYLQMSL KSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGV LCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDLSKPEDTAVYYCATTAGGGLCWD GTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
MD2404 (64)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNY ADSVKGRFTISRDNKNLTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAG GSKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNKN TEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSLINLEGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPAGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNKDTLYLQMSL KSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWV SVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNKDTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQ GTQVTVSS
MD2405 (65)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNY ADSVKGRFTISRDNKNLTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSLINLEGGGG SGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPAGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNKDTLYLQMS LKSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSAAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEW VSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNKDTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRG QGTQVTVSS

MD2406 (66)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRDGSTNY ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGK QRD LVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSIS IFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLK PEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRDGSTNYADSVKGRFTIS RDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
MD2407 (67)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRDGSTNY ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKERE FVAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFT LENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNANTVYLQMDSLK PEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDR FTISRDNAKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS
MD3401 (68)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRDGSTNY ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGK QRD LVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGF TLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNANTVYLQMDSL KPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKD RFTISRDNAKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS
MD3402 (69)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRDGSTNY ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTLISYMGWFRQAPGK EREFVATIGWNSGRTFYPDSLKGRFTISRDNANTLYLQMNNLRPEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTL ENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNANTVYLQMDSLKP EDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESG GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDRF TISRDNAKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS
MD3403 (70)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPTFGMSAMGWFRQAPGKEREFVA AISGLGNPNY ADDVKGRFTISRDEGRNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAQRKVYHVQGGDRPQAYDYWGQG TQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKER EFVAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRA APVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGF

	TLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNARENTVYLQMDSL KPEDTAVYYCATTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKD RFTISRDNADTLYLQMSLSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS
MD3404 (71)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNY ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKERE FVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNLSKPEDTAVYYCTAQGWRAA PVAAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVISGLS LDITYAVGWFRQAPGKEREGITCISSEGHGMTYYADSVKGRFTVSTDNAKNTVYLQMNGLQ PEDTARYYCATESRYCSDNWPAPQRYIYWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRFT ISRDNADTLYLQMSLSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS
MD3405 (72)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNY ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKERE FVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNLSKPEDTAVYYCTAQGWRAA PVAAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGQT FSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWNGGSTYYADSVKGRFTISRRESPENLVYLQMNLSK PEDTAVYYCAARGAYTGSYYLGSTYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRFTI SRDNADTLYLQMSLSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS
MD2501 (73)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFDRGSTNY ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKGA LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGK QRDVATSFDRGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGR TYAMGWFRQAPGKEREFVVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNLSKPE DTAVYYCTAQGWRAAPVAAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTIS RDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSV INTDGGTTYADSVKDRFTISRDNADTLYLQMSLSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQG TQVTVSS

Нейтрализация вируса гриппа мультидоменными антителами.

Очищенные мультидоменные антитела тестировали в анализах нейтрализации вируса гриппа, как описано в примере 6, и при этом они показали улучшенную эффективность и спектр нейтрализации по сравнению со структурными блоками sdAb. Результаты для тримеров, нейтрализующих вирус гриппа, показаны в табл. 25, а результаты для тетрамеров и пентамеров показаны в табл. 26.

Таблица 25. Средние титры нейтрализации (нМ) для тримерных конструкций мультидоменных антител (пустые ячейки означают "не тестировали")

Конструкция	H1N1		H5N1	H2N2	H3N2			H7N3	H7N7	H7N9	B
	A/New Caledonia/20/99	A/Puerto Rico/8/34-MA	A/Vietnam/1194/04	A/Guizhou/1/57	A/WF/HK/MPU3156/05	A/Brisbane/10/07	A/Wisconsin/67/05	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	A/PR8 H7N7-NY	A/Anhui/1/13	B/Florida/04/06
MD2301	14,7						34,7				412, 3
MD2302	14,7						34,7				412, 3
MD2303	7,2	9,1	9,1			12,8	15,0	10,2	18,2		412, 3
MD2304	20,6						18,2				
MD2305	4,3						21,7				
MD2306	6,1		4,7			10,7	5,4	15,4			
MD2307			21,6			30,4		18,1			
MD2308			21,6			15,3		12,8			
MD2309			12,8			12,8		9,1			
MD2310			21,6			25,5		30,4			
MD2311			12,8			21,6		15,3			
MD2312			5,8	<100 0	21,6	18,1		7,7		43,2	
MD2313			>100 0			7,7		6,5		21,7	
MD2314			6,5			>100 0		>100 0			
MD2317							12,8	12,8	12,8		
MD2320							>100 0	15,3	15,3		
MD2322							7,3	6,1	14,7		

Таблица 26. Средние титры нейтрализации (нМ) для тетрамерных и пентамерных конструкций мультидоменных антител (пустые ячейки означают "не тестировали")

Тип	Штамм вируса	MD2401	MD2402	MD2404	MD2406	MD2407	MD2408	MD2409	MD2410	MD2411	MD2412	MD2413	MD2501
H1N1	A/California/07/09					3,4							3,0
H1N1	A/New Caledonia/20/99					5,7							4,8
H1N1	A/Puerto Rico/8/34- MA	14, 7	12, 8	12, 2		7,3							8,5
H1N1	A/Brisbane/59/07					3,7							3,0
H1N1	A/Mississippi/03/01 274H					4,8							4,9
H1N1	A/Solomon Islands/3/2006 (IVR 145)					5,4							3,9
H1N1	A/WSN/33					4,8							2,9
H1N1	A/HK/54/98					10, 3							
H1N1	A/Christchurch/16/1 0					1,3							1,3
H1N2	A/Env/HK/MPU3156/05					25, 6							
H5N1	A/PR8 H5N1 HK97					3,6							4,9
H5N1	A/Vietnam/1194/04	27, 7	23, 8	20, 4		9,2							6,5
H5N1	A/Indonesia/5/05					16, 2							
H5N2	A/Eurasian Wigeon/MPF461/07					16, 6							
H5N2	A/Eurasian Wigeon/HK/MPF333/07					26, 0							
H2N2	A/Guiyang/1/57					125, 6							19, 9

2N2	A/AnnArbor/23/57					101, 2							
2N2	A/Env/HK/MPU3156/05					19, 2							
H6N1	A/Eurasian Wigeon/MPG1884/09					20, 6							16, 0
H6N1	A/Taiwan/2/2013					36, 3							
H6N8	A/Eurasian Wigeon/MPD411/07					20, 9							
H11N9	A/Northern Pintail/MPC2085/07					34, 5							16, 0
H9N2	A/Ck/HK/SSP176/09					23, 0							
H9N2	A/Great Cormorant/MP2934/04					19, 6							
H9N2	A/HK/466419/09					53, 9							16, 0
H8N4	A/Eurasian Wigeon/MPH571/08					15, 1							16, 0
H8N2	A/Env/MPJ1258/09					8,8							
H12N5	A/Env/MPK659/09					>10 00							
H3N2	A/Brisbane/10/07					10, 6	6,8	13, 6	19, 2	6,8	11, 5	9,7	9,6
H3N2	A/HK/1/68-MA	27, 7	28, 3	57, 7		25, 9							19, 0
H3N2	A/Panama/2007/99					14, 9							18, 1
H3N2	A/Wisconsin/67/05				4,6	19, 1							14, 1
H3N2	A/Fukui/45/04					19, 2							21, 2
H3N2	A/Aichi/2/68					9,9							12, 6
H3N2	A/Hiroshima/52/05					10, 5							6,5
H3N2	A/Johannesburg/33/9					11,							11,

	4					6							6
H3N2	A/Perth/16/09					8,1							5,7
H3N2	A/Victoria/210/09					6,5							5,8
H3N2	A/HK/1174/99					76, 0							
H3N?	A/Env/MPJ193/09					24, 5							
H4	A/WF/HK/MPA892/06					6,8							3,9
H4N1	A/Northern Pintail/MPB1368/06					8,2							
H4N6	A/Great Cormorant/MPB1683/06					4,8							
H14N5	A/Mallard/Astrakhan /263/1982					19, 2							15, 6
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/Netherla nds/12/00)	27, 7	33, 6	34, 3	4,6	13, 8							13, 8
H7N7	A/PR8 H7N7-NY				11, 0	22, 3	27, 2	19, 2	27, 1	19, 3	19, 3	16, 3	14, 0
H7N7	A/Northern Shoveler/MPF518/08					36, 1							
H7N7	A/Netherlands/219/2 003					33, 0							
H7N7	A/Common Teal/MPF139/07					57, 4							
H7N9	A/Anhui/1/13					64, 6							73, 8
H7N9	A/Shanghai/1/13 (мутант по R292K, избежавший действия тамифлю)					87, 1							63, 0
H7N9	A/Shanghai/2/13					54, 2							36, 5
H10N7	A/Chick/Germany/N/4 9					13, 2							14, 9
H10N8	A/Jiangxi/346/2013					30, 4							

H10N3	A/Common Teal/MPH11/08					19, 3							
H10N9	A/Northern Shoveler/MPE2531/08					35, 0							
Victoria	B/Brisbane/60/08					4,1	27, 2	64, 6	22, 8	38, 6	38, 6	19, 3	5,0
Victoria	B/Malaysia/2506/04					9,2	38, 4	38, 4	38, 3	38, 6	38, 6	38, 7	8,8
Yamagata	B/Florida/04/06	277, 1	14, 1	2,1		7,6	64, 6	108, 7	91, 2	38, 6	38, 6	38, 7	8,3
Yamagata	B/Harbin/7/94					6,4	27, 2	64, 6	19, 2	22, 9	38, 6	19, 3	4,3
Yamagata	B/Massachusetts/02/ 12					3,0							4,0
Old	B/Lee/40	164, 8	35, 4	30, 3		18, 4	32, 3	38, 4	19, 2	38, 6	45, 9	38, 7	14, 6

Связывание мультидоменного антитела с НА.

Безмаркерную интерферометрию биослоев применяли для определения равновесных констант диссоциации (значений K_D) как меры сил связывания между мультидоменными антителами и рекомбинантными молекулами НА различных штаммов вируса гриппа при pH 7,4. Значения K_D определяли с помощью аппроксимации ответов связывания MD в диапазоне концентраций в устойчивом состоянии (средний ответ связывания в последние 10 с, измеренный при достижении плато в фазе ассоциации) с получением концентрации при 50% насыщения, которая отображает значение K_D ($R=R_{\max} * [sdAb]/(K_D+[sdAb])$). Измерения для серийных разбавлений проводили в двух повторах, и средние геометрические значения K_D приведены в табл. 27.

Таблица 27. Средние геометрические значения K_D (нМ) связывания конструкций мультидоменных антител с НА при pH 7,4 (пустые ячейки означают "не тестировали")

	H1N1	H3N2	H3N2	H7N3	H7N9	Victoria	Yamagata
	A/Brisbane/59/07	A/HK/1/68-MA	A/Wisconsin/67/05	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	A/Hangzhou/1/2013	B/Brisbane/60/08	B/Florida/04/06
MD1221						1,7	1,9
MD2407	2,8	2,2	0,5	1,2	1,7	3,1	
MD3606	2,2	1,4	0,6	1,1	1,2	3,8	

Ингибирование конформационного изменения НА посредством связывания sdAb в стебле.

Для подтверждения того, что мультидоменные антитела, которые содержат структурные блоки sdAb, связывающие стебель НА, аналогично антителам, которые с ними конкурируют, предотвращают конформационное изменение НА и тем самым блокируют слияние вируса и последующее инфицирование, осуществляли анализ, описанный в примере 6. Результаты обобщены в табл. 29.

Таблица 29. Предотвращение конформационного изменения НА с помощью мультидоменных антител "++" обозначает сильное и "+" обозначает среднее ингибирование конформационного изменения НА. "-" обозначает отсутствие ингибирования. Пустые ячейки означают "не тестировали"

	H1N1	H3N2	H7N3	H7N9	Victoria
	A/Brisbane/59/07	A/HK/1/68	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	A/Hangzhou/1/2013	B/Brisbane/60/08
MD2407	++	++	++	++	+
MD1221	-	-	-	-	++
MD3606	++	++			+

Соединение вместе 3 или более sdAb способно значительно улучшить эффективность и спектр нейтрализации по сравнению с отдельными структурными блоками. Таким образом, штаммы вируса гриппа, которые не могут быть нейтрализованы ни одним из sdAb по отдельности, могут быть надежно нейтрализованы мультимерными конструкциями этих же sdAb. Комбинация sdAb, нейтрализующих вирус гриппа А группы 1, А группы 2 или В, давала в результате мультидоменные антитела, способные нейтрализовать практически все тестируемые штаммы. Увеличение спектра нейтрализации связано с лежащим в основе охватом связывания используемых sdAb. Предполагалось, что повышение avidности к НА, в дополнение к другим возможным механизмам нейтрализации, связанным с бивалентной природой конструкций, определяло описанные улучшения. Блокирование слияния вируса, как механизм нейтрализации вируса, было подтверждено для тестируемых димеров и мультидоменных антител.

Пример 9. Образование и определение характеристик конструкций слияния, содержащих Fc.

Образование конструкций слияния, содержащих Fc.

SdAb и мультимеры sdAb можно сливать с Fc-областью антител. Fc-область определяют как часть антитела, например молекулы IgG1 человека, содержащую шарнирную область, за которой расположены домены CH2- и CH3. Образовывались различные конструкции слияния, содержащие Fc, и сравнивали их с мультимерами sdAb и моноклональными антителами в отношении связывания НА, нейтрализации *in vitro* и эффективности *in vivo*.

SdAb или мультимеры sdAb были слиты с использованием дополнительных линкеров или без них, как показано в табл. 15, с C- и/или N-концом Fc-фрагментов. Конструкции слияния, содержащие Fc, были экспрессированы в клетках млекопитающих и секретируются в среду в виде димерных молекул с Fc. Полные аминокислотные последовательности конструкций слияния, содержащих Fc, показаны в табл. 30. Расположение sdAb или мультимеров sdAb в конструкциях варьировалось с целью обеспечения наиболее оптимальной комбинации. Образовывались гомодимерные, а также гетеродимерные молекулы слияния, содержащие Fc. Гетеродимерные слияния Fc образовывались путем введения точечной мутации в домен CH3, как описано Labrijn et al. (2013). Эти мутации представляли собой K409R и F405L, и Fc-цепи, содержащие эти мутации, соответственно назывались FcGa и FcGb.

Конструкции слияния, содержащие Fc, были экспрессированы в суспензионной культуре клеток Expi293. ДНК-конструкции, содержащие последовательности для гетеродимерных Fc-конструкций с мутациями K409R или F405L, трансфицировали в виде одного вектора, содержащего две последовательные открытые рамки считывания. Транзientную трансфекцию и экспрессию осуществляли в соответствии с инструкциями производителя и они были аналогичными ранее описанным условиям для получения конструкций IgG человека (Dreyfus et al., 2012). Возможные агрегаты и примеси удаляли с помощью препаративной гель-фильтрации (колонка Superdex 75pg или Superdex 200pg, GE Healthcare). Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE, и фракции, соответствующие ожидаемой молекулярной массе, объединяли и концентрировали с применением центрифужных фильтров Amicon Ultra 30K. В каждом цикле получали димерные молекулы слияния, содержащие Fc, которые были стабильно связаны с помощью дисульфидных мостиков в шарнирной области. В случае когда как FcGa, так и FcGb трансфицировали в одни и те же клетки, очищенный белок слияния, содержащий Fc, подвергали контролируемому восстановлению *in vitro*, которые обеспечивали разделение Fc-слияния на полумолекулы и возможность повторной сборки и переокисления с образованием чистой гетеродимерной молекулы слияния,

содержащей Fc, как описано Labrijn et al. (2013).

Таблица 30. Последовательности конструкций слияния, содержащих Fc

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO:
MD2605	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCYVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTSSAAADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	74
MD2606	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCYVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTSSGGGGSGGGSSAAADKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	75
MD2607	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNANTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSAAADKTHTCPPCPAPELLGGPSVF	76

	LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSP GK	
MD2608	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSAADKHTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNH YTQKSLSLSPGK	77
MD2609	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKDRFTISRDN A KDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSSAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK	78
MD2610	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKDRFTISRDN A KDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK	79
MD2601	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN A KNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRD PLGVAGGMGVYWKGALVTVSSAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPG SEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN A ENTVYLQMDSLKPEDTAV YYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSLINLEAADKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	80
MD2602	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN A KNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRD PLGVAGGMGVYWKGALVTVSSAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG	81

	GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPG KGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRFTISRDNADKDTLYLQMSSLKSEDTAVY YCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSLINLEAAADKHTHTCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PGK	
MD2603	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDAENTVYLQMSLKPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWY RQAPGKQRDIVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPE DTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSLINLEAAADKHTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSPGK	82
MD2604	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKDRFTISRDNADKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVAT SFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYR DPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSLINLEAAADKHTHTCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PGK	83
MD2611	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTI SRDAENTVYLQMSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQ GTQVTVSSAAADKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	84
MD2612	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI	85

	SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG GGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQORDLVATSF RDGSTNYADSVKG RFTISRDN AKNLTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSAAADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
MD2613	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKDRFTISRDN AKNLTLYLQMSLKS EDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSIS IFDIYAMDWYRQAPGKQORDLVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNLT YLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSAAADK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	86
MD2614	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQORDLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNLTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRFTIS RDN AKNLTLYLQMSLKS EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSAAADK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	87
MD2615	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQORDLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNLTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSAAADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSE REGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYY CATTTAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS	88
MD2616	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG	89

	GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSAAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRD GSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDLGVAGGMGVYWGKGALVTVSS	
MD2617	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRD GSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDLGVAGGMGVYWGKGALVTVSSAAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRFTISRDN AKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS	90
MD2618	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRFTISRDN AKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSAAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRD GSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDLGVAGGMGVYWGKGALVTVSS	91
MD2626	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSFRD GSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCHVSLYRDLGVAGGMGVYWGKGALVTVSSAAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS	92
MD2619	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG	93

	GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATSFRDGSTNYADSVKG RFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGW FRQAPGKEREFAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNNLK PEDTAVYYCTAQQQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSAAADKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	
MD2620	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTI SRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGW FRQAPGKEREFAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANTLEYLEMNNLK PEDTAVYYCTAQQQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSAAADKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	94
MD2621	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLK LSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDN ANTLEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQQQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTV SSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQ TPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPED TAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSAAADKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	95
MD2628	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLK LSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDN ANTLEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQQQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTV	96

	SSAAADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSM RGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDGTTFSRL ASSWGQGTQVTVSS	
MD2629	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG GGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSAAADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQ APGKQRD LVATSF RDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLKPEDT AVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSGGGGGGGGSEVQLVES GGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYYS DSVKGRFTISRDN AKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAE YEFWGQGTQVTVSS	97
MD2641	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG GGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQ GGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKD RFTISRDN AKDTLYLQMS SLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATSF RDGSTNYADSVKGRFTI SRDN AKNTLYLQMN SLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGK GALV TVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQA PGKEREFVAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISRDN AKNTEYLEMNNLKPEDT AVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS	98
MD2642	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRD LVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLK LSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISR DN AKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTV SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED	99

	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
MD3606	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCCHVSILYRDLPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRITYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRITYSDSVKGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTAVYYCATTTAGGGCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNANKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS	100
MD3609	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCCHVSILYRDLPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRITYAMGWFRQAPGKEREFVAHINALGTRITYSDSVKGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTAVYYCATTTAGGGCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNANKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSAAADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	101
MD2631	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDIVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCCHVSILYRDLPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR	102

	LSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQORDLVATSFrdgSTNYADSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLVCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAP GKEREVFAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTA VYYCTAQGGWRAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS SLSPGKGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMY WLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDNAKDTLYLQMSSLK SEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDS SMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFS RLASSWGQGTQVTVSS	
MD2632	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQORDLVATSFrdgSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLVCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQORDLVATSFrdgSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLVCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAP GKEREVFAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTA VYYCTAQGGWRAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS SLSPGKGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIG WFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNAENTVYLQMDSL KPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVS VINTDGGTYADSVKDRFTISRDNAKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWG GPEPTRGQGTQVTVSS	103
MD2633	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREVFAHINAL GTRTYSDSVKGRFTISRDNANKTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGGWRAP PVAVAEYEFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQORDLVATSFrdgSTNYADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLVCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQ APGKQORDLVATSFrdgSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDT AVYLVCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	104

	TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSLSPGKGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTFSTSWMY WLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRFTISRDNADKDTLYLQMSSLK SEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDS SMRGRFTISRDNADENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFS RLASSWGQGTQVTVSS	
MD2634	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFAHINAL GTRTYSDSVKGRFTISRDNADKNTLEYLEMNLSKPEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFRDGSSTNYADSVKGRFTISR DNADKNTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTV SSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQ APGKQRDVATSFRDGSSTNYADSVKGRFTISRDNADKNTLYLQMNLSKPEDT AVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSLSPGKGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIG WFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNADENTVYLQMDSL KPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVS VINTDGGTTYADSVKDRFTISRDNADKDTLYLQMSSLKSEDTAVYYCAKDWG GPEPTRGQGTQVTVSS	105
MD2622	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATS FRDGSSTNYADSVKGRFTISRDNADKNTLYLQMNLSKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLK LSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDN ADKNTLEYLEMNLSKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTV SSAAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	106
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNADENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSAAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP	107

	REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	
MD2643	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVLVATSFRDGSTNYADSVKGRFTIS RDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAP GKREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTA VYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	110
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCI SKSGSWTYTDSMRGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKD RFTISRDNANKNTLYLQMNSLKSSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	111
MD2644	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVLVATSFRDGSTNYADSVKGRFTIS RDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYLCVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAP GKREFVAHINALGTRTYSDSVKGRFTISRDNANKNTEYLEMNNLKPEDTA VYYCTAQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	112
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTYADSVKDRFTISRDNANKNTLYLQMNSLKSSEDVAVYYCAKDWGGP	113

	EPTRGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
MD2645	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKERE FVAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISRDN AKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQ RDLVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNNTLYLQMNSLKPEDTAVYLC HVS LYR DPLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQ RDLVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNNTLYLQMNSLKPEDTAVYLC HVS LYR DPLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	114
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKDRFTISRDN AKNNTLYLQMSLKS EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	115
MD2646	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKERE FVAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISRDN AKNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQQGWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQ RDLVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNNTLYLQMNSLKPEDTAVYLC HVS LYR DPLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQ RDLVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNNTLYLQMNSLKPEDTAVYLC HVS LYR DPLGVAGGMGVYWGK GALVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	116

	YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKDRFTISRDNADTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGF TLENKAIGWFRQTPGSEREGVLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDAENT VYLQMDSLKPEDTAVYYCATTTAGGGCLWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	117
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNADNTLYLQMSLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREG VLCISKSGSWTYTDSMRGRFTISRDAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAT TTAGGGCLWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS	118
MD2647	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFAHINAL GTRTYYSDSVKGRFTISRDNADNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATSFRDGSTNYADSVKGRFTISR DNADNTLYLQMSLKPEDTAVYLCHVSLYRDPLGVAGGMGVYWGKALVTV SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKDRF TISRDNADTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS	119
MD2649	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDNADNTLYLQMSLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLK LSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFAHINALGTRTYYSDSVKGRFTISR DNADNTEYLEMNNLKPEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTQVT SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	120

	CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLENKAIGWFRQTPGSEREGLVCI SKSGSWTYITDSMRGRFTISRDN AENTVY LQMDSLKPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGS LKLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKD RFTISRDNADTLYLQMSLKS EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTQVTVSS DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	121

Нейтрализация вируса гриппа мультидоменными антителами, содержащими Fc.

Очищенные конструкции, содержащие Fc, одно- и мультидоменных антител тестировали в анализах нейтрализации вируса гриппа, как описано в примере 6, и они продемонстрировали улучшенную эффективность и спектр нейтрализации по сравнению со структурными блоками sdAb. Результаты для конструкций слияния, содержащих Fc, нейтрализующих вирус гриппа, показаны в табл. 31-37.

Таблица 31. Средние титры нейтрализации (нМ) для конструкций слияния sdAb, содержащих Fc, (пустые ячейки означают "не тестировали")

	Штамм вируса	MD2605	MD2606	MD2607	MD2608	MD2609	MD2610
H1N1	A/Puerto Rico/8/34-MA			1262,6			
H5N1	A/Vietnam/1194/04	8,4	5,8				
H2N2	A/Guizhou/1/57	23,7					
H2N2	A/WF/HK/MPU3156/05	13,3					
H3N2	A/Brisbane/10/07	25,1	22,1				
H3N2	A/Wisconsin/67/05	37,8	27,7				
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/Netherlands/12/00)	97,5	70,0				
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	508,6	1255,6				
H7N9	A/Anhui/1/13	189,7					
Yamaga	B/Florida/04/06			252,5	248,6	1,4	1,4
ta							

Таблица 32. Средние титры нейтрализации (нМ) для димерных конструкций слияния sdAb, содержащих Fc (пустые ячейки означают "не тестировали")

	Штамм вируса	MD260 1	MD260 2	MD260 3	MD260 4	MD261 1	MD261 2	MD261 3	MD261 4
H1N1	A/New Caledonia/20/99	23,5	20,2	78,9	34,0	17,3	49,0	42,2	21,1
H1N1	A/Puerto Rico/8/34-MA	9,5	22,9	53,9	51,5				
H5N1	A/Vietnam/1194/04	16,6				10,3			
H3N2	A/Brisbane/10/07	50,9	72,0	634,1	271,6	41,8	277,2	142,0	142,0
H3N2	A/HK/1/68-MA	245,5	479,7	491,0	102,8				
H3N2	A/Wisconsin/67/05	503,3	551,5	>1000	685,3	147,0	>1000	>1000	285,3
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/NL/12/00)	669,6	>1000	>1000	>1000	247,2	>1000	>1000	>1000
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Yamagata	B/Florida/04/06	476,2	6,4	194,5	1,1	329,7	329,7	0,6	11,9
Old	B/Lee/40	360,3	317,3	202,5	126,4				

Таблица 33. Средние титры нейтрализации (нМ) для димерных конструкций слияния sdAb, содержащих Fc (пустые ячейки означают "не тестировали")

	Штамм вируса	MD2615	MD2616	MD2617	MD2618	MD2626
H1N1	A/California/07/09			1,8		
H1N1	A/New Caledonia/20/99	12,2	20,6	8,4		
H1N1	A/Puerto Rico/8/34-MA			6,3		
H5N1	A/Vietnam/1194/04	14,5		4,7		
H2N2	A/Guizhou/1/57			31,8		
H6N1	A/Eurasian Wigeon/MPG1884/09			25,1		
H11N9	A/Northern			21,1		

	Pintail/MPC2085/07					
H9N2	A/HK/466419/09			25,1		
H8N4	A/Eurasian Wigeon/MPH571/08			12,5		
H3N2	A/Brisbane/10/07	26,8	932,3	27,5	>1000	
H3N2	A/HK/1/68-MA			117,7		
H3N2	A/Wisconsin/67/05	39,5	932,3	498,7	>1000	47,8
H4	A/WF/HK/MPA892/06			35,5		
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/Netherlands/12/00)	83,2	932,3	72,1	>1000	95,6
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	397,9	932,3	301,2	>1000	321,4
H7N9	A/Anhui/1/13			380,0		
H7N9	A/Shanghai/1/13 (мутант по R292K, избежавший действия тамифлю)			1900,0		
H7N9	A/Shanghai/2/13			390,8		
H10N7	A/Chick/Germany/N/49			21,1		
Victoria	B/Brisbane/60/08			2,1		
Victoria	B/Malaysia/2506/04			8,3		
Yamagata	B/Florida/04/06	164,8	233,1	2,5	0,8	
Yamagata	B/Harbin/7/94			7,5		
Old	B/Lee/40			1,4		

Таблица 34. Средние титры нейтрализации (нМ) для тримерных конструкций слияния sdAb, содержащих Fc (пустые ячейки означают "не тестировали")

	Штамм вируса	MD2619	MD2620	MD2621	MD2628	MD2629
H1N1	A/California/07/09				3,2	5,5
H1N1	A/New Caledonia/20/99	26,2	15,5	13,1		
H5N1	A/Vietnam/1194/04				6,3	13,1
H3N2	A/Brisbane/10/07	32,7	23,1	9,7	21,3	18,4

H3N2	A/HK/1/68-MA				30,1	11,0
H3N2	A/Wisconsin/67/05	45,9	30,0	26,6	22,1	22,3
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/Netherlands/12/00)	19,4	11,5	8,2	8,7	10,6
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	32,7	23,1	16,3	15,8	8,1
Victoria	B/Brisbane/60/08				116,6	260,8
Yamagata	B/Florida/04/06	261,3	261,3	738,9	213,0	73,7
Old	B/Lee/40				106,5	260,8

Таблица 35. Средние титры нейтрализации (нМ) для тетрамерных конструкций слияния sdAb, содержащих Fc (пустые ячейки означают "не тестировали")

	Штамм вируса	MD2641	MD2642	MD3606	MD3609
H1N1	A/California/07/09	2,1	3,6	1,8	5,5
H1N2	A/New Caledonia/20/99	9,2	6,3	2,6	13,0
H1N3	A/Puerto Rico/8/34-MA	21,9	7,9	3,3	9,2
H1N4	A/Brisbane/59/07		2,7	5,3	5,5
H1N5	A/Mississippi/03/01 274H		5,3	4,7	6,5
H1N6	A/Solomon Islands/3/2006 (IVR 145)		4,8	1,6	6,5
H1N7	A/WSN/33		4,2	2,0	5,5
H1N8	A/HK/54/98			5,0	
H1N9	A/Christchurch/16/10		2,1	1,0	
H1N2	A/Env/HK/MPU3156/05			2,6	
H5N1	A/PR8 H5N1 HK97		4,7	6,5	6,5
H5N2	A/Vietnam/1194/04	13,0	7,5	5,7	15,5
H5N3	A/Indonesia/5/05			11,5	
H5N2	A/Eurasian Wigeon/MPF461/07			9,2	
H5N3	A/Eurasian Wigeon/HK/MPF333/07			7,0	
H2N2	A/Guizhou/1/57	152,7	21,2	26,7	
H2N3	A/AnnArbor/23/57			13,2	
H2N4	A/Env/HK/MPU3156/05			9,3	
H6N1	A/Eurasian		11,5	11,6	16,3

	Wigeon/MPG1884/09				
H6N2	A/Taiwan/2/2013			14,5	
H6N8	A/Eurasian Wigeon/MPD411/07			9,7	
H11N9	A/Northern Pintail/MPC2085/07		8,2	7,2	27,3
H9N2	A/Ck/HK/SSP176/09			9,0	
H9N3	A/Great Cormorant/MP2934/04			9,7	
H9N4	A/HK/466419/09		7,0	5,3	14,0
H8N4	A/Eurasian Wigeon/MPH571/08		7,0	3,7	14,0
H8N2	A/Env/MPJ1258/09			3,9	
H12N5	A/Env/MPK659/09			>1000	
H3N2	A/Brisbane/10/07		13,5	4,1	14,2
H3N3	A/HK/1/68-MA	13,0	20,3	14,3	36,8
H3N4	A/Panama/2007/99		21,9	40,5	26,0
H3N5	A/Wisconsin/67/05	15,5	12,5	6,5	30,9
H3N6	A/Fukui/45/04		21,9	40,5	21,9
H3N7	A/Aichi/2/68		11,0	32,2	10,9
H3N8	A/Hiroshima/52/05		16,2	6,5	16,2
H3N9	A/Johannesburg/33/94		16,2	8,1	16,2
H3N10	A/Perth/16/09		11,1	5,7	12,9
H3N11	A/Victoria/210/09		9,7	6,5	8,1
H3N12	A/HK/1174/99			23,0	
H3N?	A/Env/MPJ193/09			11,8	
H4	A/WF/HK/MPA892/06	2,4	5,2	3,0	6,5
H4N1	A/Northern Pintail/MPB1368/06			2,6	
H4N6	A/Great Cormorant/MPB1683/06			3,1	
H14N5	A/Mallard/Astrakhan/263/ 1982		10,6	12,9	13,0
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/Netherlands/1 2/00)		14,2	12,9	21,9
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	11,0	15,7	8,1	26,0

H7N8	A/Northern Shoveler/MPF518/08			18,4	
H7N9	A/Netherlands/219/2003			20,4	
H7N10	A/Common Teal/MPF139/07			26,3	
H7N9	A/Anhui/1/13	26,7	30,4	38,2	
H7N10	A/Shanghai/1/13 (мутант по R292K, избежавший действия тамифлю)		54,8	32,2	77,3
H7N11	A/Shanghai/2/13	17,4	24,7	22,8	
H10N7	A/Chick/Germany/N/49	6,9	11,9	10,2	30,9
H10N8	A/Jiangxi/346/2013			18,3	
H10N3	A/Common Teal/MPH11/08			11,3	
H10N9	A/Northern Shoveler/MPE2531/08			20,7	
Victoria	B/Brisbane/60/08		1,5	1,0	4,1
Victoria	B/Malaysia/2506/04	5,5	3,5	2,6	5,5
Yamagata	B/Florida/04/06	1,7	1,8	1,0	5,5
Yamagata	B/Harbin/7/94	1,2	1,1	1,0	1,4
Yamagata	B/Massachusetts/02/12		1,0	1,0	
Old	B/Lee/40		8,4	3,3	21,9

Таблица 36. Средние титры нейтрализации (нМ) для пентамерных конструкций слияния sdAb, содержащих Fc (пустые ячейки означают "не тестировали")

	Штамм вируса	MD2631	MD2632	MD2633	MD2634
H1N1	A/California/07/09	1,5	1,5	1,2	2,1
H1N1	A/New Caledonia/20/99	6,6	4,7	3,9	9,3
H1N1	A/Puerto Rico/8/34-MA	9,3	9,3	9,3	11,1
H5N1	A/Vietnam/1194/04	9,3	6,6	6,6	7,9
H2N2	A/Guiyang/1/57	10,5		20,9	
H6N1	A/Eurasian Wigeon/MPG1884/09	6,0			
H11N9	A/Northern Pintail/MPC2085/07	13,9			
H9N2	A/HK/466419/09	6,0			
H8N4	A/Eurasian	6,0			

	Wigeon/MPH571/08				
H3N2	A/HK/1/68-MA	13,2	18,7	4,7	9,3
H3N2	A/Wisconsin/67/05	11,1	11,1	15,7	22,2
H4	A/WF/HK/MPA892/06	7,0	7,0	2,5	2,5
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	13,2	11,1	3,3	6,6
H7N9	A/Anhui/1/13	54,2		127,8	
H7N9	A/Shanghai/1/13 (мутант по R292K, избежавший действия тамифлю)	46,7			
H7N9	A/Shanghai/2/13	35,3		36,1	
H10N7	A/Chick/Germany/N/4 9	5,0	8,3	4,2	5,9
Victoria	B/Malaysia/2506/04	6,6	4,7	4,7	3,3
Yamagata	B/Florida/04/06	1,8	1,2	2,1	1,5
Yamagata	B/Harbin/7/94	2,3	2,0	1,0	1,4

Таблица 37. Средние титры нейтрализации (нМ) для гетеродимерных конструкций слияния sdAb, содержащих Fc (пустые ячейки означают "не тестировали")

	Штамм вируса	MD262 2	MD262 3	MD264 3	MD264 4	MD264 5	MD264 6	MD264 7
H1N1	A/California/07/0 9			2,8	2,3	2,3	1,6	2,0
H1N1	A/New Caledonia/20/99			7,4	7,4	14,8	14,8	12,4
H1N1	Λ/Puerto Rico/8/34-MA			14,8	14,8	14,8	14,8	14,8
H5N1	A/Vietnam/1194/04			12,4	14,8	14,8	14,8	14,8
H2N2	A/Guiyang/1/57				18,2		36,1	
H6N1	A/Eurasian Wigeon/MPG1884/09				22,0			
H11N9	A/Northern Pintail/MPC2085/0 7				13,1			
H9N2	A/HK/466419/09				9,0			
H8N4	A/Eurasian Wigeon/MPH571/08				9,0			
H3N2	A/Brisbane/10/07	28,3	8,4					

H3N2	A/HK/1/68-MA			29,6	29,6	29,6	20,9	20,9
H3N2	A/Wisconsin/67/05	28,3	10,0	12,4	20,9	29,6	29,6	83,6
H4	A/WF/HK/MPA892/06			9,3	6,6	2,8	3,3	2,8
H7N3	A/NIBRG/60 (A/mallard/Netherlands/12/00)	28,3	8,4					
H7N7	A/PR8 H7N7-NY	40,0	11,9	29,6	24,9	12,4	17,6	20,9
H7N9	A/Anhui/1/13				144,2		225,5	
H7N9	A/Shanghai/1/13 (мутант по R292K, избежавший действия тамифлю)				147,8			
H7N9	A/Shanghai/2/13				60,6		61,3	
H10N7	A/Chick/Germany/N /49			22,2	15,7	6,6	5,5	11,1
Victoria	B/Malaysia/2506/04			12,4	7,4	8,8	7,4	29,6
Yamagata	B/Florida/04/06			2,8	2,8	2,8	3,3	22,2
Yamagata	B/Harbin/7/94			5,2	4,4	3,7	3,7	35,2

Функциональное связывание Fc-рецептора (антителозависимая клеточная цитотоксичность).

Функциональное связывание с экспрессируемым на клетках FcγRIIIa (CD16a) человека измеряли с использованием репортерного биоанализа ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) (Promega). Клетки-мишени A549 инфицировали B/Brisbane/60/2008 или B/Florida/04/2006, или трансфицировали плазмидой, кодирующей HA H3N2 A/Wisconsin/67/2005, с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в OPTI-MEM I (Gibco). Через 24 ч клетки-мишени, экспрессирующие HA, высевали в белые 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 30 мин с несколькими серийными разбавлениями конструкций слияния, содержащих Fc, или контрольных IgG-антител. В качестве дополнительных отрицательных контролей применяли конструкции, несущие точечные мутации LALA в Fc-фрагменте. В случае точечных мутаций LALA (L234A, L235A, как описано Hessel et al. 2007) была показана значительно сниженная степень связывания с Fcγ-рецепторами человека и индукции ADCC. Наконец, к клеткам-мишеням добавляли эффекторные Т-клетки Jurkat (стабильно экспрессирующие FcγRIIIa V158 и люциферазу под контролем NFAT-RE) и инкубировали в течение 6 ч. В лунки добавляли раствор субстрата для анализа люциферазы Bio-Glo (Promega) и измеряли люминесценцию (в RLU) с применением люминесцентного планшетного ридера (Perkin Elmer). Данные в RLU аппроксимировали с применением стандартной четырехпараметрической логистической модели нелинейной регрессии в SPSS.

Все SD/MD конструкции слияния, содержащие Fc (за исключением версий с LALA), продемонстрировали стойкую индукцию ADCC, что указывает на то, что связывание с эпитопами в стебле HA вируса гриппа на поверхности клеток обеспечивает продуктивное взаимодействие с клетками, экспрессирующими рецептор FcγRIIIa. Результаты обобщены в табл. 38.

Таблица 38. Функциональное связывание Fc-рецептора (индукция ADCC).

"++" обозначает $EC_{50} < 0,1$ мкг/мл, "+" обозначает $EC_{50} < 0,5$ мкг/мл,
 "-" обозначает $EC_{50} > 0,5$ мкг/мл, пустые ячейки означают "не тестировали"

Конструкция	Индукция ADCC		
	A/Wisconsin/67/2005	B/Brisbane/60/2008	B/Florida/04/2006
MD2606		-	-
MD2608		++	++
MD2610		+	+
MD2407		-	-
MD3606	++	++	++
MD3607	+	-	-
CR9114 (+ контрольные mAb)	++	++	++
CR9114-LALA	-	-	-
CRJB (- контрольные mAb)	-	-	-

Слияние sdAb или мультимеров sdAb с Fc-фрагментом IgG1 человека приводило к образованию молекул, связывающих HA, которые сохраняли эффективность и спектр нейтрализации sdAb или мультимерных структурных блоков, применяемых в отдельности. Структурные блоки в виде sdAb можно слить с N-, а также с C-концом Fc-фрагмента. В ходе экспрессии две Fc-цепи образуют молекулу, подобную бивалентному антителу. Таким образом, в одной и той же клетке можно экспрессировать также две различные конструкции с Fc-цепью, отличающиеся по их sdAb или мультимерной части, и можно создать молекулу, подобную биспецифичному антителу. Были успешно получены гомодимерные и гетеродимерные конструкции слияния, содержащие Fc, с sdAb и/или мультимерными антителами, присоединенными к N- и/или C-концу Fc-фрагмента, и был продемонстрирован их спектр нейтрализации, охватывающий вирусы гриппа А и В. В дополнение к непосредственной нейтрализации посредством sdAb или мультимерной части, Fc-часть конструкции слияния при связывании с HA на поверхности инфицированных или трансфицированных клеток может содействовать продуктивному взаимодействию с рецепторами FcγRIIIa (CD16a) на поверхности эффекторных клеток. Это может приводить к активации NK-клеток и последующей индукции ADCC in vivo. Наряду с индукцией эффекторных функций Fc-часть также может взаимодействовать с неонатальным Fc-рецептором, что обеспечивает продолжительное время полужизни in vivo.

Пример 10. Эффективность однодоменных и мультимерных антител in vivo.

Эффективность однодоменных антител к вирусу гриппа А группы 1 in vivo.

Иллюстративные однодоменные антитела SD1016, SD1038 и SD1045 к вирусу гриппа А группы 1 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель (n=8) интраназально вводили SD1016, SD1038 или SD1045 в однократной дозе, составляющей 0,5 мг/кг. Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1) в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Введение как SD1038, так и SD1016 приводило к статистически значимому увеличению доли выживших по сравнению с контрольной группой с наполнителем, тогда как введение одного SD1045 приводило к увеличению времени выживания (см. фиг. 2).

Эффективность однодоменных антител к вирусу гриппа А группы 2 in vivo.

Иллюстративные однодоменные антитела SD1036, SD1046 и SD1048 к вирусу гриппа А группы 2 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель (n=8) интраназально вводили SD1046 или SD1048 в дозе 5 мг/кг или SD1036 в 2 дозах (0,5 мг/кг или 5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения

мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа A/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2) в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что интраназальное введение SD1036, SD1046 или SD1048 обеспечивало полную защиту от летального заражения вирусом A/Hong Kong/1/1968-MA (см. фиг. 3).

Эффективность однодоменных антител к вирусу гриппа B *in vivo*.

Иллюстративные однодоменные антитела SD1083 и SD1084 к вирусу гриппа B были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа *in vivo* с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) интраназально вводили SD1084 в однократной, дозе составляющей 5 мг/кг, или SD1083 в 2 дозах (0,5 мг/кг или 5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа B/Florida/4/2006 в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что sdAb SD1084 обеспечивало 100% защиту от летального заражения B/Florida/4/2006, тогда как одно SD1083 обеспечивало частичную защиту при наивысшей дозе, составляющей 5 мг/кг. Более низкая доза одного SD1083 приводила к увеличению времени выживания (фиг. 4).

Эффективность одно- и мультидоменных антител к вирусу гриппа A в модели с заражением H1N1 *in vivo*.

Иллюстративное sdAb SD1038 к вирусу гриппа A, а также иллюстративные мультидоменные антитела MD1211 и MD1212 к вирусу гриппа A были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа *in vivo* с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) интраназально вводили MD1211 или MD1212 в дозе 1 мг/кг или SD1038 либо в отдельности (0,5 мг/кг), либо в смеси с SD1036 1:1 (общая доза=1 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1) в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что интраназальное введение SD1038, MD1211, MD1212 или смеси 1:1 SD1038 и SD1036 обеспечивало полную защиту от летального заражения вирусом A/Puerto Rico/8/1934-MA. Кривые веса тела указывают на то, что эффективность MD1211 и MD1212 выше, чем таковая sdAb (смесь) (фиг. 5).

Эффективность одно- и мультидоменных антител к вирусу гриппа A в модели с заражением H3N2 *in vivo*.

Иллюстративное sdAb SD1036 к вирусу гриппа A и иллюстративные мультидоменные антитела MD1211 и MD1212 к вирусу гриппа A были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа *in vivo* с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) интраназально вводили MD1211 или MD1212 в дозе 5 мг/кг или SD1036 либо в отдельности (2,5 мг/кг), либо в смеси с SD1038 1:1 (общая доза=5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа A/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2) в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что интраназальное введение SD1036, MD1211, MD1212 или смеси 1:1 SD1036 и SD1038 обеспечивало полную защиту от летального заражения вирусом A/Hong Kong/1/1968-MA. Кривые веса тела указывают на то, что эффективность MD1211 и MD1212 выше, чем таковая sdAb (смесь) (фиг. 6).

Сравнение эффективности мономера и димера SD1038 *in vivo* в модели с заражением H3N2.

Иллюстративное однодоменное антитело SD1038 к вирусу гриппа A и иллюстративное мультидоменное антитело MD1212 к вирус гриппа A были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа *in vivo* с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) интраназально вводили SD1038 или MD1212 в 4 дозах (5 мг/кг, 1,7 мг/кг, 0,6 мг/кг или 0,2 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа A/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2) в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что одно SD1038 обеспечивало частичную защиту от летального заражения вирусом A/Hong Kong/1/1968-MA и что уровень защиты зависел от дозы. В отличие от этого, димерное SD1038 (MD1212) обеспечивало 100% защиту во всех группах с 4 дозами (фиг. 7).

Эффективность мультидоменных антител к вирусу гриппа B *in vivo*.

Иллюстративные мультидоменные антитела MD1221, MD1222 и MD1224 к вирусу гриппа B были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа *in vivo* с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) интраназально вводили MD1221 или MD1224 в однократной дозе, составляющей 5 мг/кг, или MD1222 в 2 дозах (0,5 мг/кг или 5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполни-

телем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа B/Florida/4/2006 в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что все 3 мультимоденные антитела обеспечивали 100% защиту от летального заражения B/Florida/4/2006 (фиг. 8).

Эффективность мультимоденных антител к вирусам гриппа А и В в отношении H1N1 после i.v. введения in vivo.

Иллюстративные мультимоденные антитела MD1301 и MD2601 к вирусам гриппа А и В были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) внутривенно вводили MD1301 или MD2601 в однократной дозе, составляющей 3 мг/кг. CR9114 брали в качестве положительного контроля. Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1) в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что содержащее Fc мультимоденное антитело MD2601 обеспечивало полную защиту после i.v. введения, тогда как MD1301 без Fc не оказывало эффекта на выживаемость. Контрольное антитело CR9114 в отдельности обеспечивало частичную защиту от летального заражения A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1) (фиг. 9).

Эффективность мультимоденных антител к вирусам гриппа А и В в отношении H1N1 после i.n. введения In vivo.

Иллюстративные мультимоденные антитела MD1301 и MD2601 к вирусам гриппа А и В, а также эталонное антитело CR914 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) интраназально вводили MD1301, MD2601 или эталонное антитело CR9114 в 3 дозах (0,2, 0,05 или 0,01 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1) в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что минимальная эффективная доза (определенная как самая низкая доза, обеспечивающая 100% защиту) составляла 0,05 мг/кг для антител MD2601 и CR9114, содержащих Fc, и 0,2 мг/кг для MD1301 без Fc. Мыши, получающие 0,05 мг/кг CR9114, продемонстрировали более значительное снижение веса тела, чем мыши, получающие аналогичную дозу MD2601 (фиг. 10).

Эффективность мультимоденного антитела MD2617 к вирусам гриппа А и В в отношении H1N1 in vivo.

Иллюстративное мультимоденное антитело MD2617 было выбрано для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) вводили MD2617 либо интраназально в дозе, составляющей 0,2 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,01 мг/кг, либо внутривенно в дозе, составляющей 3, 1 или 0,3 мг/кг. Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали A/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1) в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Введение MD2617 в дозе 0,2 мг/кг i.n. или 3 мг/кг i.v. приводило к статистически значимому увеличению доли выживших по сравнению с контрольной группой с наполнителем (фиг. 11).

Эффективность мультимоденного антитела MD2617 к вирусам гриппа А и В в отношении H3N2 и B/Florida in vivo.

Иллюстративное мультимоденное антитело MD2617 было выбрано для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) вводили MD2617 либо интраназально в дозе 0,5 мг/кг, либо внутривенно в дозе 2 мг/кг. CR9114, введенное внутривенно в дозе 2 мг/кг, брали в качестве положительного контроля. Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали A/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2) или B/Florida/4/2006 в дозе, составляющей $25 \times LD_{50}$. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Интраназальное, а также внутривенное введение MD2617 приводило к статистически значимому увеличению доли выживших по сравнению с контрольной группой с наполнителем.

Эффективность мультимоденных антител MD2407 и MD3606 к вирусам гриппа А и В в отношении B/Florida после i.n. введения in vivo.

Иллюстративные мультимоденные антитела MD2407 и MD3606, а также эталонное антитело CR9114 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель ($n=8$) интраназально вводили MD2407, MD3606 или CR9114 в 3 дозах (0,02 мг/кг, 0,1 мг/кг или 0,5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа B/Florida/4/2006 в дозе, состав-

ляющей 25×LD50. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Введение 0,02, 0,1 и 0,5 мг/кг MD2407 и MD3606 приводило к статистически значимому увеличению доли выживших по сравнению с контрольной группой с наполнителем, тогда как введение одного CR9114 приводило к увеличению времени выживания при 0,1 и 0,5 мг/кг (фиг. 13).

Эффективность мультидоменного антитела MD3606 к вирусам гриппа А и В в отношении В Florida после i.v. введения in vivo.

Иллюстративное мультидоменное антитело MD3606 и эталонное антитело CR9114 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель (n=8) внутривенно вводили MD3606 или CR9114 в 3 дозах (0,2, 1 или 5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа В/Florida/4/2006 в дозе, составляющей 25×LD50. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что MD3606 обеспечивало полную защиту от В/Florida/4/2006 в дозе ниже 1 мг/кг. В отличие от этого, эталонное антитело CR9114 в отдельности обеспечивало частичную защиту в наивысшей дозе 5 мг/кг (фиг. 14).

Эффективность мультидоменных антител MD2407 и MD3606 к вирусам гриппа А и В в отношении H3N2 после i.p. введения in vivo.

Иллюстративные мультидоменные антитела MD2407, MD3606 и эталонное антитело CR9114 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель (n=8) интраназально вводили MD2407, MD3606 и CR9114 в 3 дозах (0,02, 0,1 или 0,5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа А/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2) в дозе, составляющей 25×LD50. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Данное исследование показывает, что MD2407 и CR9114 обеспечивали полную защиту от А/Hong Kong/1/1968-MA в дозе ниже 0,1 и 0,5 мг/кг соответственно. MD3606 обеспечивало полную защиту даже в самой низкой дозе 0,02 мг/кг (фиг. 15).

Эффективность мультидоменного антитела MD3606 к вирусам гриппа А и В в отношении H3N2 после i.v. введения in vivo.

Иллюстративное мультидоменное антитело MD3606 и эталонное антитело CR9114 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель (n=8) внутривенно вводили MD3606 или CR9114 в 3 дозах (0,6, 1,7 или 5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа А/Hong Kong/1/1968-MA (H3N2) в дозе, составляющей 25×LD50. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Введение MD3606 и CR9114 в дозе ниже 1,7 мг/кг приводило к статистически значимому увеличению доли выживших по сравнению с контрольной группой с наполнителем. Мыши, которых обрабатывали 5 или 1,7 мг/кг MD3606, продемонстрировали менее значительное снижение веса тела, чем мыши, которых обрабатывали аналогичными дозами CR9114 (фиг. 16).

Эффективность мультидоменных антител MD2407 и MD3606 к вирусам гриппа А и В в отношении H1N1 после i.p. введения in vivo.

Иллюстративные мультидоменные антитела MD2407, MD3606 и эталонное антитело CR9114 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель (n=8) интраназально вводили MD2407, MD3606 или CR9114 в 3 дозах (0,02, 0,1 или 0,5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем. Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа А/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1) в дозе, составляющей 25×LD50. За выживаемостью и весом тела наблюдали в течение 21 дня после инфицирования. Введение 0,25 и 0,05 мг/кг MD2407 или CR9114 приводило к статистически значимому увеличению доли выживших по сравнению с контрольной группой с наполнителем, тогда как для MD3606 данное увеличение было значительным вплоть до самой низкой дозы, составляющей 0,01 мг/кг (фиг. 17).

Эффективность мультидоменного антитела MD3606 к вирусам гриппа А и В в отношении H1N1 после i.v. введения in vivo.

Иллюстративное мультидоменное антитело MD3606 и эталонное антитело CR9114 были выбраны для исследований нейтрализации вируса гриппа in vivo с использованием мышей Balb/C. Вкратце, самкам мышей Balb/C возрастом 6-8 недель (n=8) внутривенно вводили MD3606 или CR9114 в 3 дозах (0,6, 1,7 или 5 мг/кг). Другая группа из 8 мышей, получающая только буферный раствор, служила в качестве контрольной группы с наполнителем.

Через день после введения мышей интраназально заражали штаммом вируса гриппа А/Puerto Rico/8/1934-MA (H1N1) в дозе, составляющей 25×LD50. За выживаемостью и весом тела наблюдали в

течение 21 дня после инфицирования. Введение 1,7 и 5 мг/кг MD3606 и 5 мг/кг CR9114 приводило к статистически значимому увеличению доли выживших по сравнению с контрольной группой с наполнителем (фиг. 18).

Пример 11. Гуманизация sdAb.

Последовательности белков sdAb SD1036, SD1038, SD1046, SD1083, SD1084 и SD1087 выравнивали с помощью BLAST относительно V-генов человека из базы данных IMGT (<http://www.imgt.org>). Затем каждое sdAb выравнивали с наиболее гомологичными последовательностями V-генов человека. Последовательность FR4 каждого sdAb выравнивали с консенсусной последовательностью J человека WGQGTLLVTVSS. Аминокислотные различия в каркасных областях sdAb (FR) относительно выровненных последовательностей V и J человека приведены в табл. 39.

Таблица 39. Аминокислотные различия в каркасных областях относительно наиболее близкой последовательности V-гена и консенсусной последовательности J человека

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
SD1083 3-23*01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA TG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGV..... T.	FTLENKAIG FTFSSYAMS ..LENK.IG	WFRQTPGSEREGVL WVRQAPGKGLEWVS .F..T..SER.G.L	CISKSGSW AISGSGGS C..K..SW
SD1038 NL1*01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAV SI QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAA SG E.....L.....V .I	SIFDIYAMD FTFSSYGMH SI.DI.A.D	WYRQAPGKQRDIVA WVRQAPGKGLEWVS .Y.....QRDL.A	TSF-RDGS VIYSGGSS TSF-RDG.
SD1036 3-23*01	EVQLVESGGGLVQAGGSLKLSCAA SG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGV.....A....K..... ..	RT---YAMG FTFSSYAMS R.---...G	WFRQAPGKEREFVA WVRQAPGKGLEWVS .F.....ER.F.A	HINALGTR AISGSGGS H.NAL.TR
SD1046 3-23*04	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAA SG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGA.D...I.... ..	RTLSIYSMG FTFSSYAMS R.L.I.S.G	WFRQAPGKEREFVA WVRQAPGKGLEWVS .F.....ER.F.A	TIGWNSGR AISGSGGS T.GWNS.R
SD1084 3-66*01	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGK..... ..	FTFSTSWMY FTVSSNYMS ..F.TSW.Y	WLRQAPGKGLEWVS WVRQAPGKGLEWVS .L.....	VINTDGG VIYSGGS ..NTD.G
SD1087 3-23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVI SG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGVI ..	LSLDITYAVG FTFSSYAMS LSLDT..VG	WFRQAPGKEREGIT WVRQAPGKGLEWVS .F.....ER.GIT	CISSEGHM AISGSGGS C..SGH.M

	FR3	CDR3	FR4
SD1083 3-23*01	TYTDSMRGRFTISRDN AENTVYLQMDSLKP EDTAVYYC TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYC ...T..MR.....AE..V....D..KP	ATTAGGGGLCWDGTTFS RLASS ----- ----- ATTAGGGGLCWDGTTFS RLASS	WGQGTQVTV SS WGQGLVTV SSQ... ..
SD1038 NL1*01	TNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKP EDTAVYLC TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYC .N.....A.....KPL.	HVSLYRDPLGVAGGMGV Y ----- - HVSLYRDPLGVAGGMGV Y	WGKGALVTV SS WGQGLVTV SS ..K.A.... ..
SD1036 3-23*01	TYSDSVKGRFTISRDN AKNTEYLEMNNLKP EDTAVYYC TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYC ...S.....A...E..E..N.KP	TAQGQWRAAPVAVAAEY EF ----- -- TAQGQWRAAPVAVAAEY EF	WGQGTQVTV SS WGQGLVTV SSQ... ..
SD1046 3-23*04	TFYPDSLKGRFTISRDN ARNTLYLQMNNLRP EDTAVYYC TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYC .F.P..L.....AR.....N..P	AAAKGPLRLSSQADY ----- AAAKGPLRLSSQADY	WGQGTQVTV SS WGQGLVTV SSQ... ..
SD1084 3- 66*01	TYYADSVKDRFTISRDN AKDTLYLQMSSLKS EDTAVYYC TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCD.....A.D.....S..KS	AKDWGGPEPT ----- AKDWGGPEPT	RGQGTQVTV SS WGQGLVTV SS R....Q... ..
SD1087 3-23*04	TYYADSVKGRFTVSTDNAKNTVYLQMNGLQP EDTARYYC TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCV.T..A...V.....G.QPR...	ATESRYYCSDNWPAPQR YIY ----- --- ATESRYYCSDNWPAPQR YIY	WGQGTQVTV SS WGQGLVTV SSQ... ..

Затем получали несколько серий вариантов sdAb, в которых различные комбинации остатков FR, не относящихся к человеческим, были замещены их аналогами человеческого происхождения. Остатки 37, 44, 45 и 47 в FR2 и 103 в FR4 оставались во всех вариантах. Два остатка Met, один расположенный в CDR2 SD1087, а другой в CDR3 SD1038, также подвергали мутации с целью удаления возможного сайта окислирования Met. Аминокислотные последовательности всех вариантов sdAb SD1036, SD1038, SD1046, SD1083, SD1084 и SD1087 представлены в табл. 40. Гуманизированные варианты sdAb анализировали на предмет термостабильности, уровня экспрессии (в клетках HEK293) и нейтрализующей активности *in vitro*. Термостабильность оценивали для выбранных sdAb путем измерения их температур плавления с помощью DSC. Нейтрализующую активность *in vitro* определяли в стандартном 3-дневном VNA с использованием клеток MDCK и ~100 TCID₅₀ вируса гриппа. Значения IC₅₀, температуры плавления и уровни экспрессии представлены в таблицах 41-43. Также представлены число аминокислотных различий в каркасных областях sdAb (FR) относительно выровненных последовательностей V и J человека, а также % идентичности FR.

Таблица 40. Последовательности гуманизированных связывающих молекул по настоящему изобретению

Гуманизированные варианты SD1036	
SD3023 (SEQ ID NO: 146)	EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYAMSWFRQAPGKEREFVSHINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3024 (SEQ ID NO: 147)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMSWFRQAPGKEREFVSHINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3025 (SEQ ID NO: 148)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMSWFRQAPGKEREFVAHINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3026 (SEQ ID NO: 149)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMSWFRQAPGKEREFVSAINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3027 (SEQ ID NO: 150)	EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYAMSWFRQAPGKEREFVSAINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3028 (SEQ ID NO: 151)	EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYAMSWFRQAPGKEREFVAHINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3094 (SEQ ID NO: 152)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3095 (SEQ ID NO: 153)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3096 (SEQ ID NO: 154)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAHINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3097 (SEQ ID NO: 155)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
SD3098 (SEQ ID NO: 156)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAINAL GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTAQGQWRAA PVAVAAEYEFWGQGTQVTVSS
Гуманизированные варианты SD1038	
SD3013 (SEQ ID NO: 157)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVATS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
SD3014 (SEQ ID NO: 158)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
SD3015 (SEQ ID NO: 159)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVSVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYLCHVSLYRD

	PLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
SD3016 (SEQ ID NO: 160)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
SD3017 (SEQ ID NO: 161)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMHWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
SD3018 (SEQ ID NO: 162)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMHWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
SD3019 (SEQ ID NO: 163)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMHWYRQAPGKQRELVSVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
SD3020 (SEQ ID NO: 164)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMHWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGMGVYWGKALVTVSS
SD3021 (SEQ ID NO: 165)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGLGVYWGKALVTVSS
SD3022 (SEQ ID NO: 166)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGIGVYWGKALVTVSS
SD3029 (SEQ ID NO: 176)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGLGVYWGKALVTVSS
SD3030 (SEQ ID NO: 168)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGIGVYWGKALVTVSS
SD3031 (SEQ ID NO: 169)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGVGVYWGKALVTVSS
SD3032 (SEQ ID NO: 170)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGAGVYWGKALVTVSS
SD3033 (SEQ ID NO: 171)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSISIFDIYAMDWYRQAPGKQRDLVATS FRDGSTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLKPEDTAVYLCHVSLYRD PLGVAGGFGVYWGKALVTVSS
SD3089 (SEQ ID NO: 172)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMHWYRQAPGKQRELVSVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCHVSLYRD PLGVAGGLGVYWGQTLVTVSS
SD3078 (SEQ ID NO: 173)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVSVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCHVSLYRD PLGVAGGLGVYWGQTLVTVSS
SD3080 (SEQ ID NO: 174)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCHVSLYRD PLGVAGGLGVYWGQTLVTVSS
SD3079 (SEQ ID NO: 175)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCHVSLYRD PLGVAGGLGVYWGQTLVTVSS
SD3119 (SEQ ID NO: 176)	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVS FRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCHVSLYRD PLGVAGGIGVYWGQTLVTVSS
Гуманизированные варианты SD1046	
SD3041 (SEQ ID NO: 177)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSMSWFRQAPGKEREFVSAI GWNSGRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3042 (SEQ ID NO: 178)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSMSWFRQAPGKEREFVSTI GWNSGRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3043	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSMSWFRQAPGKEREFVATI

(SEQ ID NO: 179)	GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3044 (SEQ ID NO: 180)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTLSIYMSWFRQAPGKEREFVSTI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3045 (SEQ ID NO: 181)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTLSIYMSWFRQAPGKEREFVSAI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3046 (SEQ ID NO: 182)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTLSIYMSWFRQAPGKEREFVSTI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3047 (SEQ ID NO: 183)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTLSIYMSWFRQAPGKEREFVATI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3048 (SEQ ID NO: 184)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTLSIYMSWFRQAPGKEREFVSTI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3068 (SEQ ID NO: 185)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTLSIYMGWFRQAPGKEREFVSTI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3067 (SEQ ID NO: 186)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTLSIYMGWFRQAPGKEREFVATI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SD3099 (SEQ ID NO: 187)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTLSIYMGWFRQAPGKEREFVATI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 340	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTLSIYMGWFRQAPGKEREFVATI GWNSGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGP LRLSSQADYWGQGTQVTVSS
Гуманизированные варианты SD1083	
SD3005 (SEQ ID NO: 188)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAMSWFRQAPGKEREGVSCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3006 (SEQ ID NO: 189)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVSCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3007 (SEQ ID NO: 190)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVSCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLYQMNSLRAEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3008 (SEQ ID NO: 191)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVSCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLYQMNSLRPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3009 (SEQ ID NO: 192)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAMSWFRQAPGKEREGVLCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3010 (SEQ ID NO: 193)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3011 (SEQ ID NO: 194)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLYQMNSLRAEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3012 (SEQ ID NO: 195)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLYQMNSLRPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3088 (SEQ ID NO: 196)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
SD3087 (SEQ ID NO: 197)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCI SKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLYQMNSLRPEDTAVYYCATTTAG GGLCWDGTTFSRLASSWGQGTQVTVSS
Гуманизированные	

варианты SD1084	
SD3001 (SEQ ID NO: 198)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMSWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSS
SD3002 (SEQ ID NO: 199)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSS
SD3003 (SEQ ID NO: 200)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMSWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSS
SD3004 (SEQ ID NO: 201)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSS
SD3086 (SEQ ID NO: 202)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWVRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSS
SD3085 (SEQ ID NO: 203)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVI NTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGP EPTRGQGTQVTVSS
Гуманизированные варианты SD1087	
SD3049 (SEQ ID NO: 204)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAMSWFRQAPGKEREVSCI SSGHGMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTARYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3050 (SEQ ID NO: 205)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAMSWFRQAPGKEREVSCI SSGHGMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTARYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3051 (SEQ ID NO: 206)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAMSWFRQAPGKEREVSCI SSGHGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTARYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3052 (SEQ ID NO: 207)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAMSWFRQAPGKEREVSCI SSGHGLTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTARYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3053 (SEQ ID NO: 208)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAMSWFRQAPGKEREVSCI SSGHGFTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTARYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3054 (SEQ ID NO: 209)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAMSWFRQAPGKEREVSCI SSGHGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTARYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3055 (SEQ ID NO: 210)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAMSWFRQAPGKEREVSCI SSGHGLTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTARYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3056 (SEQ ID NO: 211)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAMSWFRQAPGKEREVSCI SSGHGFTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTARYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3069 (SEQ ID NO: 212)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREVSCI SSGHGMTYYADSVKGRFTVSTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3070 (SEQ ID NO: 213)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREVSCI SSGHGITYYADSVKGRFTVSTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3071 (SEQ ID NO: 214)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREVSCI SSGHGLTYYADSVKGRFTVSTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3072 (SEQ ID NO: 215)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREVSCI SSGHGMTYYADSVKGRFTVSTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3073 (SEQ ID NO: 216)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREVSCI SSGHGMTYYADSVKGRFTVSTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS
SD3074 (SEQ ID NO: 217)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREVSCI SSGHGMTYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGQGTQVTVSS

SD3075 (SEQ ID NO: 218)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGITYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS
SD3076 (SEQ ID NO: 219)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGLTYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS
SD3092 (SEQ ID NO: 220)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGMTYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS
SD3093 (SEQ ID NO: 221)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGMTYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS
SD3100 (SEQ ID NO: 222)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGATYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS
SD3101 (SEQ ID NO: 223)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGSTYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS
SD3102 (SEQ ID NO: 224)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGQTYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS
SD3103 (SEQ ID NO: 225)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGDTYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS
SD3104 (SEQ ID NO: 226)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCI SSGHGNTYYADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRY YCSDNWPAPQRYIYWGGGTLTVSS

Таблица 41. Средние титры нейтрализации (нМ), уровни экспрессии в HEK293, термостабильность и характеристики последовательностей гуманизированных sdAb к вирусу гриппа В (пустые ячейки означают "не определено")

ID	VNA IC ₅₀ (нМ)						Уровень экспрессии (мг/л) культуральной среды	T _m начала плавления (°C)	Кол-во FR-мутаций зародышевой линии	% идентичности FR
	B/Brisbane/60/08	B/Malaysia/2506/04	B/Florida/04/06	B/Harbin/7/94	B/Massachusetts/2/12	B/Lee/40				
SD1083	174	256	290	303	260	215		57, 6	19	79%
SD3005							0		5	94%
SD3006							0		5	94%
SD3007	>100 0			>100 0		>100 0	15		6	93%
SD3008	>100 0			>100 0		>100 0	157		7	92%
SD3009	194			516		372	6		6	93%
SD3010	149			173		227	15	57, 9	6	93%
SD3011	53			96		59	20	71, 0	7	92%

SD3012	59			78		60	132	74,3	8	91%
SD3087	32	81	160	201	104	91	161	75,1	7	92%
SD3088	101					127	9	58,7	5	94%
SD1084	12	26	68	322	35	>100 0		56,7	10	89%
SD3001	101			>100 0		>100 0	67		3	97%
SD3002	5			137		>100 0	50	65,3	3	97%
SD3003	101			>100 0		>100 0	68		4	96%
SD3004	5			101		>100 0	71	62,2	4	96%
SD3085	12	13	64	228	32	>100 0	133	66,2	2	98%
SD3086	40					>100 0	99	62,1	1	99%
SD1087	34	59	>100 0	>100 0	1000	22		74,7	17	81%
SD3049	>100 0			>100 0			32	68	8	91%
SD3050	>100 0			>100 0			53	66,5	10	89%
SD3051	>100 0			>100 0			62		8	91%
SD3052	>100 0			>100 0			57		8	91%
SD3053	>100 0			>100 0			29		8	91%
SD3054	>100 0			>100 0			60	65,7	10	89%
SD3055	>100 0			>100 0			48	66,2	10	89%
SD3056	>100 0			>100 0			26		10	89%
SD3069	56			>100 0		67	40	69,7	9	90%
SD3070	>100 0			>100 0		>100 0	26	70,9	9	90%
SD3071	>100 0			>100 0		>100 0	29	69,6	9	90%
SD3072	160			>100 0		318	20	65,2	8	91%
SD3073	28			>100 0		59	35	69,1	7	92%
SD3074	36			>100 0		42	27	66,2	8	91%
SD3075	>100 0			>100 0		>100 0	7	61,5	5	94%
SD3076	>100 0			>100 0		>100 0	6	61,1	5	94%
SD3092	51	40	>100 0	>100 0	>100 0	40	18	64,0	6	93%
SD3093	32	40	659	>100 0	795	32	21	69,4	7	92%
SD3100	>100 0			>100 0		>100 0	30		6	93%
SD3101	>100 0			>100 0		>100 0	29		6	93%
SD3102	>100 0			>100 0		>100 0	36		6	93%
SD3103	>100 0			>100 0		>100 0	43		6	93%
SD3104	>100 0			>100 0		>100 0	31		6	93%

Таблица 42. Средние титры нейтрализации (нМ), уровни экспрессии в HEK293, термостабильность и характеристики последовательностей гуманизированных sdAb SD1036 и SD1046 к вирусу гриппа А (пустые ячейки означают "не определено")

ID	VNA IC ₅₀ (нМ)						Уровень экспрессии (мг/л) культуральной среды	Т _м начала плавления (°C)	Кол-во FR-мутаций варошковой линии	% идентичности FR
	A/Brisbane/10/07	A/Hong Kong/1/68-ma	A/waterfowl/Hong Kong/MPA892/06	A/mallard/Netherlands/12/00	A/New York/107/03 (PR8)	A/chicken/Germany/n/49				
SD1036	59	78	44	6	11	10		56,5	16	82%
SD3023	64	206		5	16		113		7	92%
SD3024	80	206		8	20		40	51,5	5	94%
SD3025	160	280		5	13		122	59,8	6	93%
SD3026	16	36		3	8		59	58,5	5	94%
SD3027	16	30		5	6		106		7	92%
SD3028	101	280		6	26		114		8	91%
SD3094	8	20		<4	6		59	60,8	5	94%
SD3095	8	26		<4	6		102	64,1	6	93%
SD3096	26	20		<4	5		121	66,2	7	92%
SD3097	17	32	6	6	8	6	79	70,5	5	94%
SD3098	4	20		<4	16		114	74,2	6	93%
SD1046	5	26	3	25	34	13		58,3	16	82%
SD3041		858		>100 0	>100 0		134		5	94%
SD3042		253		>100 0	>100 0		100	63,8	5	94%
SD3043		466		>100 0	>100 0		89	71,2	6	93%
SD3044		253		>100 0	>100 0		138		7	92%
SD3045		632		>100 0	>100 0		92		6	93%
SD3046		253		>100 0	>100 0		92		6	93%
SD3047		253		>100 0	>100 0		94		7	92%
SD3048		343		>100 0	858		36		8	91%
SD3067	3	8		10	16		101	63,3	8	91%
SD3068	4	10		10	26		107	55,9	7	92%
SD3099	3	3	2	26	16	5	98	63,5	7	92%

Таблица 43. Средние титры нейтрализации (нМ), уровни экспрессии в HEK293, термостабильность и характеристики последовательностей гуманизированного sdAb SD1038 к вирусу гриппа А (пустые ячейки означают "не определено")

ID	VNA IC ₅₀ (нМ)						Уровень экспрессии (мг/л) культуральной среды	Т _м начала плавления (°C)	Кол-во FR-мутаций зародышевой линии	% идентичности FR
	A/California/07/09	A/New Caledonia/20/99	A/Puerto Rico/8/34-ma	A/Vietnam/1194/04	A/Brisbane/10/07	A/Hong Kong/1/68				
SD1038	2	7	10	15	284	251		60,4	17	81%
SD3013		6	8	20	318	126	109		10	89%
SD3014		3	4	11			97	72	10	89%
SD3015		3	3	6			46	63,7	9	90%
SD3016		3	3	8			99	74,5	11	88%
SD3017		4	6	11			150		10	89%
SD3018		6	3	8			84	69,6	10	89%
SD3019		4	6	8			49	60,3	9	90%
SD3020		4	4	15			93	72,6	11	88%
SD3021	3	3	3	15	>1000		80	73,4	11	88%
SD3022	3	8	6	20	632		96		11	88%
SD3029	3	4	2	20	632	251	22		17	81%
SD3030	3	8	6	20	274	126	37		17	81%
SD3031		37	15	51	>1000		19		17	81%
SD3032		>500	>500	>500			17		17	81%
SD3033		51	51	316			11		17	81%
SD3078		8	3	20	632		81	68,6	6	93%
SD3079		5	3	16	949	503	85	75,3	7	92%
SD3080		5	3	16	632		89	78,6	8	91%
SD3089		3	2	20	1188		87	66,2	6	93%
SD3119		3		6	253	101		75,3	6	93%

Гуманизация SD1036.

Для SD1036 получали 11 гуманизированных вариантов. Несколько из этих вариантов продемонстрировали такую же или в некоторых случаях даже лучшую нейтрализующую активность по сравнению с исходным sdAb. Никаких существенных различий в уровнях экспрессии не наблюдалось, тогда как для большинства вариантов SD1036 температура начала плавления повышалась. Вариант SD3097 был выбран в качестве конечного гуманизированного варианта, поскольку он имел наименьшее число FR-мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии человека, высокое значение Т_м начала плавления и кроме того продемонстрировал эффективную нейтрализацию всех тестируемых штаммов вируса гриппа группы 2.

Гуманизация SD1038.

Для SD1038 получали 21 гуманизированный вариант. Все варианты, за исключением SD3031-33, продемонстрировали такую же нейтрализующую активность в отношении 4 штаммов группы 1, что и исходное sdAb. Значения IC₅₀ для штаммов H3 A/Brisbane/10/07 и A/Hong Kong/1/68 были несколько выше для большинства вариантов SD1038. Вариант SD3119 был выбран в качестве конечного гуманизированного варианта, поскольку он имел наименьшее число FR-мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии человека, высокое значение Т_м начала плавления и продемонстрировал эффективную нейтрализацию всех тестируемых штаммов вируса гриппа. В данном варианте Met в CDR3

замещен на Ile.

Гуманизация SD1046.

Для SD1046 получали 11 гуманизированных вариантов. Первая серия вариантов продемонстрировала сильно сниженную нейтрализующую активность по сравнению с исходным sdAb. Была получена вторая серия вариантов, которая продемонстрировала активность, очень похожую на таковую для SD1046 в VNA. Из этих вариантов SD3099 был выбран в качестве конечного гуманизированного варианта, поскольку он имел наименьшее число FR-мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии человека и продемонстрировал высокую термостабильность.

Гуманизация SD1083.

Для SD1083 получали 10 гуманизированных вариантов. Несколько из этих вариантов продемонстрировали низкие уровни экспрессии в клетках HEK293 и 2 не экспрессировались вовсе. Из 3 вариантов, которые хорошо экспрессировались, SD3087 был выбран в качестве конечного гуманизированного варианта. Это sdAb являлось более эффективным, чем исходное SD1083 в VNA, и характеризовалось значительно более высоким значением T_m начала плавления.

Гуманизация SD1084.

Для SD1084 получали 6 гуманизированных вариантов. Из этих вариантов четыре продемонстрировали такую же нейтрализующую активность в VNA, что и исходное sdAb. Из этих вариантов SD3085 был выбран в качестве конечного гуманизированного варианта, поскольку он характеризовался самым высоким значением T_m начала плавления и имел только 2 FR-мутации по сравнению с последовательностями зародышевой линии человека.

Гуманизация SD1087.

Для SD1087 получали 23 гуманизированных варианта. Первая серия из 8 вариантов не продемонстрировала измеряемой активности в VNA в отношении 2 штаммов вируса гриппа В. Была получена вторая серия SDAb, которая включала число вариантов, характеризующихся значениями IC_{50} , схожими с таковыми для SD1087. Термостабильность этих вариантов была ниже, чем таковая исходной молекулы. Ни один из вариантов, содержащих замену Met в CDR2, не продемонстрировал активность в VNA. SD3093 был выбран в качестве конечного гуманизированного варианта, поскольку он продемонстрировал лишь незначительное снижение значения T_m начала плавления и его активность в VNA была такой же, что и у SD1087.

Пример 12. Образование и определение характеристик мультимерных конструкций на основе гуманизированных sdAb, содержащих Fc.

Образование конструкций слияния, содержащих Fc.

Для образования мультимерных конструкций слияния, содержащих Fc, применяли гуманизированные варианты sdAb, описанные в примере 11. Гуманизированные мультимерные связывающие молекулы, то есть мультимерные связывающие молекулы, содержащие по меньшей мере два гуманизированных sdAb, сливали непосредственно с N-концом Fc-области. Конструкции слияния, содержащие Fc, были экспрессированы в клетках млекопитающих и секретируются в среду в виде димерных молекул с Fc. Полные аминокислотные последовательности конструкций слияния, содержащих Fc, показаны в табл. 44. Образовывались гомодимерные, а также гетеродимерные молекулы слияния, содержащие Fc. Гетеродимерные слияния, содержащие Fc, образовывались путем введения точечных мутаций (K409R и F405L) в домен CH3 2 Fc-цепей, как описано Labrijn et al. (2013), или путем введения мутаций "выступы-во-впадинах", как описано в EP 0812357 B1 и EP 0979281 B1.

Генные конструкции, кодирующие мультимерные белки слияния на основе гуманизированных sdAb, содержащие Fc, были кодон-оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих и введены в векторы Lonza pEE12.4. Векторы экспрессии (в которых использовался сигнальный пептид CD4 HC) амплифицировали, очищали и концентрировали до конечной концентрации >5 мг/мл в стерильной воде для трансфекции клеточных линий CHO с помощью электропорации. Гетеродимерные белки слияния, содержащие Fc, получали посредством котрансфекции равными количествами векторов, кодирующих 2 отдельные цепи. Гомодимерные Fc-слияния получали с применением одной векторной конструкции, как указано выше. Клеточные культуры выращивали с применением стандартных процедур с использованием встряхиваемых колб для культур в суспензионной фазе. Отфильтрованные супернатанты культур вносили в колонки HiTrap MabSelect SuRe, промывали PBS, элюировали 0,1 М ацетатом натрия, pH 3,5, нейтрализовали с применением 2,5 М Трис, pH 7,2, и подвергали диализу в dPBS.

Таблица 44. Аминокислотные последовательности мультимерных конструкций
на основе гуманизированных sdAb, содержащих Fc

FM1W3	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWF RQAPGKERE FVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGVLVQ PGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGSWTYADSVKGRFT ISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTLLV TVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPG KGLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD WGGPEPTRGQGTLLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 293
FM1W4	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGS WTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTF SRLASSWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIF DIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGVYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKLEWVSVINTDGGTYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTLLTVSSGGG GSGGGGSEVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKERE FVAAIN	SEQ ID NO: 294

	ALGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTAQGQWRAAPVA VAAEYEFWGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
FM1W5	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSM GWFRQAPGKEREFEVATIGWNSGRTFYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAAAGKPLRLSSQADYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPG GGSLRLSCAASGFTLENKAI GWFRQAPGKEREGLVLCISKSGSWTYYADSVKGRFTI SRDN SKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGLTVT VSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGK GLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDW GGPEPTRGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 295
FM1W6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSMGWFRQAPGKEREFEVATIGWNSG RTFYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAAGKPLRLSSQADYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDW YRQAPGKQRELVAVSFRDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAV YYCHVSLYRDPLGVAGGIGVYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISR RDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAI GWFRQAPGKEREGLVLCISKSGS WTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTF SRLASSWGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 296
FM1W7	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSM GWFRQAPGKEREFEVATIGWNSGRTFYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAAAGKPLRLSSQADYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREGLVSCISSGHGMTYYADSVKGRFTI	SEQ ID NO: 297

	STDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRYYCSDNWPAPQRYIYWGGQTLTVS SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGL EWWSVINTDGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGG PEPTRGQGTTLTVSSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	
FM1W8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREGVSCISSGHG MTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRYYCSDNWPAPQ RYIYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST SWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGSYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGVYWGQGTTLTVSSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLISYSMGWFRQAPGKEREFVATI GWNSGRTFYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGPLRLSS QADYWGQGTTLTVSSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 298
FM1B67 , 1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWF RQAPGKEREFVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTTLTVSSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 299
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGG TYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLV TVSSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPG KEREGVLCISKSGSWTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAT TTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGTTLTVSSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 300

FM1B68 , 1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWF RQAPGKERE FVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGT LVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLT VLVHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 301
	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGS WTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTF SRLASSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF STSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGT LVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLT VLVHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFLLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 302
FM1B69 , 1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWF RQAPGKERE FVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGT LVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLT VLVHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 303
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREGVSCISSGHG MTYYADSVKGRFTISTDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRYYCSDNWPAPQ RYIYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST SWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGT LVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLT VLVHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 305
FM1B70 , 1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSM GWFRQAPGKERE FVATIGWNSGRTFYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED	SEQ ID NO: 306

	TAVYYCAAAGKPLRLSSQADYWGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGG TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLV TVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPG KEREGVLCISKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAT TTAGGGCLWDGTTFSRLASSWGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFLLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 307
FM1B71 , 1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSM GWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAAGKPLRLSSQADYWGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 308
	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGS WTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATTTAGGGCLWDGTTF SRLASSWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF STSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFLLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 309
FM1B72 , 1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSM GWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAAGKPLRLSSQADYWGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTV	SEQ ID NO: 310

	DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSDTYAVGWFRQAPGKEREGVSCISSGHG MTYYADSVKGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRYYCSDNWPAPQ RYIYWGGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST SWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 311
FM1B73 , 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAAINALGTRTY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMD WYRQAPGKQRELVAVSFRDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCHVSLYRDPLGVAGGIGVYWGQGTTLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 312
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGG TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPG KEREGVLCISKSGSWTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAT TTAGGGCLWDGTTFSRLASSWGQGTTLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 313
FM1B74 , 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAAINALGTRTY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMD WYRQAPGKQRELVAVSFRDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCHVSLYRDPLGVAGGIGVYWGQGTTLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 314
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGS WTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATTTAGGGCLWDGTTF	SEQ ID NO: 315

	SRLASSWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF STSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFLLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
FM1B75 , 1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAAINALGTRTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTAQQQWRAAPVAVAAEYEF WGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMD WYRQAPGKQRELVA VSRFDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCHVSLYRDP LGVAGGIGVYWGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 316
	EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREGVSCISSGHG MTYYADSVKGRFTISTDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCATESRYYCSDNWPAPQ RYIYWQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST SWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRA EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 317
FM1B76 , 1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVA VSRFDGS TYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCHVSLYRDP LGVAGGIGV YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGW FRQAPGKEREFVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAV YYCTAQQQWRAAPVAVAAEYEFWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGSWTYADSVKGRFT ISRDN SKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGLTV TVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPG KGLEWVSVINTDGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK DWGGPEPTRGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 318
	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN	SEQ ID NO:

	WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	319
FM1B67 , 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWF RQAPGKEREFVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTTLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 320
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGG TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLV TVSSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPG KEREGVLCISKSGSWTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAT TTAGGGCLWDGTTFSRLASSWGQGTTLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTV VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 321
FM1B68 , 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWF RQAPGKEREFVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGTTLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 322
	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGS WTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATTTAGGGCLWDGTTF SRLASSWGQGTTLTVSSGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF STSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTV VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 323

	KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
FM1B69 , 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWF RQAPGKEREFVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGT LVT VSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKP KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLT VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 324
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDITYAVGWFRQAPGKEREGVSCISSGHG MTTYADSVKGRFTISTDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRYYCSDNWPAPQ RYIYWGGQGT LVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST SWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGT LVT VSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKP KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLT VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 325
FM1B70 , 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTL SIYSM GWFRQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAAGPLRLSSQADYWGQGT LVT VSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLT VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 326
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKGLEWVSVINTDGG TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGT LVT VSSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPG KEREGLVLCISKSGSWTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAT TTAGGGCLWDGTTFSRLASSWGQGT LVT VSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLT VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 327
FM1B71 , 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV	SEQ ID NO: 328

	YWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSM GWFRAQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAAAGKFLRLSSQADYWGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRAQAPGKEREGVLCISKSGS WYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTF SRLASSWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF STSWMYWLRQAPGKLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SL RAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 329
FM1B72 , 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVA VSF RDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSIYSM GWFRAQAPGKEREFVATIGWNSGRTFYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAAAGKFLRLSSQADYWGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 330
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSLDTYAVGWFRQAPGKEREGVSCISSGHG MTYYADSVKGRFTISTDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCATESRYYCSDNWPAPQ RYIYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST SWMYWLRQAPGKLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRA EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 331
FM1B73 , 2	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWFRQAPGKEREFVAAINALGTRTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMD WYRQAPGKQRELVA VSF RDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCHVSLYRDPLGVAGGIGVYWGQGTTLVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST	SEQ ID NO: 332

	YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDGSGFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSWMYWLRQAPGKLEWVSVINTDGG TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGT TVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPG KEREGVLCISKSGSWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAT TTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGT LVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDGSGFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 333
FM1B74 , 2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGR TYAMGWFRQAPGKEREFVAAINALGTRTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMD WYRQAPGKQRELVA VSF RDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCHVSLYRDPLGVAGGIGVYWGQGT LVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDGSGFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKK	SEQ ID NO: 334
	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGS WTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTF SRLASSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF STSWMYWLRQAPGKLEWVSVINTDGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGT LVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDGSGFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 335
FM1B75 , 2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGR TYAMGWFRQAPGKEREFVAAINALGTRTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEF WGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMD WYRQAPGKQRELVA VSF RDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCHVSLYRDPLGVAGGIGVYWGQGT LVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDGSGFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 336

	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGLSDTYAVGWFRQAPGKEREGVSCISSGHG MTYYADSVKGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATESRYYCSDNWPAPQ RYIYWQGGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTST SWMYWLRQAPGKLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDWGGPEPTRGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 337
FM1B76 , 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASISIFDIYAMDWYRQAPGKQRELVAVSFRDGS TYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCHVSLYRDPLGVAGGIGV YWQGGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTYAMGWF RQAPGKEREFVAAINALGTRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTAQGQWRAAPVAVAAEYEFWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTLENKAIGWFRQAPGKEREGVLCISKSGSWTYADSVKGRFT ISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATTTAGGGLCWDGTTFSRLASSWGQGLTV TVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTSWMYWLRQAPG KLEWVSVINTDGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD WGGPEPTRGQGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 338
	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	SEQ ID NO: 339

Нейтрализация вируса гриппа мультимерными белками слияния на основе гуманизированных sdAb, содержащими Fc.

Очищенные белки слияния, содержащие Fc, тестировали в анализах нейтрализации вируса гриппа, как описано в примере 6, и они продемонстрировали такую же эффективность и спектр нейтрализации при сравнении с соответствующими версиями дикого типа. Средние титры нейтрализации для различных штаммов вируса гриппа представлены в табл. 45.

Таблица 45. Средние титры нейтрализации (нМ) мультимерных конструкций на основе гуманизированных sdAb, содержащих Fc

	H3 A/Brisbane/10/07	H7 A/NIBRG/60 (A/mallard/Netherlands/12/00)	B/Brisbane/60/08	B/Harbin/7/94	H1 A/New Caledonia/20/99	H5 A/Vietnam/1194/04
FM1W3	16	8	16	8	6	10
FM1W4	40	16	8	6	32	32
FM1W5	16	6	10	10	6	8
FM1W6	16	13	8	6	40	32
FM1W7	10	8	16	6	5	13
FM1W8	40	51	4	3	40	40
FM1B67,1	16	16	4	6	6	16
FM1B68,1	16	16	6	6	6	16
FM1B69,1	26	16	3	6	6	16
FM1B70,1	16	16	6	5	6	16
FM1B71,1	32	16	6	6	16	26
FM1B72,1	16	16	3	6	10	16
FM1B73,1	16	16	5	6	101	101
FM1B74,1	20	16	6	6	80	101
FM1B75,1	16	16	3	5	80	101
FM1B76,1	16	16	16	16	13	20

Ссылки.

- Adam et al., Clinical and Vaccine Immunology, 2014; 21(11): 1528-1533.
- Brandenburg et al., PLoS One, 2013; 8(12):e80034.
- Corti et al., Science, 2011; 333:850-856.
- Dreyfus et al., Science, 2012; 337:1343-1348.
- Ekiert et al., Science, 2009; 324:246-251.
- Ekiert et al., Science, 2011; 333:843-850.
- Ekiert et al. Nature, 2012; 489:526-532.
- Hessell et al. Nature, 2007; 449:101-104.
- Hufton et al., PLoS One, 2014; 9(8):e103294.
- Hultberg et al., PLoS One, 2011; 6(4):e17665.
- Johnson et al., Nat Med, 2009; 15(8):901-906.
- Kashyap et al., PLoS Pathog., 2010; 6:e1000990.
- Klein et al., mAbs, 2012; 4(6):653-663
- Krause et al., J Virol., 2012; 86:6334-6340.

- Kuo et al., *mAbs*, 2011; 3(5):422-430.
 Labriijn et al. *PNAS*, 2013; 110(13):5145-50.
 Lee et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109:17040-17045.
 Limberis et al., *Sci Transl Med.*, 2013; 5(187): 1-8.
 Strohl, *Current Opinion in Biotechnology*, 2009; 20:685-691.
 Sui et al., *Nat Struct Mol Biol.*, 2009; 16:265-273.
 Suscovich и Alter, *Expert Rev Vaccines*, 2015; 14(2): 205-219.
 Tan et al., *J Virol.*, 2012; 86:6179-6188.
 Throsby et al., *PLoS One*, 2008; 3:e3942.
 Tillib et al., *Antiviral Res.*, 2013; 97(3):245-54.
 Tsibane et al., *PLoS Pathog.*, 2012; 8:e1003067.
 Vanlandschoot et al., *Antiviral Research*, 2011; 92(3), 389-407.
 Wang et al., *PLoS Pathog.*, 2010b; 6:e1000796.
 Xu et al., *Science*, 2010; 328(5976):357-60.
 Yoshida et al., *PLoS Pathog.*, 2009; 5:e1000350.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Однодоменное антитело, которое представляет собой VHH верблюдовых или гуманизированный VHH верблюдовых, способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, при этом указанные штаммы содержат НА двух различных подтипов НА из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В, где однодоменное антитело включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17 и 155.

2. Однодоменное антитело, которое представляет собой VHH верблюдовых или гуманизированный VHH верблюдовых, способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, при этом указанные штаммы содержат НА двух различных подтипов НА из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В, где однодоменное антитело включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20 и 176.

3. Однодоменное антитело, которое представляет собой VHH верблюдовых или гуманизированный VHH верблюдовых, способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, при этом указанные штаммы содержат НА двух различных подтипов НА из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В, где однодоменное антитело включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24 и 197.

4. Однодоменное антитело, которое представляет собой VHH верблюдовых или гуманизированный VHH верблюдовых, способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, при этом указанные штаммы содержат НА двух различных подтипов НА из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В, где однодоменное антитело включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 25 и 203.

5. Однодоменное антитело по любому из пп.1-4, которое связывается с эпитопом в стеблевой области НА.

6. Однодоменное антитело по любому из пп.1-4, которое связывается с эпитопом в области, представляющей собой головку НА вируса гриппа В.

7. Однодоменное антитело по любому из пп.1-6, которое способно нейтрализовать по меньшей мере два штамма вируса гриппа А, при этом указанные штаммы содержат НА двух различных подтипов НА из филогенетической группы 2; или по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической

группы 1 и по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или по меньшей мере один штамм вируса гриппа В.

8. Однодоменное антитело по любому из пп.1-7, дополнительно содержащее Fc-концевую часть.

9. Однодоменное антитело по п.8, где Fc-концевая часть представляет собой Fc-концевую часть IgG человека.

10. Мультидоменное антитело, способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, при этом указанные штаммы содержат НА двух различных подтипов НА из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного вируса гриппа А из филогенетической группы 1 и по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2; или способное специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В, содержащее по меньшей мере два однодоменных антитела по любому из пп.1-7.

11. Мультидоменное антитело по п.10, которое способно специфично связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 1, по меньшей мере одного штамма вируса гриппа А из филогенетической группы 2 и по меньшей мере одного штамма вируса гриппа В.

12. Мультидоменное антитело по п.10 или 11, которое способно нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 1, по меньшей мере один штамм вируса гриппа А из филогенетической группы 2 и по меньшей мере один штамм вируса гриппа В.

13. Мультидоменное антитело по любому из пп.10-12, дополнительно содержащее Fc-концевую часть.

14. Мультидоменное антитело по п.13, где Fc-концевая часть представляет собой Fc-концевую часть IgG человека.

15. Мультидоменное антитело по п.14, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320 и 321.

16. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное антитело по любому из пп.1-9 или мультидоменное антитело по любому из пп.10-15.

17. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.16.

18. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа, содержащая однодоменное антитело по любому из пп.1-9, мультидоменное антитело по любому из пп.10-15, молекулу нуклеиновой кислоты по п.16 и/или вектор по п.17.

19. Применение однодоменного антитела по любому из пп.1-9 в диагностике инфекции, вызванной вирусом гриппа.

20. Применение мультидоменного антитела по любому из пп.10-15 в диагностике инфекции, вызванной вирусом гриппа.

21. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.16 в диагностике инфекции, вызванной вирусом гриппа.

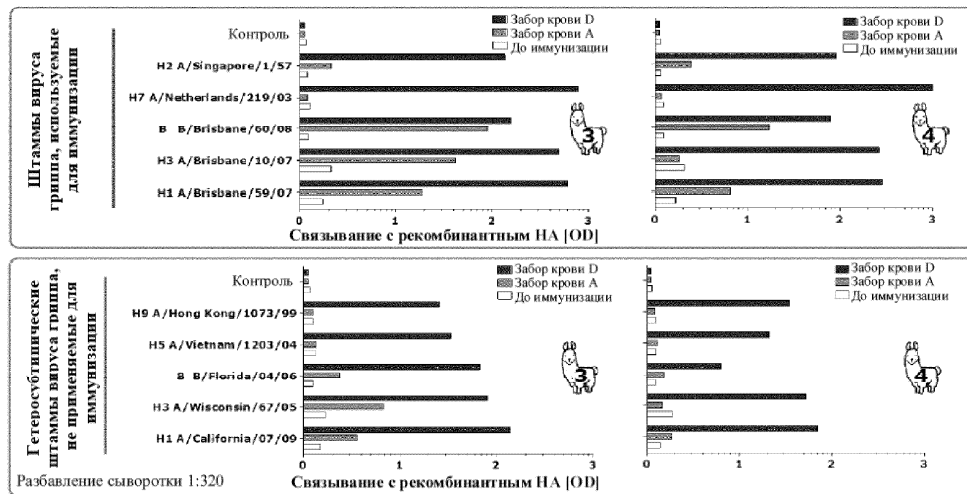
22. Применение вектора по п.17 в диагностике инфекции, вызванной вирусом гриппа.

23. Применение однодоменного антитела по любому из пп.1-9 в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

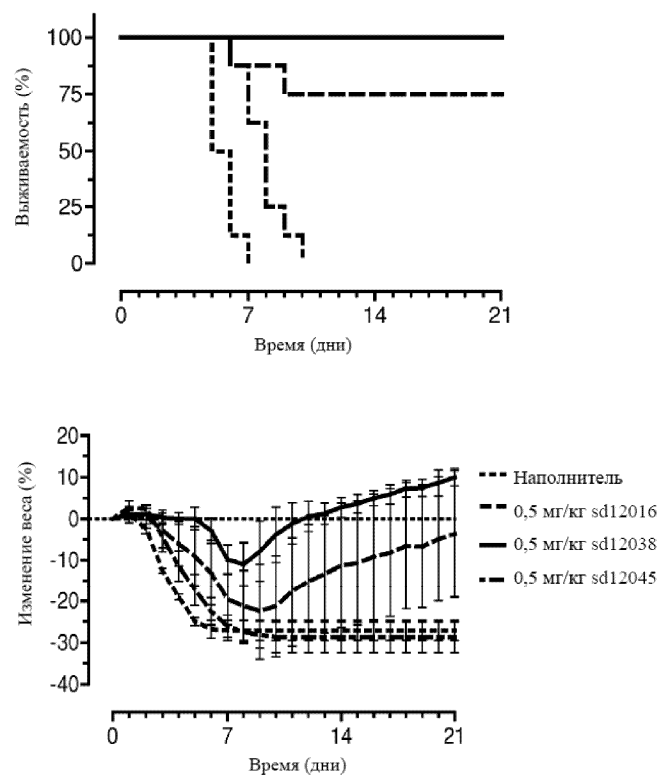
24. Применение мультидоменного антитела по любому из пп.10-15 в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

25. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.16 в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

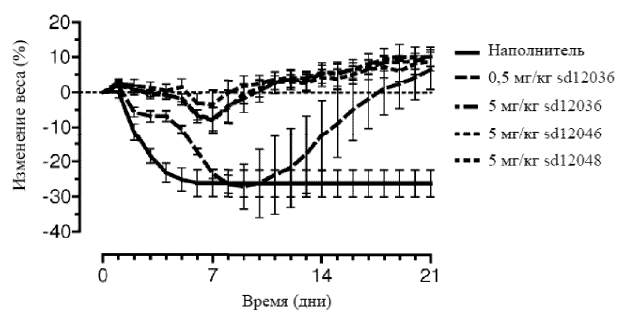
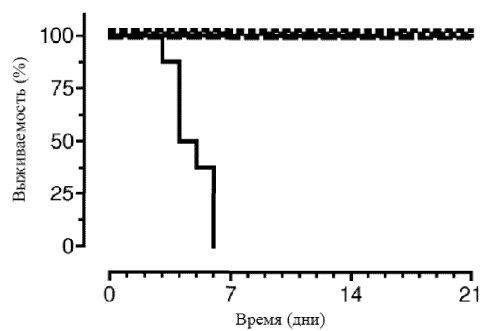
26. Применение вектора по п.17 в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.



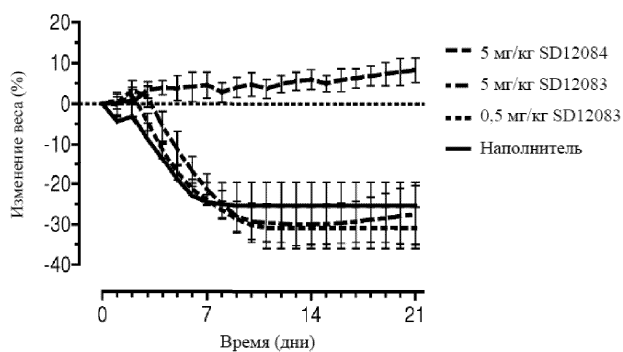
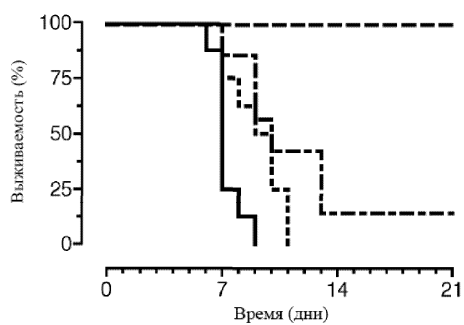
Фиг. 1



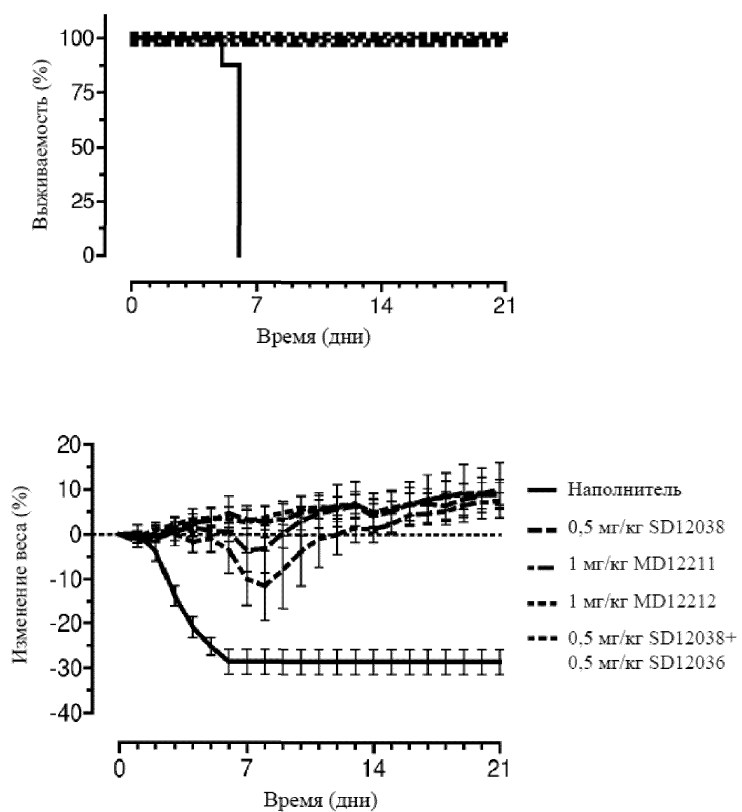
Фиг. 2



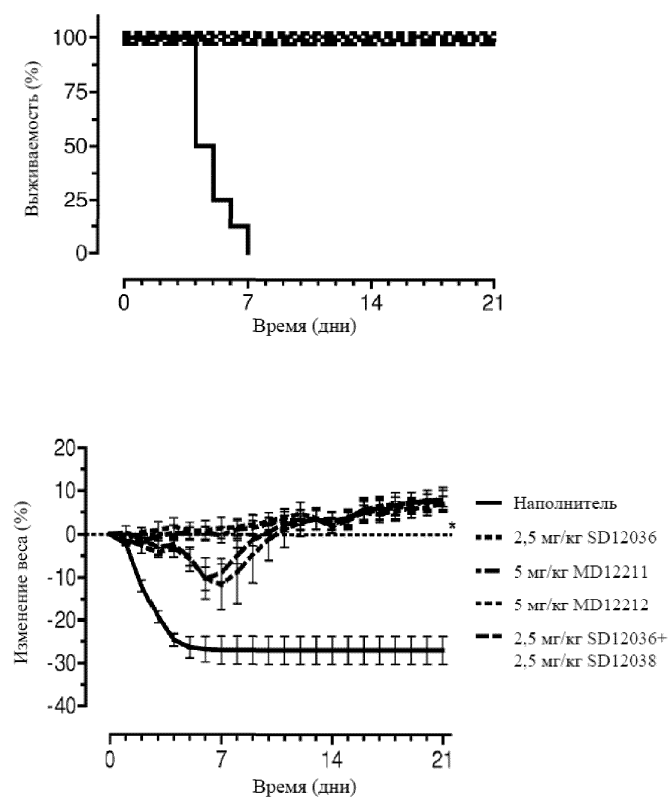
Фиг. 3



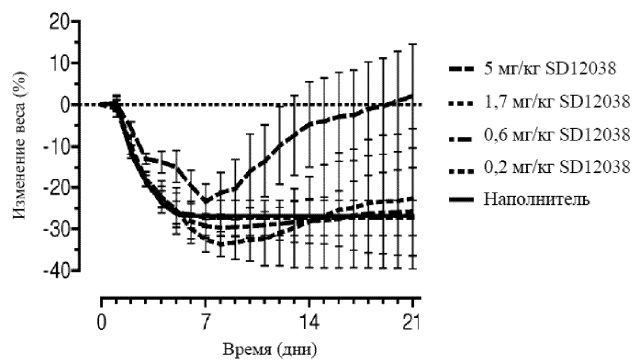
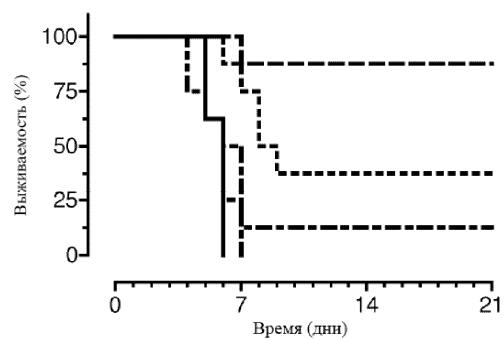
Фиг. 4



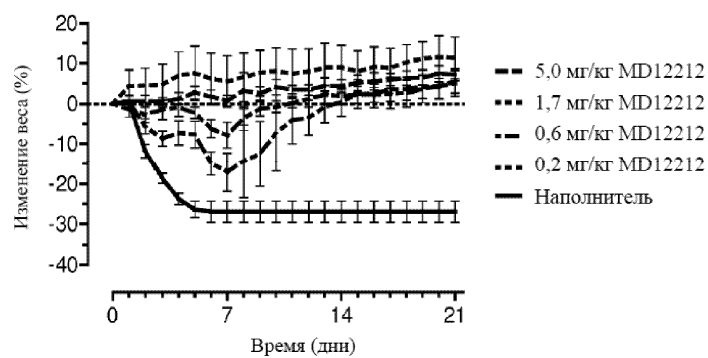
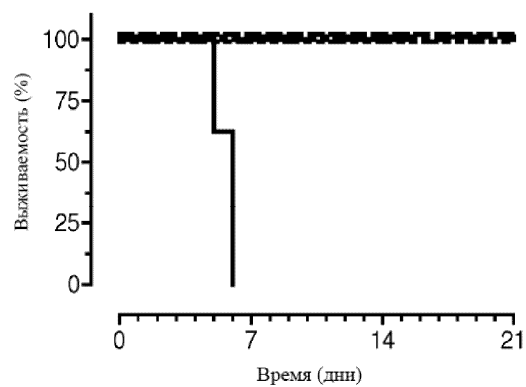
Фиг. 5



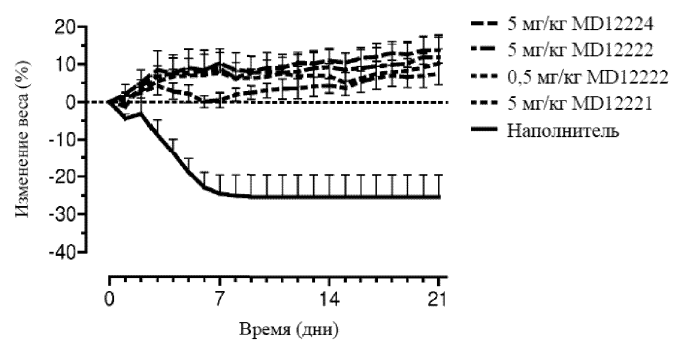
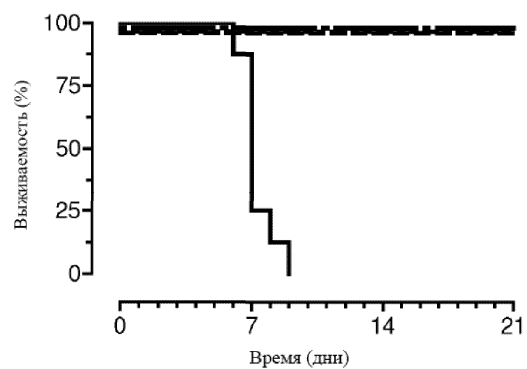
Фиг. 6



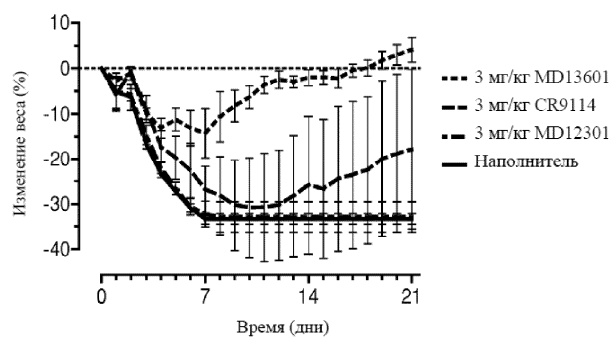
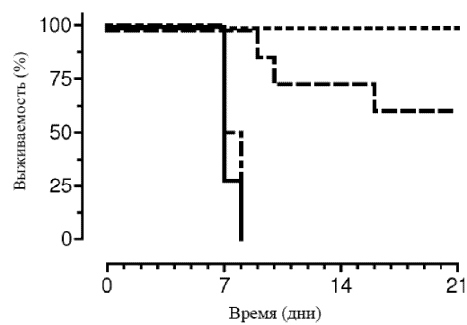
Фиг. 7а



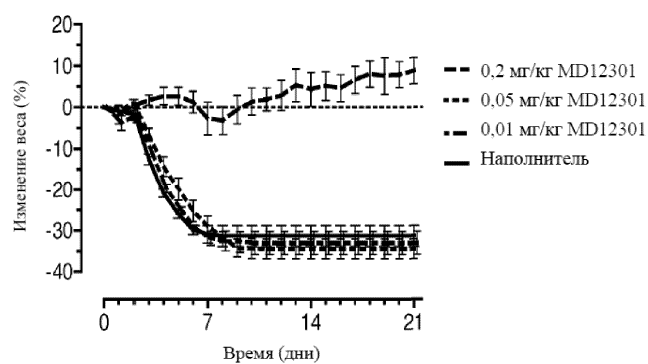
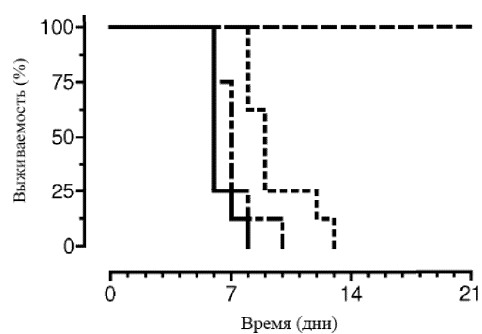
Фиг. 7b



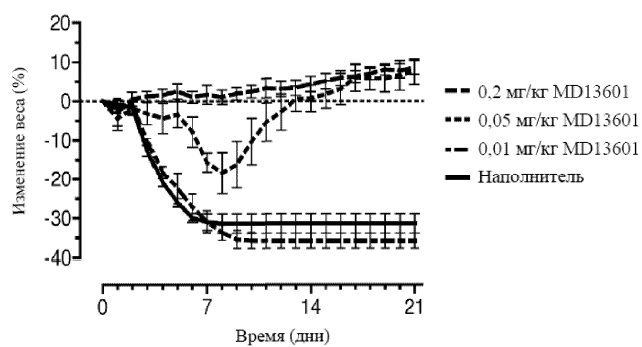
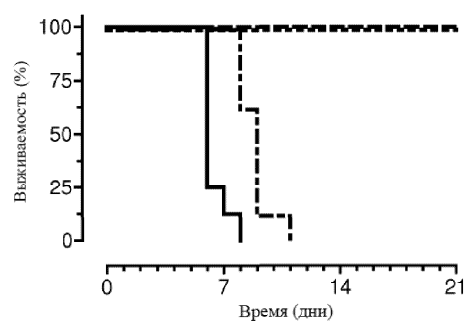
Фиг. 8



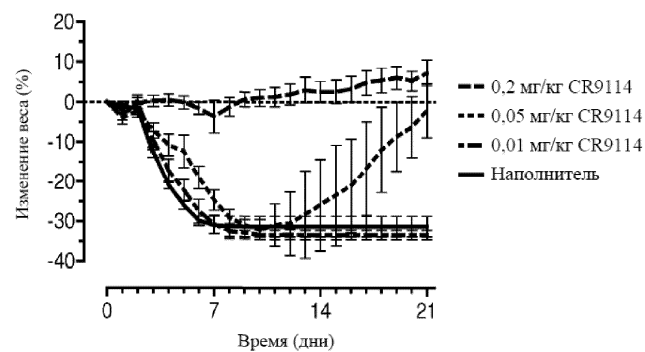
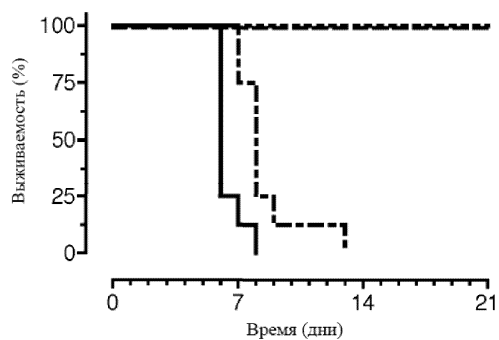
Фиг. 9



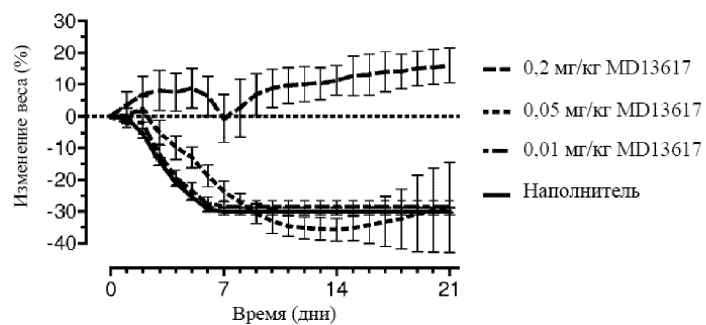
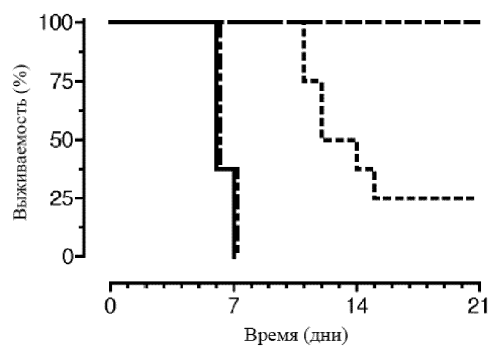
Фиг. 10a



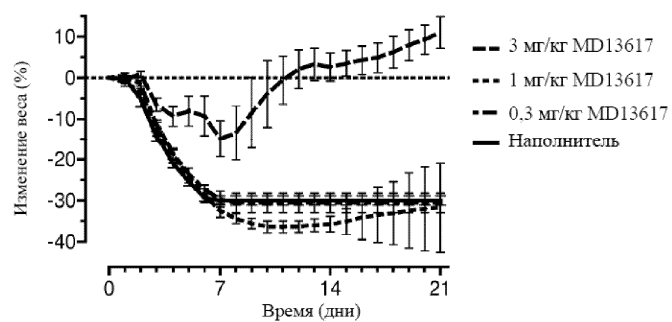
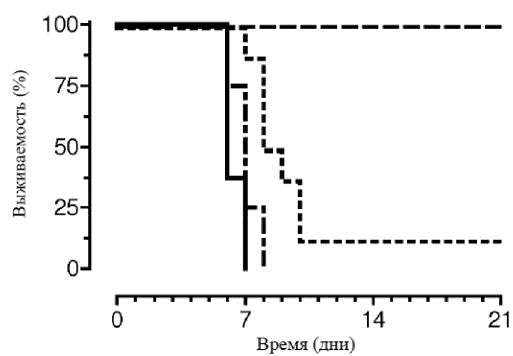
Фиг. 10b



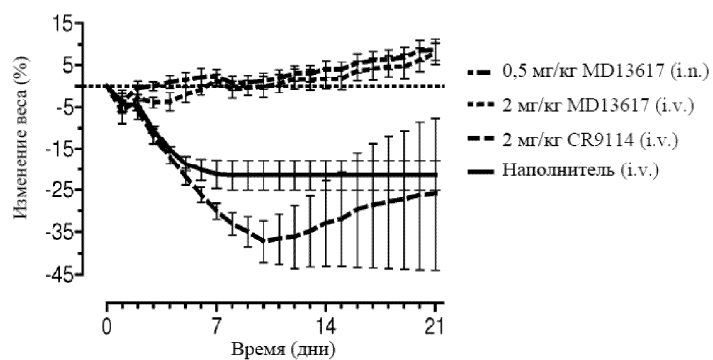
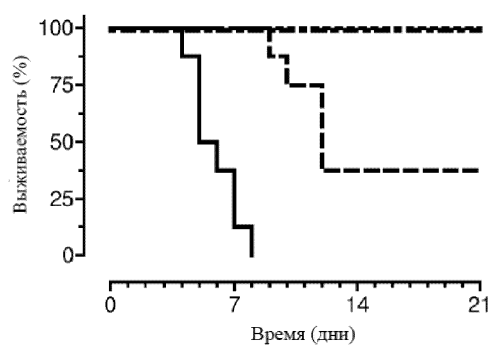
Фиг. 10с



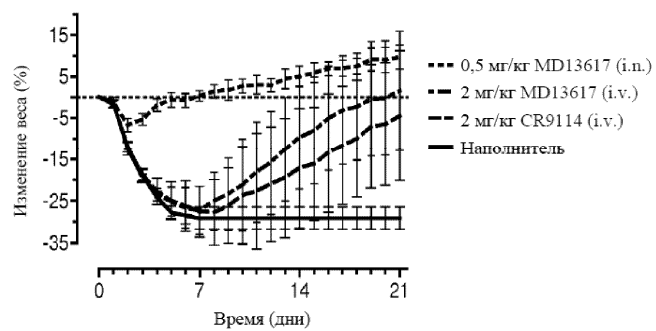
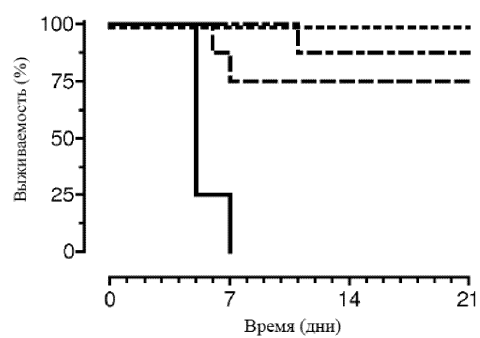
Фиг. 11а



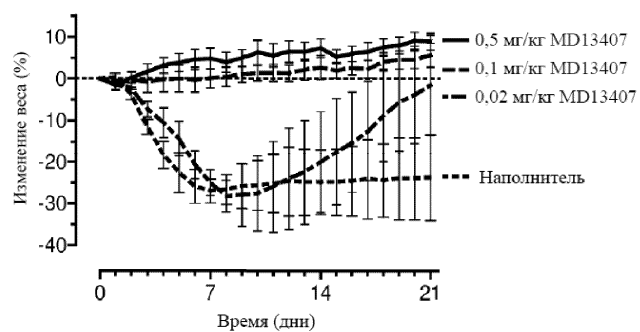
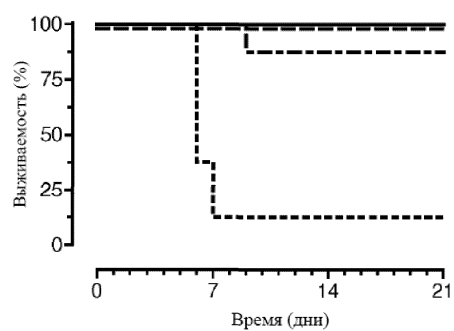
Фиг. 11b



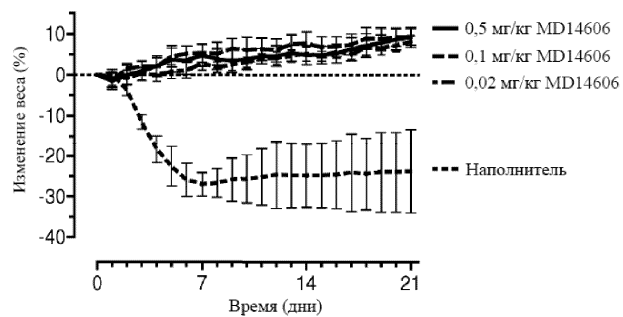
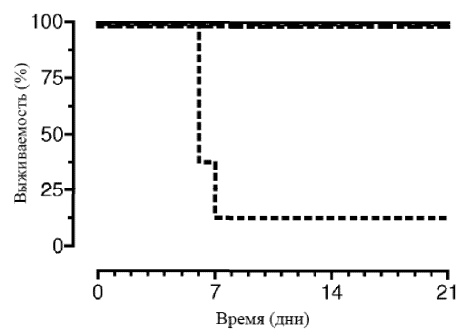
Фиг. 12a



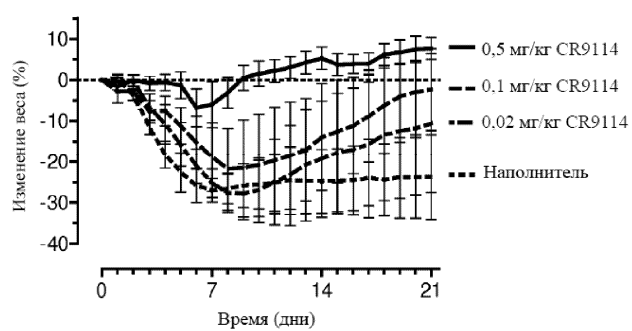
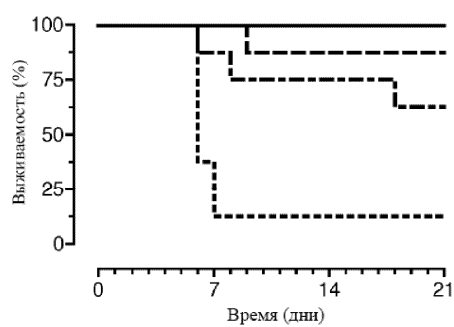
Фиг. 12b



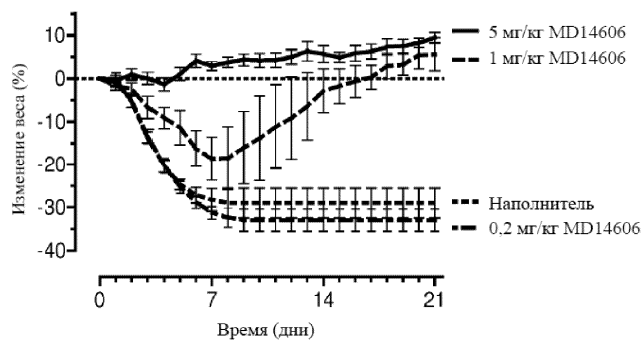
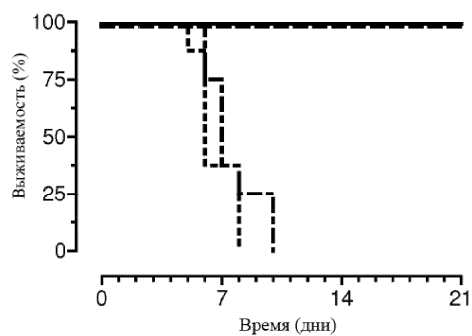
Фиг. 13a



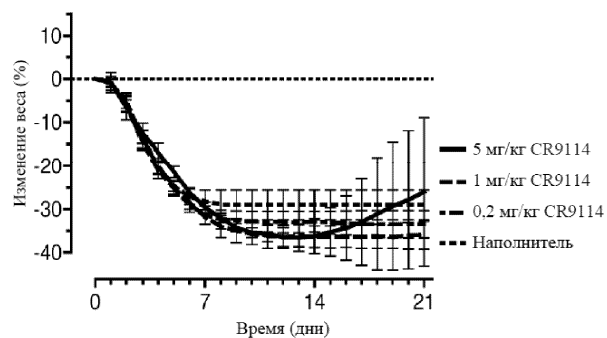
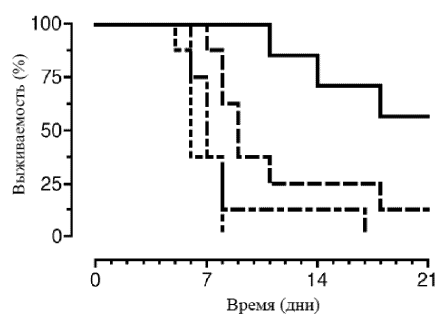
Фиг. 13b



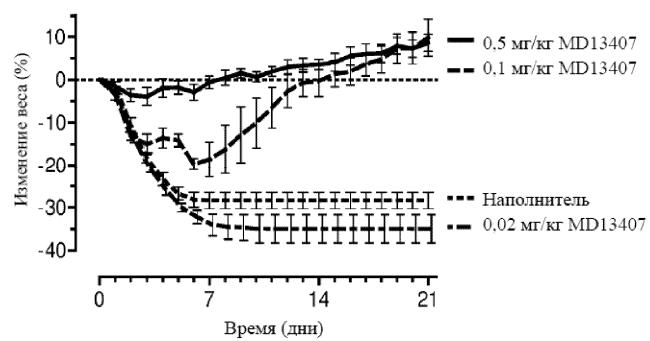
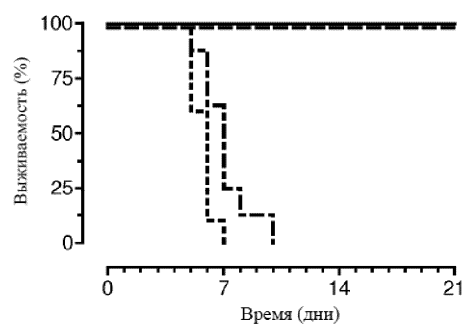
Фиг. 13с



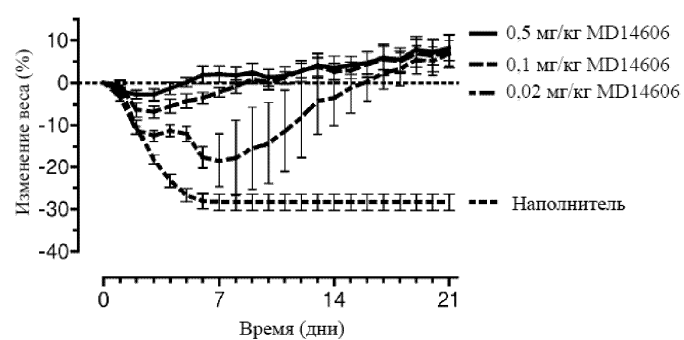
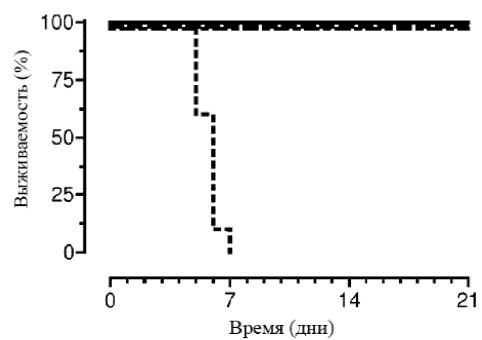
Фиг. 14а



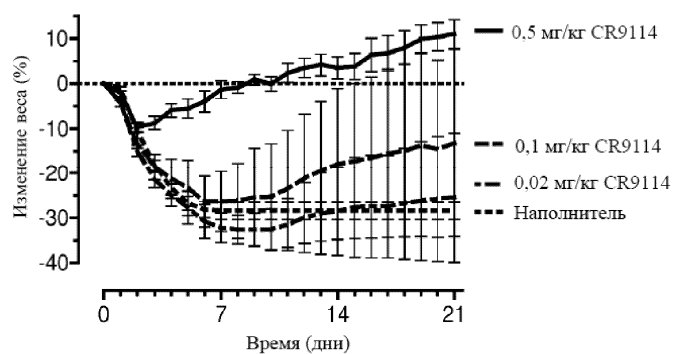
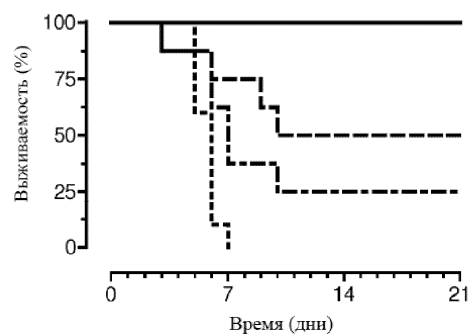
Фиг. 14б



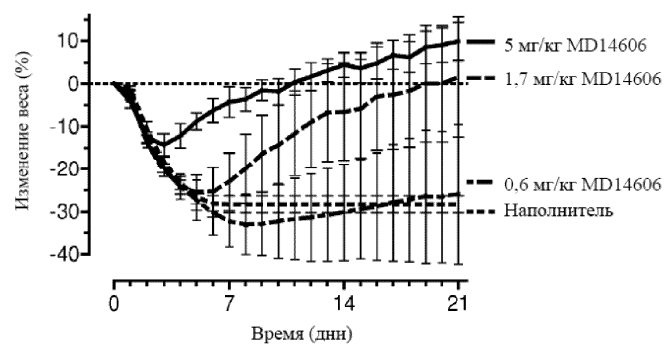
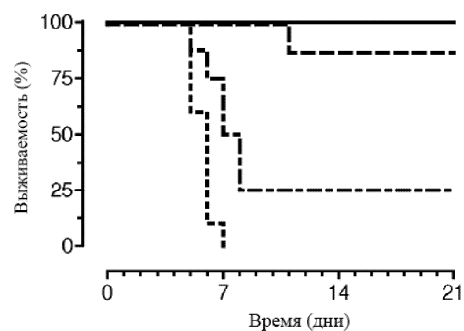
Фиг. 15а



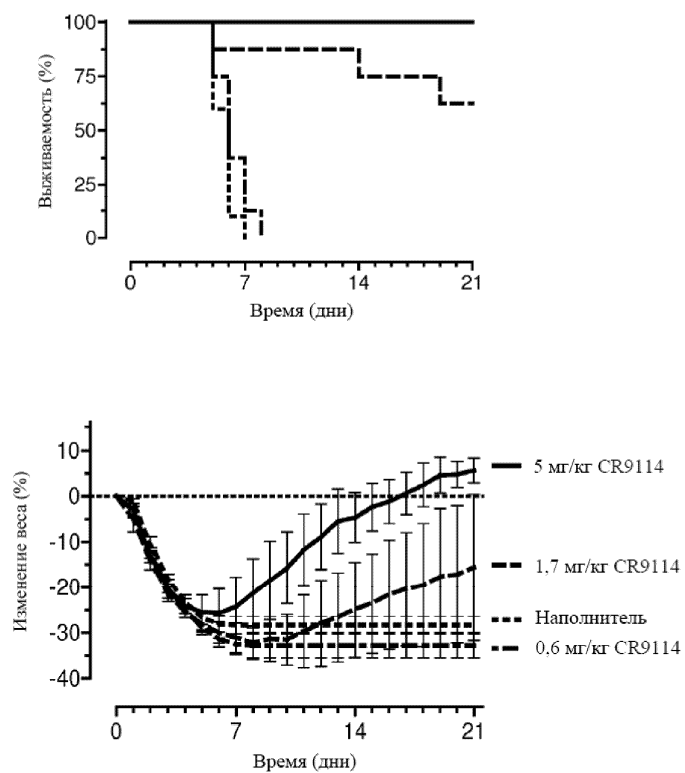
Фиг. 15b



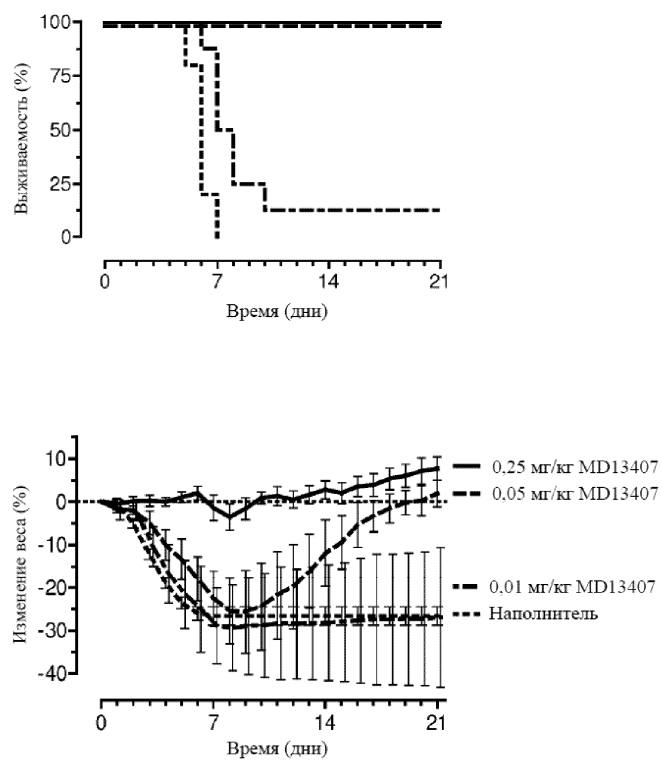
Фиг. 15с



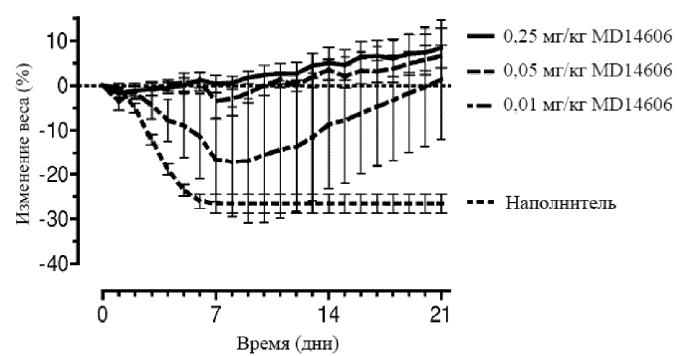
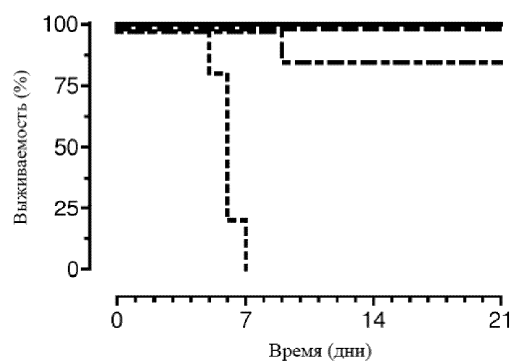
Фиг. 16а



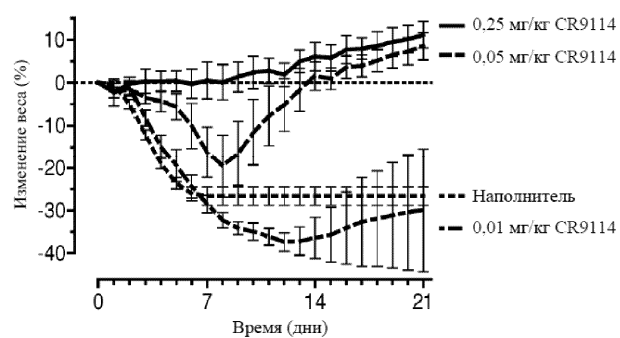
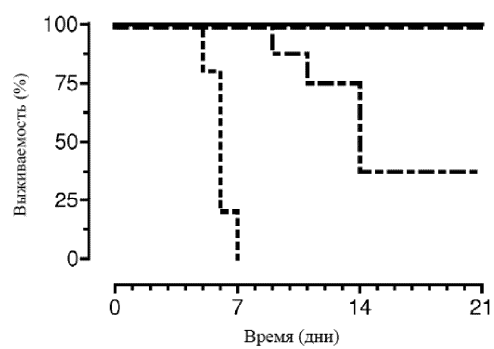
Фиг. 16b



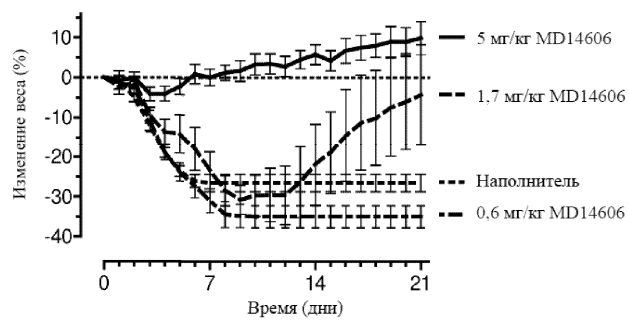
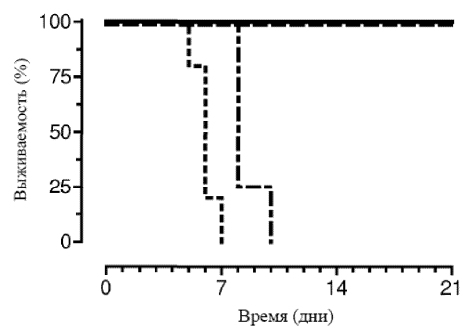
Фиг. 17a



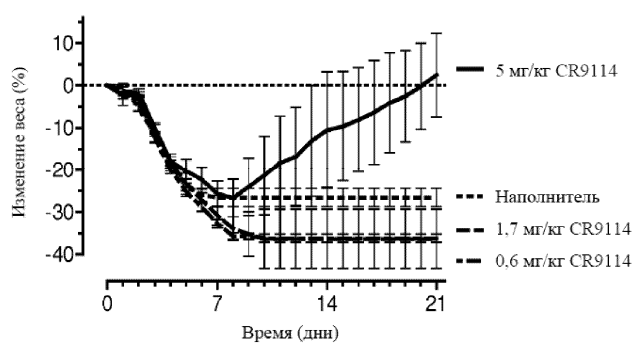
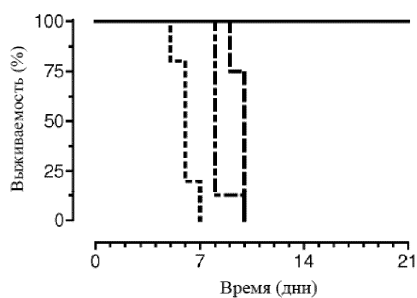
Фиг. 17b



Фиг. 17с



Фиг. 18а



Фиг. 18b



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2