

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039682**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.28

(21) Номер заявки
201792576

(22) Дата подачи заявки
2013.03.14

(51) Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ RSV, MPV И PVM, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/613,197; 61/655,310**

(32) **2012.03.20; 2012.06.04**

(33) **US**

(43) **2018.08.31**

(62) **201491724; 2013.03.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХУМАБС БИОМЕД СА (CH)

(72) Изобретатель:
Корти Давиде (CH)

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Кузнецова Т.В., Соколов Р.А. (RU)**

(56) WO-A2-2010149743
US-A1-20070134255
US-A1-20040096451
MARGARITA MAGRO et al.: Neutralizing
antibodies against the preactive form of respiratory
syncytial virus fusion protein offer unique possibilities
for clinical intervention. PNAS, February 21, 2012,
vol. 109, No. 8, pp.3089-3094
EA-B1-006879

(57) Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые нейтрализуют инфекцию RSV, MPV и PVM. Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, экспрессионному вектору, содержащему ее, клетке и фармацевтической композиции для производства лекарственного средства, включающей один из вышеперечисленных компонентов или два антитела. Кроме того, изобретение относится к применению антител, фрагментов антител и молекул нуклеиновой кислоты в диагностике, лечении или аттенуировании инфекции RSV или MPV и смешанной инфекции RSV и MPV. А также изобретение включает способ аттенуирования RSV и MPV инфекции или снижения риска развития инфекции.

B1**039682****039682****B1**

Изобретение относится к антителам или его антигенсвязывающим фрагментам, нейтрализующим инфекцию RSV, MPV и PVM, их получение и применение. Таким образом, изобретение можно отнести к выделенному антителу, например моноклональному антителу, антителу человека, моноклональному антителу человека, варианту антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые дают перекрестную реакцию нейтрализации инфекции RSV, MPV, и PVM.

Предшествующий уровень техники

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) и метапневмовирус (MPV) и вирус пневмонии мышей (PVM) представляют собой вирусы инфекции верхних дыхательных путей, принадлежащие к семейству парамиксовирусов, которые поражают общую целевую популяцию и представляют собой основное нарушение здоровья у новорожденных и пациентов с иммунной недостаточностью.

RSV представляет собой основную причину острого заболевания дыхательных путей у детей и взрослых во всем мире. Для 0,5-3,2% детей с инфекцией RSV необходима госпитализация (Thompson W.W. et al., 2003, JAMA: The Journal of the American Medical Association, 289:179-186) и от 5 до 10% детей страдают хронической тяжелой инфекцией, фактор, который, как полагают, провоцирует бронхиальную обструкцию и астматоподобные симптомы позже в детстве. Иммуниет к RSV по-видимому является непродолжительным, таким образом, реинфекции являются частыми (Ogra, 2003, Paediatric Respiratory Reviews 5 Suppl A:S119-126).

MPV человека впервые выделили в 2001 г., и в настоящее время признано, что он является второй основной причиной острого заболевания дыхательных путей у детей и взрослых; оценивают, что он инфицирует более 50% детей в возрасте двух лет и практически всех детей в возрасте пяти лет. MPV является причиной приблизительно от 5 до 15% случаев респираторного заболевания у госпитализированных детей младшего возраста (Alto, 2004, The Journal of the American Board of Family Practice/American Board of Family Practice, 17:466-469; Williams et al., 2004, N. Engl. J. Med., 350:443-450). Инфекция MPV представляет собой значительное бремя заболевания у находящихся в группе риска недоношенных детей, хронического заболевания легких недоношенных детей, застойное заболевание сердца и иммунодефицита (Martino et al., 2005, Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, 11:781-796).

Смешанные инфекции MPV и RSV могут являться общими, учитывая их распространенность и перекрывающиеся зимние эпидемии. Хотя по-прежнему неясно, может ли возникать синергетическая патология между этими двумя вирусами, в частности, у некоторых детей со смешанной инфекцией MPV и RSV наблюдали обострения, приводящие к тяжелому заболеванию дыхательных путей (Greensill, 2003, Emerging Infectious Diseases 9:372).

RSV, который принадлежит к роду *Pneumovirus* подсемейства *Pneumovirinae*, и MPV, который принадлежит к роду *Metapneumovirus* подсемейства *Pneumovirinae*, обладают некоторыми сходствами в своей генетической структуре, несмотря на то, что MPV не содержит неструктурные гены NS1 и NS2, встречающиеся у RSV. Оболочки RSV и MPV содержат три вирусных кодируемых трансмембранных поверхностных гликопротеина: основной белок присоединения G, слитый белок F и малый гидрофобный белок SH. Несмотря на то, что оболочки RSV и MPV содержат белки, которые являются функционально сходными, тем не менее, следует отметить, что, F-белки RSV и MPV обладают только 33% идентичностью аминокислотных последовательностей. Кроме того, антисыворотка, образуемая против RSV или MPV, не дает нейтрализующей перекрестной реакции для обоих вирусов (Wyde et al., 2003, Antiviral Research, 60:51-59), и к настоящему времени не выделили моноклональные антитела, которые способны давать нейтрализующую перекрестную реакцию для обоих RSV и MPV.

F-гликопротеины RSV и MPV контролируют проникновение вируса в результате слияния оболочки вириона и плазматической мембраны клетки-хозяина. В дальнейшем при инфекции F-белок, экспрессируемый на клеточной поверхности, может опосредовать слияние с соседними клетками с образованием синцитиев (Collins et al., 1984 PNAS, 81:7683-7687). В обоих случаях N-конец F-субъединицы, который получают протеолитическим расщеплением, и который содержит гидрофобный фрагмент аминокислот, называемый пептидом слияния, встраивается непосредственно в мембрану-мишень для инициации слияния. После связывания с клеткой-мишенью и последующей активацией метастабильный F-белок до слияния претерпевает серию структурных перестроек, которые приводят к встраиванию пептида слияния в мембрану клетки-мишени с последующим образованием стабильного спирального тяжа, который образуется по мере того, как вирусная и клеточная мембраны сближаются. Такие структурные изменения приводят к образованию стабильного F-белка после слияния.

В настоящее время вакцины против инфекции RSV или MPV не доступны. Было обнаружено, что вакцины с инактивированным формалином RSV и с добавлением алюминия в качестве адъюванта (FI-RSV), тестируемые в 1960 гг., провоцируют у детей развернутое заболевание после естественной инфекции RSV, приводя к сильной лихорадке и тяжелой пневмонии, что приводит к высоким коэффициентам госпитализации и даже некоторым случаям со смертельным исходом (Fulginiti et al., 1969, American Journal of Epidemiology, 89:435-448; Kapikian et al., 1969, American Journal of Epidemiology, 89:405-421; Kim et al., 1969, American Journal of Epidemiology, 89:422-434). Аналогично, для вакцин с инактивированным формалином MPV продемонстрировали иммуноопосредованное развернутое заболевание у молодых

яванских макак (de Swart et al., 2007, Vaccine, 25:8518-8528). Кроме того, не было доказано, что противовирусные терапии, такие как рибавирин, являются эффективными при инфекции RSV или MPV.

Из эпидемиологических исследований, а также из исследований на животных было получено доказательство роли антител в сыворотке в защите против вируса RSV. У детей титры материнских антител коррелируют с устойчивостью к серьезному заболеванию (Glezen et al., 1981, The Journal of Pediatrics, 98:708-715), и у взрослых частота возникновения и тяжесть

поражения нижних дыхательных путей снижается в присутствии высоких уровней нейтрализующих антител против RSV в сыворотке (McIntosh et al., 1978, The Journal of Infectious Diseases, 138:24-32). Для профилактики инфекции RSV у недоношенных новорожденных детей зарегистрировано моноклональное антитело паливизумаб (синагис). Однако паливизумаб не всегда является эффективным для профилактики инфекции RSV и не является терапевтически эффективным. Кроме того, длительная репликация в легких RSV в присутствии паливизумаба у животных сопровождается появлением устойчивых штаммов вируса (Zhao and Sullender, 2005, Journal of Virology, 79:3962-3968). В настоящее время не существует моноклональных антител для лечения или профилактики инфекции MPV.

Отсутствие хорошо работающей модели на животных для наиболее тяжелых форм инфекции RSV обусловлено тем фактом, что RSV и MPV представляют собой патогены Pneumovirus определенного хозяина. Разработка новых лекарственных средств для терапии инфекций RSV и MPV была затруднена отсутствием модели на животных, способной воспроизводить все симптомы и тяжесть заболевания человека. Фактически, RSV и MPV не являются природным патогеном мыши и индуцируют только ограниченную, минимально симптоматическую и быстро прекращающуюся первичную инфекцию в ответ на массивный, нефизиологический инокулят вируса. Вирус пневмонии мышей (PVM) представляет собой природный патоген Pneumovirus грызунов, который принадлежит к тому же семейству, подсемейству и роду (Pneumovirus) RSV человека и крупнорогатого скота. F-белок PVM обладает только 40% идентичностью аминокислот с F-белком RSV человека, но обладает такой же генетической организацией за исключением перекрытия M2-L, которое присутствует в RSV, но отсутствует в PVM. Инфекция природным патогеном PVM мыши воспроизводит многие признаки и симптомы наиболее тяжелых форм RSV, как это проявляется у детей. Инфекция PVM характеризуется быстрой репликацией вируса, сопровождающейся массивным воспалительным ответом, который приводит к дыхательной недостаточности и смерти (Rosemberg and Domachowske, 2008, Immunology Letter, 118:6-12). Таким образом, считают, что инфекция PVM у мышей представляет собой наиболее релевантную модель на животных тяжелых инфекций RSV и MPV людей.

Отсутствие профилактического лечения инфекции MPV и вакцин против инфекций RSV и MPV, а также терапевтической эффективности паливизумаба указывает на потребность новых профилактических и терапевтических средств против таких значимых патогенов человека. Учитывая широкую распространенность и вероятность смешанной инфекции, весьма желательным является наличие одного средства, которое способно обеспечивать профилактику, а также лечение или уменьшение инфекции RSV и MPV, и наличие модели на животных, на которой можно тестировать средство. Таким образом, существует необходимость в перекрестно реагирующих нейтрализующих антителах широкого спектра, которые защищают от широкого спектра парамиксовирусов, например, по меньшей мере RSV и MPV и предпочтительно RSV, MPV и PVM.

Сущность изобретения

В первом варианте осуществления изобретение раскрывает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который нейтрализует инфекцию RSV (респираторно-синцициальный вирус), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит (i) области, определяющие комплементарность (CDR)1, CDR2, и CDR3 тяжелой цепи, представленные в последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; (ii) последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно; (iii) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; (iv) последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно; (v) последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23 соответственно; (vi) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 53 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 54 соответственно; (vii) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 53 соответственно, и последователь-

ности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23 соответственно; или (viii) последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 54 соответственно.

Причем, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связывать F-белок RSV до слияния, но не F-белок после слияния. Или не связываться с F-белком RSV в сайте, который перекрывает антигенный сайт I, антигенный сайт II или антигенный сайт IV.

Они также способны нейтрализовать инфекцию RSV и группы А, и группы В или инфекции RSV и MPV (метапневмовирус, или инфекции RSV, MPV и PVM (вирус пневмонии мышей).

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с каждой из консервативных областей в N-концевом участке F-белка RSV, содержащим любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NOs: 64-69.

Концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необходимая для нейтрализации 50% RSV, составляет 500 нг/мл или меньше.

Другой вариант осуществления изобретения относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему

(i) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

(ii) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

(iii) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50;

(iv) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49 и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14; (v) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50;

(vi) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30;

(vii) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30;

(viii) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60;

(ix) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30; или

(x) переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60.

И антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать (i) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (ii) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (iii) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; (iv) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (v) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; (vi) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; (vii) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; (viii) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокис-

лотную последовательность SEQ ID NO: 59, вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; (ix) вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или (x) вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой антитело человека, моноклональное антитело, моноклональное антитело человека, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

Они могут быть предназначены для лечения или аттенуирования инфекции RSV или MPV или обеих RSV и MPV.

В другом аспекте изобретение содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела по изобретению. Причем, нуклеотидная последовательность может быть по меньшей мере на 75% идентична любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NOs: 7-12, 15, 16, 18, 24, 28, 31, 32, 34, 43-48, 51-52, 55-58 или 61-62.

В еще одном аспекте изобретение содержит экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. Изобретение также содержит клетку, которая экспрессирует антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции для производства лекарственного средства для лечения или аттенуирования RSV или MPV или обеих RSV и MPV инфекций, содержащей антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, клетку, экспрессирующую антитело или фрагмент антитела по изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Изобретение также содержит фармацевтическую композицию для производства лекарственного средства для лечения или аттенуирования RSV или MPV или обеих RSV и MPV инфекций, содержащую первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антитело представляет собой антитело по изобретению, и второе антитело представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который нейтрализует инфекцию RSV или MPV или RSV и MPV, или все три RSV, MPV и PVM.

В объем изобретения входит применение антитела по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент в производстве лекарственного средства для лечения или аттенуирования RSV или MPV или обеих RSV и MPV инфекций или в диагностике RSV или MPV инфекции. А также применение для мониторинга качества анти-RSV или анти-MPV вакцин.

А также применение молекулы нуклеиновой кислоты в производстве лекарственного средства для лечения или аттенуирования RSV или MPV или обеих RSV и MPV инфекций или в диагностике RSV или MPV инфекции.

В другом аспекте изобретение включает способ аттенуирования RSV или MPV инфекции или снижения риска развития инфекции RSV и MPV, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента.

Описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты скрининга моноклональных антител, продуцируемых immortalized EBV B-клетками памяти от 7 доноров (доноры 1-7), на их способность нейтрализовать инфекцию вируса RSV или MPV in vitro.

На фиг. 2 представлены результаты нейтрализации RSV и MPV моноклональными антителами HMB2430, HMB3210, mAb 234 и паливизумабом.

На фиг. 3 представлено связывание F-белка RSV или белка токсина столбняка моноклональными антителами мотавизумаб, mAb 234, HMB2430 и HMB3210, как измеряют ELISA.

На фиг. 4 представлено связывание меченых моноклональных антител с инфицированными RSV клетками Her-2 в присутствии большого избытка указанных немеченых антител.

На фиг. 5 представлено связывание моноклональных антител HMB2430, HMB3210, mAb 234 и мотавизумаба с F-белком RSV из лизатов инфицированных RSV клеток Her-2 в восстановительных или невосстановительных условиях, как измеряют анализом вестерн-блоттинга.

На фиг. 6 представлено связывание моноклональных антител HMB3210 и mAb 234 с F-белком MPV из лизатов инфицированных MPV клеток LLC-MK2 в восстановительных или невосстановительных условиях, как измеряют анализом вестерн-блоттинга.

На фиг. 7 представлены результаты нейтрализации длинного штамма RSV и изолята PZ-MARM6 моноклональными антителами HMB2430, HMB3210, mAb234 и паливизумабом.

На фиг. 8 представлены результаты анализа HMB3210v2 в геле SDS-PAGE в восстановительных условиях после инкубации в присутствии (+) или отсутствия (-) N-гликозидазы PNG-азы F. Черной рамкой выделена минорная фракция легкой цепи HMB3210, которая является гликозилированной.

На фиг. 9 представлены результаты нейтрализации I-PV 03/01-6621 MPV и A2 RSV моноклональ-

ными антителами HMB3210v2 и HMB3210v3.

На фиг. 10 представлены результаты нейтрализации панели штаммов MPV и RSV моноклональными антителами HMB3210v2 и HMB3210v3.

На фиг. 11 представлены результаты нейтрализации I-PV 03/01-6 621 MPV и A2 RSV вариантами моноклональных антител HMB3210 и HMB2430, подвергшихся модификации на уровне генов зародышевого типа.

На фиг. 12 представлены результаты анализа эксклюзионной хроматографии рекомбинантного F-белка RSV после слияния, инкубируемого совместно с HMB3210 или паливизумабом или без них.

На фиг. 13 представлены результаты анализа эксклюзионной хроматографии рекомбинантного F-белка RSV до слияния, инкубируемого совместно с HMB3210 или паливизумабом или без них.

На фиг. 14 представлено связывание HMB3210v3 или паливизумаба (PVZ) с F-белками RSV до слияния и после слияния при измерении поверхностным плазмонным резонансом (SPR).

На фиг. 15 представлена нейтрализация вируса и ингибирование распространения вируса моноклональными антителами человека HMB3210v3 и D25.

На фиг. 16 представлена профилактическая эффективность HMB3210v3 и паливизумаба при инфекции RSV или MPV.

На фиг. 17 представлена терапевтическая эффективность HMB3210 у мышей с недостаточностью STAT1, инфицированных RSV.

На фиг. 18 представлена профилактическая и терапевтическая эффективность HMB3210 у мышей, инфицированных летальной дозой PVM.

На фиг. 19 представлено блокирование повышения титров вируса в легких у мышей, обрабатываемых HMB3210v3 на сутки 3, 4 или 5 после летальной инфекции PVM.

На фиг. 20 представлена профилактическая и терапевтическая эффективность вариантов HMB3210v3, несущих Fc дикого типа или мутацию LALA, у мышей, инфицированных летальной дозой PVM.

На фиг. 21 представлено выравнивание, указывающее на высокую консервативность пептида YLSALR, распознаваемого HMB3210 в последовательностях RSV, BRSV, PVM и MPV по сравнению с вирусом парагриппа 5 (PIV5).

На фиг. 22 представлены модель F-белка RSV до слияния, демонстрирующая расположение пептида YLSALR и ближайшего участка паливизумаба (PVZ), и ленточные диаграммы, указывающие на перегруппировку участков PVZ и HMB3210v3 F-белка RSV в конформации до и после слияния.

На фиг. 23 продемонстрирована высокая степень консервативности корового эпитопа HMB3210 в штаммах 364 RSV, 162 MPV, 8 BRSV и 5 PVM.

На фиг. 24A, 24B и 24C представлены последовательности различных вариантов тяжелых и легких цепей HMB3210.

На фиг. 25A и 25B представлены последовательности различных вариантов тяжелых и легких цепей HMB2430.

Подробное описание

Заявка частично основана на открытии и выделении антител, которые дают перекрестную реакцию нейтрализации с RSV и MPV или RSV, MPV и PVM, а также эпитопов, с которыми связываются антитела по изобретению. Такие антитела необходимы для нейтрализации RSV и MPV или RSV, MPV и PVM с помощью одного или нескольких антител. Кроме того, для снижения затрат на получение лекарственных средств. Для лечения инфекции RSV и/или MPV перекрестно нейтрализующие антитела получают в высоких титрах. Кроме того, эпитопы, распознаваемые такими антителами, могут представлять собой часть вакцины, способной индуцировать широкий спектр защиты от RSV и MPV.

Несмотря на то, что антитела нейтрализуют RSV, MPV и PVM, лечение заболевания, разработка вакцин и т.д., может относиться только к RSV и MPV, т.к. эти вирусы представляют собой патогены человека, тогда как PVM представляет собой патоген мыши. В настоящем описании термины "RSV и MPV" и "RSV, MPV и PVM" используют взаимозаменяемо в зависимости от контекста.

Таким образом, в одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу, вариантам антител и их антигенсвязывающим фрагментам, которые нейтрализуют RSV и MPV или RSV, MPV и PVM, причем RSV может представлять собой RSV человека или RSV крупного рогатого скота. Антитела по описанию нейтрализуют RSV человека (hRSV) и RSV крупного рогатого скота (bRSV). Причем MPV может представлять собой MPV человека.

В заявке также раскрывается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который нейтрализует инфекцию RSV группы А и группы В или инфекцию MPV группы А и группы В, или инфекцию RSV группы А и группы В, а также MPV группы А и группы В.

Как указано выше, RSV, MPV и PVM обладают некоторыми сходствами в своей генетической структуре. Аминокислотные последовательности G- и F-белков классифицируют на группы А и В в RSV и MPV; MPV дополнительно разделяют на 4 подгруппы: A1, A2, B1 и B2. PVM не подразделяют на группы или подгруппы. F-белок RSV, MPV или PVM представляет собой трансмембранный поверхностный белок I типа, который содержит отщепляемый с N-конца сигнальный пептид и мембранный якорь

около С-конца. F-белки RSV и MPV синтезируются в виде неактивных предшественников F0, которые собираются в гомотримеры и активируются расщеплением. F-белок образован тремя доменами (DI-DIII), пептидом слияния (FP) и тремя областями, образованными семью повторами (HR-A, -B и -C). F-гликопротеины RSV и MPV регулируют проникновение вируса посредством слияния оболочки вируса и плазматической мембраны клетки-хозяина. В обоих случаях N-конец F-субъединицы, который образуется в результате протеолитического расщепления и содержит пептид слияния, встраивается непосредственно в мембрану-мишень для инициации слияния. После связывания с клеткой-мишенью и последующей активацией метастабильный F-белок до слияния претерпевает серию структурных перестроек, которые приводят к встраиванию пептида слияния в мембрану клетки-мишени с последующим образованием стабильного спирального тяжа, который образует по мере того, как вирусная и клеточная мембраны сближаются. Такие структурные изменения приводят к образованию стабильного F-белка после слияния. На более поздней стадии инфекции F-белок, экспрессируемый на клеточной поверхности инфицированных клеток, может опосредовать слияние с соседними неинфицированными клетками и образование крупных синцитиев.

Эпитопы для паливизумаба и мотавизумаба картировали на антигенном участке II F-белка RSV после слияния (также называемом участком A), образованном остатками 255-275. MAB19 и 101F направлены воздействовать на антигенный участок IV F-белка RSV после слияния (также называемом участком C) RSV, образованный остатками 422-438. MAB19 тестировали в клиническом испытании, но не удалось продемонстрировать значительную эффективность (Johnson et al., 1999, *The Journal of Infectious Diseases*, 180:35-40; Meissner et al., 1999, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:1183-1188).

Для того чтобы быть эффективными, антитела должны распознавать F-белок до слияния, конформация которого является подходящей для блокирования проникновения вируса, и предпочтительно не допускать распознавания содержащегося в избытке F-белка после слияния, который может действовать как ловушка, таким образом, расходуя антитело и снижая его эффективность. До настоящего времени не были выделены антитела, распознающие F-белок RSV до слияния, но не распознающие F-белок RSV после слияния.

Согласно заявке выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с F-белком RSV до слияния и не связывается с F-белком RSV после слияния. В другом варианте выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с F-белком RSV и MPV до слияния и не F-белком RSV и MPV после слияния. А также специфически связываются с F-белком RSV, MPV и PVM до слияния, но не связываются с F-белком RSV, MPV и PVM после слияния.

В заявке раскрыты антитела, которые связываются с F-белком RSV, MPV и PVM. Несмотря на то, что существует только приблизительно 33 и 40% идентичность аминокислотных последовательностей между F-белками RSV и MPV или RSV и PVM соответственно, антитела согласно заявке распознают общий эпитоп, презентруемый на F-белках RSV, MPV и PVM. Этот эпитоп отличается от всех эпитопов, распознаваемых известными в настоящее время антителами, такими как паливизумаб, мотавизумаб, mAb 101F и т.д. Антитела согласно заявке, например, не связываются с антигенным участком II (распознаваемым мотавизумабом и паливизумабом), ни с антигенным участком IV (распознаваемым mAb 101F), ни с антигенным участком I (связывающимся mAb 131-2A). Эпитопы на F-белке RSV, распознаваемые антителами, согласно заявке, также отличаются от эпитопов, распознаваемых mAb D25, антителом специфичным только к RSV. Кроме того, эпитопы на F-белке MPV, распознаваемые антителами, описанными в заявке, отличаются от эпитопов, распознаваемых mAb 234 (которое распознает эпитоп на F-белке MPV, который соответствует антигенному участку II на F-белке RSV). В основном антитела согласно заявке распознают конформационный эпитоп. В одном из вариантов конформационный эпитоп презентруется только в невосстановительных условиях.

Кроме того, конформационный эпитоп может содержать дисульфидные связи между аминокислотными остатками в F-белке.

Как продемонстрировано в настоящем описании, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, согласно заявке, специфически связываются с несколькими различными штаммами RSV и MPV и нейтрализуют RSV и MPV. Кроме того, они специфически связываются и перекрестно нейтрализуют RSV группы A и группы B, а также MPV группы A и группы B, включая все соответствующие подгруппы MPV (например, A1, A2, B1 и B2).

Антитело и антигенсвязывающий фрагмент, согласно заявке, обладают высокой нейтрализующей активностью. Их концентрация, необходимая для нейтрализации 50% RSV, MPV и PVM, может составлять, например, приблизительно 500 нг/мл или менее. Для 50% нейтрализации RSV, MPV и PVM, может составлять приблизительно 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60 или приблизительно 50 нг/мл или менее. Это означает, что для 50% нейтрализации RSV, MPV и PVM необходимы только низкие концентрации антитела. Специфичность и активность можно измерять стандартными анализами, как известно специалисту в данной области техники.

Антитела согласно заявке могут представлять собой антитела человека, моноклональные антитела, моноклональные антитела человека, рекомбинантные антитела или очищенные антитела. В ней раскры-

ты также фрагменты антител, в частности фрагменты, которые сохраняют антигенсвязывающую активность антител. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, одноцепочечные антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Хотя описание, в некоторых местах может явно ссылаться на антигенсвязывающий фрагмент(ы), фрагмент(ы) антител, вариант(ы) и/или производное(ые) антител, следует понимать, что термин "антитело" или "антитело по изобретению" включает все категории антител, а именно антигенсвязывающий фрагмент(ы), фрагмент(ы) антител, вариант(ы) и производное(ые) антител.

Заявителем были определены последовательности тяжелых цепей и легких цепей нескольких антител по изобретению, где каждая последовательность содержит три CDR на тяжелой цепи и три CDR на легкой цепи. Положение аминокислот CDR определяют в соответствии с системой нумерации IMGT. Последовательности CDR, тяжелых цепей, легких цепей, а также последовательности молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей CDR, тяжелые цепи, легкие цепи антител по изобретению описаны в списке последовательностей. CDR тяжелых цепей антитела обозначают как CDRH1 (или HCDR1), CDRH2 (или HCDR2) и CDRH3 (или HCDR3), соответственно. Аналогично, CDR легких цепей антитела обозначают как CDRL1 (или LCDR1), CDRL2 (или LCDR2) и CDRL3 (или LCDR3), соответственно. В табл. 1 приведены номера SEQ ID для аминокислотных последовательностей шести CDR тяжелых и легких цепей, соответственно, антител по изобретению.

Таблица 1. Номера SEQ ID для полипептидов CDR антител, которые нейтрализуют RSV, MPV и PVM

	SEQ ID NO. для полипептидов CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
вариант 1 3210	1	2	3	4	5	6
вариант 2 3210	1	2	3	4	5	6
вариант 3 3210	1	2	3	4	5	35
вариант 4 3210	1	39	40	4	41	42
вариант 5 3210	1	39	40	4	5	6
вариант 6 3210	1	2	3	4	41	42
вариант 1 2430	19	20	21	4	22	23
вариант 2 2430	19	20	21	4	22	23
вариант 3 2430	1	39	53	4	41	54
вариант 4 2430	1	39	53	4	22	23
вариант 5 2430	19	20	21	4	41	54

Антитело или фрагмент антитела может содержать по меньшей мере одну CDR с последовательностью, которая обладает по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой одной SEQ ID NO: 1-6, 19-23, 35, 39-42 или 53-54. CDR вариантов антитела 3210 и антитела 2430 представлены на фиг. 24 и 25 соответственно (CDR выделены полужирным шрифтом).

Также антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую одну или более (т.е. одну, две или все три) CDR тяжелой цепи из варианта 1 3210, варианта 2 3210, варианта 3 3210, варианта 4 3210, варианта 5 3210, бварианта 2410, варианта 1 2430, варианта 2 2430, варианта 3 2430, варианта 4 или варианта 5 2430.

В еще одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 19; CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 39 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 53. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, как предоставлено в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность (i) SEQ ID NO: 1 для CDRH1, SEQ ID NO: 2 для CDRH2 и SEQ ID NO: 3 для CDRH3, (ii) SEQ ID NO: 1 для CDRH1, SEQ ID NO: 39 для CDRH2 и SEQ ID NO: 40 для CDRH3, (iii) SEQ ID NO: 19 для CDRH1, SEQ ID NO: 20 для CDRH2 и SEQ ID NO: 21 для CDRH3 или (iv) SEQ ID NO: 1 для CDRH1, SEQ ID NO: 39 для CDRH2 и SEQ ID NO: 53 для CDRH3.

Также предоставлено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, содержащую одну или более (т.е. одну, две или все три) CDR легкой цепи из варианта 1 3210, варианта 2 3210, варианта 3 3210, варианта 4 3210, варианта 5 3210, варианта 6 2430, варианта 1 2430, варианта 2 2430, варианта 3 2430, варианта 4 2430 или варианта 5 2430. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 41 и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 54. Антитело или фрагмент антитела, как предоставлено в настоящем

описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность (i) SEQ ID NO: 4 для CDRL1, SEQ ID NO: 5 для CDRL2 и SEQ ID NO: 6 для CDRL3; (ii) SEQ ID NO: 4 для CDRL1, SEQ ID NO: 5 для CDRL2 и SEQ ID NO: 35 для CDRL3; (iii) SEQ ID NO: 4 для CDRL1, SEQ ID NO: 41 для CDRL2 и SEQ ID NO: 42 для CDRL3; (iv) SEQ ID NO: 4 для CDRL1, SEQ ID NO: 22 для CDRL2 и SEQ ID NO: 23 для CDRL3 или (v) SEQ ID NO: 4 для CDRL1, SEQ ID NO: 41 для CDRL2 и SEQ ID NO: 54 для CDRL3.

А также антитело согласно заявке, или его антигенсвязывающий фрагмент, могут содержать все CDR варианта 1 антитела 3210, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM. Антитело согласно заявке или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 2 антитела 3210, перечисленные в табл. 1, и нейтрализует инфекцию RSV, MPV и PVM. В другом варианте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 3 антитела 3210, перечисленные в табл. 1, и нейтрализует инфекцию RSV, MPV и PVM. Кроме того, антитело, согласно заявке или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 4 антитела 3210, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM. И антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 5 антитела 3210, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM. Также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 6 антитела 3210, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM.

Антитело, согласно заявке, или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 1 антитела 2430, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 2 антитела 2430, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM. Также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 3 антитела 2430, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 4 антитела 2430, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM. И антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать все CDR варианта 5 антитела 2430, перечисленные в табл. 1, и нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM.

Номера SEQ ID для аминокислотной последовательности для вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) антител по изобретению, а также номера SEQ ID для последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих их, перечислены в табл. 2.

Таблица 2. Номера SEQ ID для остатков аминокислот и нуклеиновой кислоты V_H и V_L для антител, которые нейтрализуют RSV, MPV и PVM

			SEQ ID NO. для V _H и V _L остатков аминокислот и нуклеиновой кислоты			
	цепь V _H	цепь V _L	Аминокислота V _H	Аминокислота V _L	нуклеиновая кислота V _H	нуклеиновая кислота V _L
вариант 1 3210	VH.1	VL	13	14	15	16
вариант 2 3210	VH.2	VL	17	14	18	16
вариант 3 3210	VH.2	VL.3	17	37	18	38
вариант 4 3210	VH.3	VL.4	49	50	51	52
вариант 5 3210	VH.3	VL	49	14	51	16
вариант 6 3210	VH.2	VL.4	17	50	18	52
вариант 1 2430	VH.1	VL	29	30	31	32
вариант 2 2430	VH.2	VL	33	30	34	32
вариант 3 2430	VH.3	VL.2	59	60	61	62
вариант 4 2430	VH.3	VL	59	30	61	32
вариант 5 2430	VH.2	VL.2	33	60	34	62

Антитело или фрагмент антитела согласно заявке могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая является приблизительно на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичной последовательности, описанной в любой SEQ ID NO: 13, 17, 29, 33, 49 или 59. Также они могут содержать вариабельную область легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, 30, 37, 50 или 60. Кроме того, антитело или фрагмент антитела могут содержать вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательностям, приведенным на фиг. 24 и 25.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM и содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область

легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может нейтрализовать инфекцию RSV, MPV и PVM и содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

Примеры антител включают, но не ограничиваются ими, вариант 1 HMB3210, вариант 2 HMB3210, вариант 3 HMB3210, вариант 4, HMB3210 вариант 5 HMB3210, вариант 6 HMB3210, вариант 1 HMB2430, вариант 2 HMB2430, вариант 3 HMB2430, вариант 4 HMB2430 или вариант 5 HMB2430.

Антитело или его фрагмент могут связываться с таким же эпитопом, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, или антитело, которое конкурирует за связывание с антителом или антигенсвязывающим фрагментом.

Как можно видеть из табл. 1 и 2, CDR, тяжелые цепи и легкие цепи раскрытых антител можно взаимно заменять, получая новые антитела, которые сохраняют их связывающие и нейтрализующие способности. Таким образом, антитела могут включать антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию CDR, приведенных в табл. 1, или тяжелых и легких цепей, приведенных в табл. 2.

Антитела также могут содержать гибридные молекулы антител, которые содержат одну или более CDR из антитела по изобретению и одну или более CDR из другого антитела в том же эпитопе. Такие гибридные антитела могут содержать три CDR из антитела по изобретению и три CDR из другого антитела для того же эпитопа. Иллюстративные гибридные антитела могут содержать (i) три CDR легкой цепи из антитела по изобретению и три CDR тяжелой цепи из другого антитела для того же эпитопа или (ii) три CDR тяжелой цепи из антитела, согласно заявке, и три CDR легкой цепи из другого антитела.

Варианты последовательностей, перечисленные в заявке, включают природные варианты, образуемые в результате соматической мутации *in vivo* во время иммунного ответа, или *in vitro* при культивировании клонов immortalized B-клеток. Альтернативно, варианты могут возникать вследствие вырожденности генетического кода или могут образовываться в результате ошибок при транскрипции или трансляции.

Дополнительные варианты последовательностей антител, обладающих улучшенной аффинностью и/или активностью, можно получать известными в данной области техники способами. Например, замены аминокислот можно использовать для получения антител с дополнительно улучшенной аффинностью. Альтернативно, для улучшения эффективности трансляции в экспрессирующих системах для продукции антитела можно использовать оптимизацию кода нуклеотидной последовательности. Кроме того, полинуклеотиды, содержащие последовательность, оптимизированную в отношении специфичности или нейтрализующей активности антитела способом направленного мутагенеза в отношении любых последовательностей нуклеиновой кислоты, также раскрыты в заявке.

Вариант последовательности антител может обладать 70% или более (т.е. 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% или более) идентичностью аминокислотных последовательностей с последовательностями, перечисленными в заявке. В некоторых вариантах осуществления такую идентичность последовательности рассчитывают относительно полной длины эталонной последовательности (т.е. последовательности, перечисленной в заявке). В некоторых дополнительных вариантах осуществления процентная идентичность, как указано в настоящем описании, является такой, как определяют с использованием BLAST версии 2.1.3 с использованием параметров по умолчанию, установленных NCBI (the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [матрица Blosum 62, штраф за создание пропуска=11 и штраф за продление пропуска=1].

Изобретение также включает последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие часть или все легкие и тяжелые цепи и CDR антител по настоящему изобретению. В настоящем описании раскрыты последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие часть или все легкие и тяжелые цепи и CDR антител по изобретению. В табл. 2 приведены номера SEQ ID для последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих переменные области тяжелых цепей и легких цепей некоторых примерных антител по изобретению. В табл. 3 приведены номера SEQ ID для последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих CDR антител. Вследствие избыточности генетического кода существуют варианты этих последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют одни и те же аминокислотные последова-

тельности.

Таблица 3

Номера SEQ ID для полинуклеотидов CDR антител, которые нейтрализуют RSV, MPV и PVM

	SEQ ID NO. для полинуклеотидов CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
вариант 1 3210	7	8	9	10	11	12
вариант 2 3210	7	8	9	10	11	12
вариант 3 3210	7	8	9	10	11	36
вариант 4 3210	43	44	45	46	47	48
вариант 5 3210	43	44	45	10	11	12
вариант 6 3210	7	8	9	46	47	48
вариант 1 2430	24	25	26	10	27	28
вариант 2 2430	24	25	26	10	27	28
вариант 3 2430	55	44	56	57	47	58
вариант 4 2430	55	44	56	10	27	28
вариант 5 2430	24	25	26	57	47	58

Последовательности нуклеиновой кислоты могут включать последовательности нуклеиновой кислоты, обладающие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью с нуклеиновой кислотой, кодирующей тяжелую или легкую цепь антитела по изобретению. А также последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CDR тяжелой или легкой цепи антитела по изобретению. Например, последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной последовательностям нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7-12, 15, 16, 18, 24-28, 31-32, 34, 36, 38, 43-48, 51-52, 55-58 или 61-62.

В еще одном варианте последовательности нуклеиновой кислоты могут включать последовательности нуклеиновой кислоты, обладающие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с нуклеиновой кислотой, кодирующей тяжелую или легкую цепь антитела по изобретению, как представлено на фиг. 24 и 25.

Кроме того, в заявке описаны экспрессирующие векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению. Клетки, трансформированные такими векторами, также входят в объем изобретения. Примеры таких клеток могут включать эукариотические клетки, например, дрожжевые клетки, животные клетки или растительные клетки. А также клетки могут представлять собой клетки млекопитающего, например человека, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, миеломные или гибридомные клетки.

В заявке раскрыты моноклональные антитела, которые связываются с эпитопом, способным связываться с антителами или антигенсвязывающими фрагментами по изобретению.

Моноклональные и рекомбинантные антитела являются особенно пригодными для идентификации и очистки отдельных полипептидов или других антигенов, против которых они направлены. Антитела, согласно заявке, могут обладать дополнительным полезным свойством, которое заключается в том, что их можно применять в качестве реагентов в иммунологических анализах, радиоиммунологических анализах (RIA) или твердофазных иммуноферментных анализах (ELISA). В таких применениях антитела можно метить аналитически детектируемым реагентом, таким как радиоактивный изотоп, флуоресцентная молекула или фермент. Антитела также можно использовать для молекулярной идентификации и характеристики (картирование эпитопов) антигенов.

Антитела согласно заявке можно связывать с лекарственным средством для доставки в участок лечения или связывать с детектируемой меткой для облегчения визуализации участка, содержащего представляющие интерес клетки, клетки, инфицированные RSV или MPV или RSV и MPV. Способы связывания антител с лекарственными средствами и детектируемыми метками хорошо известны в данной области, так же как и способы визуализации с использованием детектируемых меток. Меченые антитела можно применять в широком спектре анализов, применяя широких спектр меток. Детектирование образования комплекса антитело-антиген между антителом по изобретению и представляющим интерес эпитопом (эпитоп или RSV или MPV или тот и другой) можно облегчать, путем присоединения детектируемого вещества к антителу. Подходящие способы детектирования включают использование меток, таких как радионуклиды, ферменты, коферменты, флуоресцирующие вещества, хемилюминесцирующие веще-

ства, хромогены, субстраты или кофакторы ферментов, ингибиторы ферментов, комплексы простетической группы, свободные радикалы, частицы, красители и т.п. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетической группы включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного вещества представляет собой люминол; примеры биолюминесцентных веществ включают люциферазу, люциферин и экворин, и примеры подходящего радиоактивного вещества включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H . Такие меченые реагенты можно использовать в ряде хорошо известных анализов, таких как радиоиммунологические анализы, иммуоферментные анализы, например, ELISA, флуоресцентные иммунологические анализы и т.п. (См. например, US 3766162, US 3791932, US 3817837 и US 4233402).

Антитело по изобретению можно конъюгировать с терапевтической молекулой, такой как цитотоксин, терапевтическое средство или радиоактивный ион металла или радиоактивный изотоп. Примеры радиоактивных изотопов включают, но не ограничиваются ими, ^{131}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{211}At , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{109}Pd , ^{99}Tc , ^{111}In и т.п. Такие конъюгаты антител можно использовать для модификации данного биологического ответа; подразумевают, что молекула лекарственного средства не ограничена классическими химическими терапевтическими средствами. Например, молекула лекарственного средства может представлять собой белок или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин.

Способы конъюгации такой терапевтической молекулы с антителами хорошо известны. См., например, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom et al., (1987) "Antibodies for Drug Delivery" в *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" в *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al., pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316 и Thorpe et al., (1982) *Immunol. Rev.*, 62: 119-158.

Альтернативно, антитело или его фрагмент антитела можно конъюгировать со вторым антителом или его фрагментом антитела с получением гетероконъюгата антитела, как описано в US 4676980. Кроме того, можно использовать линкеры между метками и антителами по изобретению (например, US 4831175). Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно непосредственно метить радиоактивным йодом, индием, иттрием или другой известной в данной области радиоактивной частицей (например, US 5595721). Лечение может состоять из комбинации лечения конъюгированными и неконъюгированными антителами, вводимыми одновременно или последовательно (например, WO00/52031, WO 00/52473).

Антитела по изобретению также можно прикреплять к твердой подложке. Кроме того, антитела по изобретению или их функциональные фрагменты антител можно химически модифицировать посредством ковалентной конъюгации с полимером, например, для увеличения их времени полужизни в кровотоке. Примеры полимеров и способов их прикрепления к пептидам представлены в US 4766106, US 4179337, US 4495285 и US 4609546. В некоторых вариантах осуществления полимеры можно выбирать из полиоксиэтилированных полиолов и полиэтиленгликоля (PEG). PEG является растворимым в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу: $\text{R}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n\text{O}-\text{R}$, где R может представлять собой водород или защитную группу, такую как алкил или алканольную группу. Защитная группа может содержать от 1 до 8 атомов углерода, например представлять собой метил. Символ n представляет собой положительное целое число и от 1 до 1000 или от 2 до 500. Средняя молекулярная масса PEG составляет от 1000 до 40000, согласно заявке. В дополнительном варианте молекулярная масса PEG составляет от 2000 до 20000 или от 3000 до 12000. В одном из вариантов PEG может содержать по меньшей мере одну гидроксигруппу, в другом варианте – концевую гидроксигруппу и концевую гидроксигруппу, которая активируется для взаимодействия со свободной аминогруппой на ингибиторе. Однако следует понимать, что тип и количество реакционноспособных групп можно изменять, чтобы получать ковалентно конъюгированное PEG/антитело.

Пригодными также являются водорастворимые полиоксиэтилированные полиолы. Они включают полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу, полиоксиэтилированный глицерин (POG) и т.п. В одном из вариантов используют POG, без связи с какой-либо теорией, вследствие того, что глицериновый остов полиоксиэтилированного глицерина является аналогичным природному остову, встречающемуся, например, в моно-, ди-, триглицеридах животных и людей, поэтому такая разветвленная цепь необязательно распознается в организме как чужеродный агент. В некоторых вариантах POG может иметь молекулярную массу, в таком же диапазоне, что и PEG. Другая система доставки лекарственного средства, которую можно использовать для увеличения времени полужизни в кровообращении

представляет собой липосому. Способы получения систем доставки на основе липосом известны специалисту в данной области техники. Другие системы доставки лекарственного средства также известны в данной области техники и описаны, например, в публикациях Poznansky et al., (1980) и Poznansky (1984).

Антитела, согласно заявке, могут быть в очищенной форме. Как правило, антитело содержится в композиции, которая по существу не содержит другие полипептиды, например, где другие полипептиды составляют менее 90% (по массе), как правило, менее 60% и более, как правило, менее 50% композиции.

Антитела согласно заявке могут быть иммуногенными у не являющегося человеком (или гетерологичного) хозяина, например, у мышей. В частности, антитела могут содержать идиотоп, который является иммуногенным у хозяина (не человека). Антитела, согласно заявке, для применения у человека включают антитела, которые невозможно легко выделять у хозяев, таких как мыши, козы, кролики, крысы, не являющихся приматами млекопитающих и т.д., и, как правило, невозможно получать гуманизацией или от ксеномышей.

Антитела согласно заявке могут быть любого изотипа (например, IgA, IgG, IgM, т.е. с тяжелой цепью α , γ или μ), но, как правило, представляют собой IgG. В изотипе IgG антитела могут представлять собой подкласс IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Антитела согласно заявке могут содержать легкую цепь κ или λ .

Получение антител

Антитела по изобретению можно получать любым известным в данной области техники способом. Например, основная методология получения моноклональных антител с использованием гибридомной технологии хорошо известна (Kohler G. and Milstein C., 1975; Kozbar et al., 1983). В одном из вариантов используют альтернативный способ иммортализации EBV, описанный в WO2004/076677.

Способом, описанным в WO 2004/076677, В-клетки, продуцирующие антитело, можно трансформировать EBV и поликлональным активатором В-клеток. Для дополнительного повышения эффективности во время этапа трансформации можно добавлять дополнительные стимуляторы роста и дифференцировки клеток. Такие стимуляторы могут представлять собой цитокины, такие как IL-2 и IL-15. В одном из аспектов IL-2 добавляют во время этапа иммортализации для дополнительного улучшения эффективности иммортализации, но его использование не является обязательным. Иммортализованные В-клетки, получаемые такими способами, можно затем культивировать известными в данной области способами и выделять из них антитела.

Способом, описанным в WO 2010/046775, можно культивировать плазматические клетки в ограниченных количествах или в виде отдельных плазматических клеток на культуральных планшетах с микролунами. Антитела можно выделять из культуры плазматических клеток. Кроме того, из культуры плазматических клеток можно экстрагировать РНК и можно проводить ПЦР известными в данной области способами. Области VH и VL антител можно амплифицировать ПЦР с обратной транскрипцией, секвенировать и клонировать в экспрессирующий вектор, который затем трансфицируют в клетки НЕК293Т или другие клетки-хозяева. Клонирование нуклеиновой кислоты в экспрессирующие векторы, трансфекцию клеток-хозяев, культивирование трансфицированных клеток-хозяев и выделение продуцируемого антитела можно проводить любыми способами, известными специалисту в данной области техники.

При желании, антитела можно дополнительно очищать с использованием фильтрации, центрифугирования и различными хроматографическими способами, такими как ВЭЖХ или аффинная хроматография. Способы очистки антител, например моноклональных антител, включая способы получения антител фармацевтической степени чистоты, хорошо известны в данной области техники.

Фрагменты антител по изобретению можно получать из антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин и/или расщеплением дисульфидных связей химическим восстановлением. Кроме того, фрагменты антител можно получать клонированием и экспрессией части последовательностей тяжелых или легких цепи. "Фрагменты" антитела включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv. Одноцепочечные фрагменты Fv (scFv) получают из тяжелых и легких цепей антитела по изобретению. Кроме того, можно получить мономеры и димеры тяжелых или легких цепей, однодоменные антитела с тяжелой цепью, однодоменные антитела с легкой цепью, а также одноцепочечные антитела, например, одноцепочечный Fv, в котором переменные домены тяжелых и легких цепей соединены пептидным линкером.

Фрагменты антител могут обеспечивать моновалентные или поливалентные взаимодействия и могут содержаться в ряде структур, как описано выше. Например, для получения трехвалентного антитела или четырехвалентного можно синтезировать молекулы scFv. Молекулы scFv могут содержать домен Fc-области, приводящие к двухвалентным миниантителам. Кроме того, последовательности согласно заявке могут представлять собой компонент мультиспецифических молекул, в которых последовательности направлены на эпитопы, а другие области молекул связываются с другими мишенями. Иллюстративные молекулы включают, но не ограничиваются ими, биспецифические Fab2, триспецифические Fab3, биспецифические scFv и двухвалентные антитела (Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 9:1126-1136).

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих антитела или фрагменты антител по на-

стоящему изобретению, можно использовать стандартные способы молекулярной биологии. Желаемые последовательности ДНК можно полностью или частично синтезировать с использованием способов синтеза олигонуклеотидов. В качестве подходящих можно использовать способы сайт-специфического мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антител по настоящему изобретению или их фрагменты можно использовать любую подходящую систему клетка-хозяин/вектор. Бактериальные, например, *E. coli*, и другие системы на основе микроорганизмов можно частично использовать для экспрессии фрагментов антител, таких как фрагменты Fab и F(ab')₂ и, в частности, фрагментов Fv и фрагментов одноцепочечных антител, например одноцепочечные Fv.

Экспрессирующие системы на основе эукариотических клеток-хозяев, например млекопитающих, можно использовать для получения более крупных молекул антител, включая полные молекулы антител. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, миеломные или гибридомные клетки.

Настоящая заявка также описывает способ получения молекулы антитела по настоящему изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в условиях подходящих для экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему изобретению, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела может содержать полипептид только тяжелой или легкой цепи, в случае чего для трансфекции клеток-хозяев необходимо использовать только последовательность, кодирующую полипептид тяжелой цепи или легкой цепи. Для получения продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, линию клеток можно трансфицировать двумя векторами, где первый вектор кодирует полипептид легкой цепи, и второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. Кроме того, можно использовать один вектор, где вектор содержит последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

А также, антитела по изобретению можно получать (i) экспрессией нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине и (ii) выделением экспрессируемого продукта антитела. Кроме того, способ может включать (iii) очистку выделенного антитела.

Можно проводить скрининг трансформированных В-клеток и культивируемых плазматических клеток в отношении клеток, продуцирующих антитела желаемой специфичности или функции.

Этап скрининга можно проводить любым иммунологическим анализом, например, ELISA, окрашивая ткани или клетки (включая трансфицированные клетки), анализом нейтрализации или одним из ряда других известных в данной области способов идентификации желаемой специфичности или функции. Анализ можно выбирать на основе простого распознавания одного или более антигенов, или можно выбирать на основе желаемой функции, например для выбора нейтрализующих антител, а не только антигенсвязывающих антител, выбор антител, которые могут изменять характеристики клеток-мишеней, такие как их сигнальные каскады, их форма, их скорость роста, их способность оказывать влияние на другие клетки, их реакция в ответ на влияние других клеток или других реагентов, или изменение условий, их статус дифференцировки и т.д.

Затем можно получать индивидуальные клоны трансформированных В-клеток из культуры положительных трансформированных В-клеток. Этап клонирования для выделения индивидуальных клонов из смеси положительных клеток можно проводить с использованием лимитирующего разведения, микроманипуляции, выделения отдельных клеток в результате сортировки клеток или другим известным в данной области способом.

Нуклеиновую кислоту из культивируемых плазматических клеток можно выделять, клонировать и экспрессировать в клетках HEK293T или других известных клетках-хозяевах известными в данной области техники способами.

Клоны иммортализованных В-клеток или трансфицированные клетки-хозяева можно использовать различными способами например, в качестве источника моноклональных антител, в качестве источника нуклеиновой кислоты (ДНК или мРНК), кодирующей представляющее интерес моноклональное антитело, для исследования и т.д.

В заявке описана композиция, содержащая иммортализованные В-клетки памяти или трансфицированные клетки-хозяева, продуцирующие антитела, которые нейтрализуют инфекцию RSV, MPV и PVM.

Клон иммортализованных В-клеток или культивируемые плазматические клетки также можно использовать в качестве источника нуклеиновой кислоты для клонирования генов антитела для последующей рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантная экспрессия является наиболее распространенной для фармацевтических целей, чем экспрессия В-клетками или гибридами, например, по причинам стабильности, воспроизводимости, простоты культивирования и т.д.

Таким образом, в заявке раскрыт способ получения рекомбинантной клетки, включающему этапы: (i) получения одной или более нуклеиновых кислот (например, мРНК тяжелой и/или легкой цепи), кодирующих представляющее интерес антитело, из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток; (ii) встраивания нуклеиновой кислоты в экспрессирующий вектор и (iii) трансфекции вектора в клетку-хозяина для обеспечения экспрессии представляющего интерес антитела в такой клетке-хозяине.

Аналогично, в заявке раскрыт способ получения рекомбинантной клетки, включающий этапы: (i) секвенирование нуклеиновой кислоты(т), кодирующей представляющее интерес антитело, из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток и (ii) использование информации секвенирования из этапа (i) для получения нуклеиновой кислоты(т) для введения в клетку-хозяина для обеспечения экспрессии представляющего интерес антитела в такой клетке-хозяине. Нуклеиновую кислоту можно, но не обязательно, подвергать обработке между этапами (i) и (ii) для введения участков рестрикции, для изменения частоты использования кодона и/или для оптимизации регуляторных последовательностей транскрипции и/или трансляции.

Заявку также можно отнести к способу получения трансфицированной клетки-хозяина, включающему этап трансфекции клетки-хозяина одной или более нуклеиновыми кислотами, которые кодируют представляющее интерес антитело, где нуклеиновые кислоты представляют собой нуклеиновые кислоты, которые получали из клона иммортализованных В-клеток или культивируемой плазматической клетки. Таким образом, способы предварительного получения нуклеиновой кислоты(т), а затем использования ее для трансфекции клетки-хозяина можно проводить в различные моменты времени, их могут проводить различные люди в разных местах (например, в разных странах).

Такие рекомбинантные клетки затем можно использовать для экспрессии и культивирования. Они являются особенно пригодными для экспрессии антител для крупномасштабного фармацевтического производства. Их также можно использовать в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции. Можно использовать любой подходящий способ культивирования, включая, но, не ограничиваясь ими, статическую культуру, культивирование во вращающихся флаконах, асцитную жидкость, картридж биореактора типа полого волокна, модульный миниферментер, смесительный бак, культивирование на микроносителе, орошение керамического стержня и т.д.

Способы получения и секвенирования генов иммуноглобулинов из В-клеток или плазматических клеток хорошо известны в данной области техники (например, см. Chapter 4 of Kuby Immunology, 4th edition, 2000).

Трансфицированная клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, включая дрожжевые и животные клетки, в частности клетки млекопитающих (например, клетки CHO, клетки NS0, клетки человека, такие как клетки PER.C6 или НКВ-11, миеломные клетки), а также растительные клетки.

Предпочтительные экспрессирующие хозяева могут гликозилировать антитело, в частности углеводными структурами, которые сами по себе не являются иммуногенными у людей. В одном из вариантов трансфицированная клетка-хозяин может расти в среде, не содержащей сыворотку. В другом варианте трансфицированная клетка-хозяин может расти в культуре без присутствия получаемых из животных продуктов. Трансфицированную клетку-хозяина также можно культивировать с получением линии клеток.

Заявка раскрывает способ получения одной или более молекул нуклеиновой кислоты (например, генов тяжелых и легких цепей), которые кодируют представляющее интерес антитело, включающий этапы: (i) получение клона иммортализованных В-клеток или культивирования плазматических клеток по изобретению; (ii) получение из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющее интерес антитело. Кроме того, способ получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющее интерес антитело, может включать этапы: (i) получение клона иммортализованных В-клеток или культивирования плазматических клеток по изобретению; (ii) секвенирование нуклеиновой кислоты кодирующей представляющее интерес антитело, из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток.

Согласно заявке способ получения молекулы(л) нуклеиновой кислоты, которая кодирует представляющее интерес антитело, включающему этап получения нуклеиновой кислоты, которую получали из клона трансформированных В-клеток или культивируемых плазматических клеток по изобретению. Таким образом, способы для предварительного получения клона В-клеток или культивируемой плазматической клетки, а затем получения нуклеиновой кислоты(т) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток можно проводить в различные моменты времени, их могут проводить различные люди в разных местах (например, в разных странах).

Способ получения антитела (например, для фармацевтического применения), может включать этапы: (i) получения и/или секвенирования одной или более нуклеиновых кислот (например, генов тяжелых и легких цепей) из выбранного клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, экспрессирующих представляющее интерес антитело; (ii) встраивания нуклеиновой кислоты(т) или использования последовательности(ей) нуклеиновой кислоты для получения экспрессионного вектора; (iii) трансфекции клетки-хозяина, которая может экспрессировать представляющее интерес антитело; (iv) культивирования или субкультивирования трансфицированных клеток-хозяев в условиях, когда экспрессируется представляющее интерес антитело, и необязательно (v) очистки представляющего интерес антитела.

А также способ получения антитела может включать этапы культивирования или субкультивирования популяции трансфицированных клеток-хозяев в условиях, когда экспрессируется представляющее интерес антитело, и необязательно очистки представляющего интерес антитела, где указанную популя-

цию трансфицированных клеток-хозяев получали путем (i) предоставления нуклеиновой кислоты(т), кодирующей выбранное представляющее интерес антитело, которое продуцируется клоном В-клеток или культивируемыми плазматическими клетками, получаемыми, как описано выше, (ii) встраивания нуклеиновой кислоты(т) в экспрессирующий вектор, (iii) трансфекции вектора в клетки-хозяева, которые могут экспрессировать представляющее интерес антитело, и (iv) культивирования или субкультивирования трансфицированной клетки-хозяина, содержащей встроенные нуклеиновые кислоты, с получением представляющего интерес антитела. Таким образом, способы предварительного получения рекомбинантной клетки-хозяина, а затем ее культивирования для экспрессии антитела можно проводить в различные моменты времени, их могут проводить различные люди в разных местах (например, в разных странах).

Эпитопы

Как указано выше, антитела согласно заявке можно использовать для картирования эпитопов, с которыми они связываются. Авторы изобретения сделали открытие, что описанные нейтрализующие антитела направлены на эпитопы, встречающиеся в F-белке до слияния, но не после слияния. В одном из вариантов осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с F-белком RSV до слияния и не связываются с F-белком RSV после слияния. В другом варианте осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с F-белком RSV и MPV до слияния и не связываются с F-белком RSV и MPV после слияния. В еще одном варианте осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с F-белком RSV, MPV и PVM до слияния, но не связываются с F-белком RSV, MPV и PVM после слияния.

Эпитопы, с которыми связываются антитела, могут быть линейными (непрерывными) или конформационными (прерывными). В одном из вариантов антитела и фрагменты антител будут связываться с конформационным эпитопом. В другом варианте конформационный эпитоп будет презентироваться только в невозстановительных условиях. Без связи с какой-либо теорией конформационный эпитоп, с которым связываются антитела, обусловлен наличием дисульфидных связей между аминокислотными остатками в F-белке.

В другом варианте эпитоп, с которым связываются антитела, может отличаться от антигенного участка I, антигенного участка II, антигенного участка IV, как определяют в F-белке RSV после слияния и соответствующих участках в F-белке MPV. В другом варианте эпитопы могут не конкурировать перекрестно с паливизумабом, мотавизумабом, mAb 101F, mAb 131-2A или mAb D25 за связывание с F-белком RSV и не конкурируют перекрестно с mAb 234 за связывание с F-белком MPV.

В другом варианте область, с которой связываются антитела, может содержать полипептид, располагающийся в N-концевом участке F-белка RSV, включая остатки SAVSKGYLSALRTGWYTSVIT (SEQ ID NO: 63). Коровая часть в этом полипептиде образована остатками Y(x1)S(x2)LRTGW, которые являются высококонсервативными для RSV, MPV и PVM, и где аминокислота в положении (x1) может представлять собой, но не ограничиваться ими L, F или K, и где аминокислота в положении (x2) может представлять собой, но не ограничиваться ими, A или V. Примеры вариантов полипептида, с которыми могут связываться антитела включают, но не ограничиваются ими, YLSALRTGW (SEQ ID NO: 64), YLSVLRTGW (SEQ ID NO: 65), YFSALRTGW (SEQ ID NO: 66), YFSVLRTGW (SEQ ID NO: 67), YKSALRTGW (SEQ ID NO: 68) и YKSVLRTGW (SEQ ID NO: 69).

Полипептиды, которые могут связываться с антителами, могут находить ряд применений. Полипептиды и их варианты полипептидов в очищенной или синтетической форме можно использовать для повышения иммунных ответов (т.е. в качестве вакцины или для продукции антител для других применений) или для скрининга сыворотки на антитела, которые иммунологически взаимодействуют с эпитопом или его мимеотопами. В одном из вариантов осуществления такие полипептиды или варианты полипептидов, или антиген, содержащий такие полипептиды или варианты полипептидов, можно использовать в качестве вакцины для повышения иммунного ответа, которая содержит такие же антитела, как описанные. Антитела и фрагменты антител также можно использовать в способе мониторинга качества вакцин. В частности, антитела можно использовать для проверки того, что антиген в вакцине содержит правильный иммуногенный эпитоп в правильной конформации. Также можно рассмотреть возможность использования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для мониторинга качества вакцины против RSV или MPV или RSV и MPV, например, посредством проверки того, что антиген указанной вакцины содержит специфичный эпитоп в правильной конформации.

Полипептиды, которые связываются с антителами по настоящему изобретению, также могут являться пригодными для скрининга лигандов, которые связываются с указанными полипептидами. Такие лиганды включают, но не ограничиваются ими, антитела, включая антитела от верблюдовых, акул и других видов, фрагменты антител, пептиды, продукты технологии фагового дисплея, аптамеры, аднектины или фрагменты других вирусных или клеточных белков, могут блокировать эпитоп и, таким образом, предотвращать инфекцию.

Фармацевтические композиции

Фармацевтическая композиция может содержать одно или более из антител или фрагментов антител по изобретению; нуклеиновой кислоты, кодирующей такие антитела или фрагменты; векторов, кодирующих нуклеиновые кислоты, или полипептидов, распознаваемых антителами или антигенсвязываю-

щим фрагментом по изобретению. Фармацевтическая композиция также может содержать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Хотя носитель или эксципиент может облегчать введение, он не должен сам по себе индуцировать образование антител, опасных для индивидуума, получающего композицию. Он также не должен являться токсичным. Подходящие носители могут представлять собой большие медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

Можно использовать фармацевтически приемлемые соли, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут содержаться вспомогательные вещества, такие как смачивающие средства или эмульгаторы, или буферизирующие pH вещества. Такие носители обеспечивают возможность получать фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий, для приема внутрь индивидуумом.

Композиция может быть представлена в нескольких формах введения, формы включают, но не ограничиваются ими, такие формы, подходящие для парентерального введения, например, посредством инъекции или инфузии, например, посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В случае, когда продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может находиться в форме суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе, и он может содержать вспомогательные средства, такие как суспендирующие средства, консерванты, стабилизаторы и/или диспергирующие средства. Альтернативно, молекула антитела может находиться в сухой форме, которую необходимо восстанавливать перед применением с использованием подходящей стерильной жидкости.

После получения композиции по изобретению можно вводить непосредственно индивидууму. В одном из вариантов осуществления композиции адаптируют для введения млекопитающему, например, людям.

Фармацевтические композиции можно вводить любым из ряда путей, включая, но, не ограничиваясь ими, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интраперитонеальный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный, местный, подкожный, интраназальный, энтеральный, сублингвальный, внутривлагалищный или ректальный путь. Для введения фармацевтических композиций, согласно заявке, также можно использовать безыгольные шприцы. Как правило, терапевтические композиции можно получать в виде инъектируемых растворов, а также в виде жидких растворов или суспензий. Также можно получать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией.

Прямую доставку композиций, как правило, проводят посредством инъекции, подкожно, интраперитонеально, внутривенно или внутримышечно или доставляют в межклеточное пространство ткани. Композиции также можно вводить в очаг поражения. Дозированное лечение может представлять собой схему однократного дозирования или схему многократного дозирования. Известные фармацевтические средства на основе антител обеспечивают рекомендации, касающиеся частоты введения, например, необходимо ли фармацевтическое средство доставлять ежедневно, еженедельно, ежемесячно и т.д. Частота и дозирование также могут зависеть от тяжести симптомов.

Композиции можно получать в различных формах. Например, композиции можно получать в виде инъектируемых растворов, а также в виде жидких растворов или суспензий. Также можно получать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией (например, лиофилизированной композиции, такой как Synagis™ и Herceptin™ для восстановления стерильной водой, содержащей консервант). Композицию можно получать для местного введения, например, в виде мази, крема или порошка. Композицию можно получать для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея или в виде сиропа (необязательно ароматизированного). Композицию можно получать для легочного введения, например, в виде ингаляционного аэрозоля, с использованием тонкодисперсного порошка или спрея. Композицию можно получать в виде суппозитория или пессария. Композицию можно получать для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Композиция может находиться в форме набора, сконструированного таким образом, чтобы комбинированную композицию восстанавливать непосредственно перед введением индивидууму. Например, лиофилизированное антитело можно предоставлять в форме набора со стерильной водой или стерильным буфером.

Следует понимать, что активный ингредиент в композиции может представлять собой молекулу антитела, фрагмент антитела или их варианты и производные. Он подвергается деградации в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композицию необходимо вводить с использованием желудочно-кишечного тракта, композиция должна содержать средство, которое защищает антитело от деградации, но которое высвобождает антитело после его всасывания из желудочно-кишечного тракта.

Всестороннее обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Gennaro (2000) Re-

mington: The Science и Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472.

Фармацевтические композиции, раскрытые в заявке, как правило, будут иметь pH от 5,5 до 8,5, в некоторых вариантах осуществления он может составлять от 6 до 8 и в других вариантах осуществления приблизительно 7. pH можно поддерживать посредством использования буфера. Композиция может являться стерильной и/или апиrogenенной. Композиция может быть изотонической по отношению к людям. В одном из вариантов фармацевтические композиции можно поставлять в герметически закрытых контейнерах.

Фармацевтические композиции могут содержать эффективное количество одного или более антигенов и/или полипептида, содержащего эпитоп, который связывается с антителом т.е. количество, которое является достаточным для лечения, улучшения состояния, ослабления или профилактики желаемого заболевания или состояния или для проявления детектируемого терапевтического эффекта. Терапевтические эффекты также включают снижение или ослабление патогенной активности или физических симптомов. Точное эффективное количество для любого конкретного индивидуума зависит от его размера, массы и состояния здоровья, природы и выраженности состояния и терапевтических средств или комбинации терапевтических средств, выбранных для введения. Эффективное количество для данной ситуации определяют общепринятым экспериментированием, и оно зависит от решения врача-клинициста. Для описанных композиций эффективная доза, как правило, составляет приблизительно от 0,01 приблизительно до 50 мг/кг или приблизительно от 0,05 приблизительно до 10 мг/кг для индивидуума, которому ее вводят. Известные фармацевтические средства на основе антител предоставляют рекомендации относительно такой дозы, например, Herceptin™ вводят посредством внутривенной инфузии 21 мг/мл раствора с начальной ударной дозой 4 мг/кг массы тела и еженедельной поддерживающей дозой 2 мг/кг массы тела; Rituxan™ вводят еженедельно при 375 мг/м² и т.д.

В одном из вариантов композиции могут содержать более одного (например, 2, 3 и т.д.) антитела для обеспечения аддитивного или синергического терапевтического эффекта. В другом варианте композиция может содержать одно или более (например, 2, 3 и т.д.) антител и одно или более (например, 2, 3 и т.д.) дополнительных антител против RSV, MPV или RSV и MPV. Кроме того, возможно введение антител совместно с антителами, специфическими для других патогенов, например, вируса гриппа А или гриппа В. Антитела можно вводить в комбинации/одновременно или отдельно от антител, специфических к патогенам, отличным от RSV или MPV.

Фармацевтическая композиция может содержать два или более антитела, где первое антитело представляет собой антитело, как раскрыто в настоящем описании, и второе антитело является специфическим к RSV, MPV или RSV и MPV или другому патогену, который может содержаться у индивидуума со смешанной инфекцией, которому вводят фармацевтическую композицию.

Примеры антител, специфичных к RSV, MPV и PVM и которые нейтрализуют их, включают, но не ограничиваются ими, вариант 3 HMB3210, вариант 1 HMB3210, вариант 2 HMB3210, вариант 4 HMB3210, вариант 5 HMB3210, вариант 6 HMB3210, вариант 1 HMB2430, вариант 2 HMB2430, вариант 3 HMB2430, вариант 4 HMB2430 или вариант 5 HMB2430.

Фармацевтическая композиция может содержать вариант 1 антитела HMB3210 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция также может содержать вариант 2 антитела HMB3210 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. И фармацевтическая композиция может содержать вариант 3 антитела HMB3210 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция еще может содержать вариант 4 антитела HMB3210 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может содержать вариант 5 антитела HMB3210 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может содержать и вариант 6 антитела HMB3210 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном варианте фармацевтическая композиция может содержать вариант 1 антитела HMB2430 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте фармацевтическая композиция может содержать вариант 2 антитела HMB2430 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте фармацевтическая композиция может содержать вариант 3 антитела HMB2430 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте фармацевтическая композиция может содержать вариант 4 антитела HMB2430 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте фармацевтическая композиция может содержать вариант 5 антитела HMB2430 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

Антитела можно вводить (комбинировано или раздельно) совместно с другими терапевтическими средствами, например, с химиотерапевтическими соединениями, с лучевой терапией и т.д. В одном из вариантов терапевтические соединения включают противовирусные соединения, такие как Tamiflu™. Такое комбинированное лечение обеспечивает аддитивное или синергическое улучшение терапевтической эффективности по сравнению с индивидуальными терапевтическими средствами при отдельном

введении. Термин "синергизм" используют для описания комбинированного действия двух или более активных средств, которое больше, чем сумма отдельных действия каждого соответствующего активного средства. Таким образом, когда комбинированное действие двух или более средств приводит к "синергетическому ингибированию" активности или процесса, следует понимать, что ингибирование активности или процесса является больше, чем сумма ингибирующего действия каждого соответствующего активного средства. Термин "синергетический терапевтический эффект" относится к терапевтическому эффекту, наблюдаемому для комбинации двух или более терапевтических средств, где терапевтический эффект (как определяют по любому из ряда параметров) больше, чем сумма отдельных терапевтических эффектов, наблюдаемых для соответствующих отдельных видов терапии.

Антитела можно вводить таким индивидуумам, у которых ранее не выявляли ответной реакции, т.е. было показано, что они являются устойчивыми к лечению инфекции RSV или MPV. Такое лечение может включать предшествующее лечение противовирусным средством. Это может быть обусловлено, например, инфекцией, устойчивой к противовирусному средству штаммом RSV, MPV или RSV и MPV.

В одном из вариантов композиция может содержать антитела, где антитела могут составлять по меньшей мере 50 мас. % (например, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% или более) от общего белка в композиции. В такой композиции антитела находятся в очищенной форме.

В заявке описан способ получения фармацевтической композиции, включающий этапы (i) получения антитела и (ii) смешивания очищенного антитела с одним или более фармацевтически приемлемым носителем.

В другом варианте способ получения фармацевтической композиции может включать этап смешивания антитела с одним или более фармацевтически приемлемым носителем, где антитело представляет собой моноклональное антитело, которое получали из трансформированной В-клетки или культивированной плазматической клетки. Таким образом, способы предварительного получения моноклонального антитела, а затем получения фармацевтического препарата можно проводить в различные моменты времени, их могут проводить различные люди в разных местах (например, в разных странах).

В качестве альтернативы антителу или В-клетки для терапевтических целей можно использовать нуклеиновую кислоту (как правило, ДНК), кодирующую представляющее интерес моноклональное антитело (или его активный фрагмент), получаемую из В-клетки или культивируемых плазматических клеток. Нуклеиновая кислота может экспрессироваться у индивидуума *in situ*, обеспечивая желаемый терапевтический эффект. Подходящая генотерапия и доставка векторов нуклеиновой кислоты известны в данной области.

Композиции могут представлять собой иммуногенные композиции и в некоторых вариантах осуществления могут представлять собой вакцинные композиции, содержащие антигене эпитопом, распознаваемым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Вакцины могут быть профилактическими (т.е. предотвращать инфекцию) или терапевтическими (т.е. лечить или приводить к улучшению состояния инфекции).

Композиции могут содержать противомикробное средство, в частности, если упакованы в формате многократных доз. Они могут содержать детергент, например, Tween (полисорбат), такой как Tween 80. Детергенты, как правило, содержатся в низких количествах, например, менее 0,01%. Композиции также могут содержать натриевые соли (например, хлорид натрия) для придания тоничности. Концентрация NaCl 10 ± 2 мг/мл характерна.

Кроме того, композиции могут содержать сахарный спирт (например, маннит) или дисахарид (например, сахарозу или трегалозу), например, приблизительно 15-30 мг/мл (например, 25 мг/мл), в частности, если их необходимо лиофилизировать, или если они содержат вещество, которое восстанавливали из лиофилизованного вещества. pH композиции для лиофилизации можно регулировать от 5 до 8 или от 5,5 до 7, или приблизительно 6,1 перед лиофилизацией.

Композиции также могут содержать одно или более иммунорегулирующих средств. В одном из вариантов одно или более иммунорегулирующих средств может включать адъювант.

Композиции на основе эпитопа могут вызывать опосредованный клетками иммунный ответ, а также гуморальный иммунный ответ для эффективной борьбы с инфекцией RSV и MPV. Такой иммунный ответ может индуцировать присутствующие длительное время (например, нейтрализующие) антитела и опосредованный клетками иммунитет, который может быстро реагировать при экспозиции RSV или MPV или RSV и MPV.

Виды медицинского лечения и применения

Антитела и фрагменты антител или их производные и варианты можно использовать для лечения инфекции RSV или MPV или смешанной инфекции RSV и MPV, для профилактики инфекции RSV или MPV или RSV и MPV или для диагностики инфекции RSV или MPV.

Способы диагностики могут включать приведение антитела или фрагмента антитела в контакт с образцом. Такие образцы могут представлять собой образцы ткани, получаемые, например, из носовых проходов, придаточных пазух полости носа, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почки, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, головного мозга или кожи. Способы диагностики также могут включать детектирова-

ние комплекса антиген/антитело.

Таким образом (i) антитело, фрагмент антитела или его варианты и производные, (ii) клоны иммортализованных В-клеток, (iii) эпитопы, способные связываться с антителом, или (iv) лиганды, предпочтительно антитело, способные связываться с эпитопом, который связывается с антителом, для применения в терапии.

В заявке описан способ лечения индивидуума, включающий введение индивидууму антитела, фрагмента антитела или его вариантов и производных, или лиганда, предпочтительно антитела, способного связываться с эпитопом, который связывается с антителом. В одном из вариантов осуществления способ приводит к снижению инфекции RSV или MPV у индивидуума. В другом варианте осуществления способ предотвращает, снижает риск или замедляет развитие инфекции RSV или MPV у индивидуума.

Заявку также можно отнести к применению (i) антитела, фрагмента антитела или его вариантов и производных, (ii) клона иммортализованных В-клеток, (iii) эпитопа, способного связываться с антителом, (iv) лиганда, предпочтительно антитела, который связывается с эпитопом, способным связываться с антителом, или (v) фармацевтической композиции для (i) производства лекарственного средства для лечения или ослабления инфекции RSV или MPV или RSV и MPV (ii) вакцины или (iii) диагностики инфекции RSV и MPV.

Заявку можно отнести к композиции для применения в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения инфекции RSV или MPV. Оно также относится к использованию антител и/или белка, содержащего эпитоп, с которым такое антитело связывается, в производстве лекарственного средства для лечения индивидуума и/или диагностики у индивидуума. Она также относится к способу лечения индивидуума, включающему этап введения индивидууму композиции. В некоторых вариантах индивидуум может представлять собой человека. Один из путей проверки эффективности терапевтического лечения включает мониторинг симптомов заболевания после введения композиции. Лечение может представлять собой схему с однократным дозированием или схему с многократным дозированием.

В одном из вариантов антитело, фрагмент антитела, клон иммортализованных В-клеток, эпитоп или композицию можно вводить нуждающемуся в таком лечении индивидууму. Такой индивидуум включает, но не ограничивается ими, индивидуума, который особенно подвергается риску или является предрасположенным к инфекции RSV или MPV, включая, например, индивидуума с ослабленным иммунитетом. Антитело или фрагмент антитела также можно использовать при пассивной иммунизации или активной вакцинации.

Антитела и их фрагменты, как описано в настоящей заявке, также можно использовать в наборе для диагностики инфекции RSV или MPV. Кроме того, эпитопы, способные связываться с антителом, можно использовать в наборе для мониторинга эффективности способов вакцинации путем детектирования наличия защитных антител против RSV или антитела против MPV. Антитела, фрагмент антитела или их варианты и производные также можно использовать в наборе для мониторинга производства вакцины с желаемой иммуногенностью.

Заявку можно отнести к эпитопу, который специфически связывается с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, для применения (i) в терапии, (ii) в производстве лекарственного средства для лечения или ослабления инфекции RSV или MPV или RSV и MPV, (iii) в качестве вакцины или (iv) для скрининга лигандов, способных нейтрализовать инфекцию RSV или MPV или RSV и MPV.

Заявку можно отнести к способу получения фармацевтического средства, включающему этап смешивания моноклонального антитела с одним или более фармацевтически приемлемых носителей, где моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело, которое получали из трансфицированной клетки-хозяина. Таким образом, способы предварительного получения моноклонального антитела (например, его экспрессии и/или его очистки), а затем его смешивания с фармацевтическим носителем(ями) можно проводить в различные моменты времени, их могут проводить различные люди в разных местах (например, в разных странах).

Начиная с трансформированной В-клетки или культивируемой плазматической клетки, можно проводить различные этапы культивирования, субкультивирования, клонирования, субклонирования, секвенирования, получения нуклеиновой кислоты и т.д. с оптимизацией на каждом этапе для сохранения антитела, экспрессируемого трансформированной В-клеткой или культивируемой плазматической клеткой. В одном из вариантов осуществления указанные выше способы дополнительно включают способы оптимизации (например, созревание аффинности или оптимизации), применяемые к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитело.

Во всех этих способах нуклеиновую кислоту, используемую в экспрессирующем хозяине, можно подвергать манипуляции для встраивания, удаления или изменения определенных последовательностей нуклеиновой кислоты. Изменения в результате такой манипуляции включают, но не ограничиваются ими, изменения для введения участков рестрикции, для улучшения частоты использования кодона, для добавления или оптимизации регуляторных последовательностей транскрипции и/или трансляции и т.д. Также можно изменить нуклеиновую кислоту для изменения кодируемых аминокислот. Например, пригодным может являться введение одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т.д.) замен ами-

нокислот, делеций и/или вставок в аминокислотную последовательность антитела. Такие точечные мутации могут модифицировать эффекторные функции, аффинность связывания с антигеном, посттрансляционные модификации, иммуногенность и т.д., могут включать аминокислоты для присоединения ковалентных групп (например, меток) или могут вводить метки (например, для очистки). Мутации можно вводить в конкретные участки или можно вводить случайным образом с последующей селекцией (например, молекулярной эволюцией). Например, одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих любую из областей CDR, переменные области тяжелой цепи или переменные области легкой цепи антител можно подвергать случайному или направленному мутагенезу. Такие изменения могут приводить к итеративному процессу, где сохраняются начальные изменения, и вводятся новые изменения в другие нуклеотидные положения. Кроме того, можно комбинировать изменения, получаемые на независимых этапах. Различные свойства, вводимые в кодируемые аминокислотные последовательности, могут включать, но не ограничиваться ими, повышенную аффинность.

Общие положения

Как используют в настоящем описании, термины "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент" и "фрагмент антитела" используют взаимозаменяемо для обозначения любого фрагмента антитела по изобретению, который сохраняет антигенсвязывающую активность антитела. Примеры фрагментов антител могут включать, но не ограничиваться ими, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Кроме того, термин "антитело", как используют в настоящем описании, включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

Как используют в настоящем описании, "нейтрализующее антитело" представляет собой антитело, которое нейтрализует, например, предотвращает, ингибирует, снижает, затрудняет или препятствует способности патогена иницировать и/или сохранять инфекцию у хозяина. Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" в настоящем описании используют взаимозаменяемо. Такие антитела можно использовать отдельно или в комбинации в качестве профилактических или терапевтических средств после соответствующего формулирования в ассоциации с активной вакцинацией, в качестве диагностического средства или в качестве средства получения, как описано в настоящем описании.

Термин "содержащий" включает "включающий", а также "состоящий", например композиция, "содержащая" X может состоять исключительно из X или может содержать какое-либо дополнение, например X+Y.

Слово "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может абсолютно не содержать Y. При необходимости слово "по существу" можно не указывать в определении изобретения.

Термин "приблизительно" в отношении численной величины x означает, например, $x \pm 5\%$ или $x \pm 7\%$, или $x \pm 10\%$, или $x \pm 12\%$, или $x \pm 15\%$, или $x \pm 20\%$.

Предполагают, что термин "заболевание", как используют в настоящем описании, как правило, является синонимом, и его используют взаимозаменяемо с терминами "нарушение" и "состояние" (как в медицинском состоянии), что обусловлено тем, что все они отражают аномальное состояние организма человека или животного или одного из его частей, которое нарушает нормальное функционирование, как правило, проявляясь с отличительными признаками и симптомами, и приводит к тому, что продолжительность или качество жизни человека или животного снижается.

Как используют в настоящем описании, ссылка на "лечение" индивидуума или пациента предназначена включать предотвращение, профилактику, ослабление, улучшение состояния и терапию.

Термины "индивидуум" или "пациент" в настоящем описании используют взаимозаменяемо для обозначения всех млекопитающих, включая людей. Примеры индивидуумов включают людей, коров, собак, кошек, лошадей, коз, овец, свиней и кроликов. В одном из вариантов осуществления пациент представляет собой человека.

Примеры

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения предоставлены в следующих ниже примерах. Следующие ниже примеры предоставлены только в качестве иллюстрации и для помощи специалисту в данной области техники использовать изобретение. Примеры не предназначены ограничивать объем изобретения каким-либо образом.

Пример 1. Выделение и характеристика моноклональных антител из В-клеток памяти человека, способных перекрестно нейтрализовать RSV и MPV

Из когорты 125 доноров крови авторы выбирали 7 доноров, у которых выявляли высокие титры антител против RSV и MPV в сыворотке. В-клетки CD22+ IgG+ выделяли из криоконсервированных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) и подвергали иммортализации в 3-5 клетках/лунку с использованием вируса Эпштейна-Барра (EBV) и олигодезоксинуклеотида 2006 CpG и облученных аллогенных PBMC в качестве фидерных клеток. Супернатанты культур собирали через 14 суток и анализировали на наличие нейтрализующих антител анализом микронейтрализации на основе инфекции клеток Herp-2 штаммом A2 RSV или клеток LLC-MK2 штаммом A1 I-PV-03/01-6621 MPV. Чистые супернатанты

инкубировали с 50-100 TCID₅₀ вирусов в течение 1 ч при комнатной температуре перед добавлением клеток-мишеней Hep-2 или LLC-MK2, с которыми инкубировали в течение 6 или 8 суток соответственно. Затем детектировали жизнеспособные клетки с использованием спектрофотометра, добавляя к культурам реагент WST-1 (Roche) в течение от 3 до 4 ч.

Из трех независимых экспериментов выделяли 36 моноклональных антител (mAb), которые нейтрализовали MPV (фиг. 1, левая панель) и из пяти независимых экспериментов выделяли 136 mAb, которые нейтрализуют RSV (фиг. 1, правая панель). Затем проводили вторичный скрининг для тестирования, способны ли выделенные mAb нейтрализовать MPV и RSV. С использованием этой стратегии было выявлено, что два mAb, выделенные у одного из доноров (дон. 5), перекрестно нейтрализуют RSV и MPV: (i) HMB2430, которое исходно отбирали на основании нейтрализации RSV, и (ii) HMB3210, которое исходно отбирали на основании нейтрализации MPV.

Гены VH и VL HMB2430 и HMB3210 клонировали в экспрессирующие векторы для IgG1 и получали рекомбинантные mAb временной трансфекцией клеток 293 Freestyle (293F).

Супернатанты от трансфицированных клеток собирали через 10 суток культивирования и IgG аффинно очищали хроматографией с белком А. Два mAb обладали наиболее общими фрагментами генов V и J (IGHV3-21*01, IGHJ4*02, IGLV1-40*01 и IGLJ1*01) согласно анализу гомологии, проводимому с использованием базы данных IMGT, но различали в N-областях по частоте использования IGHD (D3-10*01 и D5-24*01 для HMB2430 и HMB3210, соответственно) и по паттерну соматических мутаций, и, таким образом, их не считали клонально родственными.

Половину максимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) HMB2430 и HMB3210 определяли с использованием анализа микронеutralизации, описанного выше, со 100 инфицирующими дозами 50 для культуры тканей (TCID₅₀) вируса. Значения IC₅₀ values рассчитывали посредством интерполяции кривых нейтрализации, аппроксимированных с использованием нелинейной регрессией с 4 параметрами с переменным наклоном. Результаты анализа представлены на фиг. 2 и в табл. 4.

Таблица 4

Вирусы (группа)	mAb IC ₅₀ (нг/мл)			
	HMB2430	HMB3210	Паливизумаб	234
A2 RSV (A)	146	86	524	>20000
MPV I-PV 03/01-6621 (A1)	393	52	>20000	7

Пример 2. Степень реактивности всех групп и подгрупп RSV и MPV

Для оценки спектра реактивности HMB2430 и HMB3210 очищенные mAb тестировали FACS на связывание с инфицированными RSV клетками Hep-2 или с инфицированными MPV клетками LLC-MK2 с использованием следующих штаммов RSV и MPV: A2 RSV (A, 1961 Australia; A/A2/61), RSV Long (A, Maryland US, 1956; A/Long/56), RSV Randall (A, Chicago US, 1958; A/Randall/58), RSV 9320 (B, Massachusetts US, 1977; B/9320/77), WV/14617/85 (B, Huntington West Virginia, 1985; B/14617/85), 18537 (B, Washington District of Columbia US, 1962; B/18537/62), MPV I-PV-03/01-6621 (A1, Pavia IT, 2001; A1/6621/01), MPV I-PV-02/06-8938 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8938/06), I-PV-03/04-4702 (B1, Pavia IT, 2004; B1/4702/04) и I-PV-02/04-3817 (B2, Pavia IT, 2004; B2/3817/04). Параллельно тестировали три ранее описанных mAb: (i) мотавизумаб, специфичный к RSV; (ii) mAb 234, специфичное к MPV, и (iii) FO32, специфичное к гриппу А (используемое в качестве отрицательного контроля). Все mAb тестировали на связывание с инфицированными или неинфицированными клетками при 10 мкг/мл. HMB2430 и HMB3210 взаимодействовали со всеми 6 тестируемыми штаммами RSV и всеми 4 тестируемыми штаммами MPV, характерными для известных групп и подгрупп RSV и MPV (табл. 5). В противоположность этому, мотавизумаб взаимодействовал со всеми тестируемыми 6 штаммами RSV, но не взаимодействовал с каким-либо из 4 тестируемых штаммов MPV. В свою очередь, mAb 234 взаимодействовало со всеми 4 тестируемыми штаммами MPV, но не взаимодействовало с каким-либо из 6 тестируемых штаммов RSV.

Таблица 5. Окрашивание клеток Нер-2 или LLC-MK2, инфицированных различными штаммами RSV или MPV, соответственно, FO32 (отрицательный контроль), мотавизумабом, 234, HMB2430 и HMB3210, как измеряют проточной цитометрией.

Вирус	Моноклональное антитело (10 мкг/мл)				
	FO32	Мотавизумаб	mAb 234	HMB2430	HMB3210
RSV A/A2/61	-	+	-	+	+
RSV A/Long/56	-	+	-	+	+
RSV A/Randall/58	-	+	-	+	+
RSV B/18537/62	-	+	-	+	+
RSV B/14617/85	-	+	-	+	+
RSV B/9320/77	-	+	-	+	+
MPV A1/6621/01	-	-	+	+	+
MPV A2/8938/06	-	-	+	+	+
MPV B1/4702/04	-	-	+	+	+
MPV B2/3817/04	-	-	+	+	+
Mock LLC-MK2	-	-	-	-	-
Mock Нер-2	-	-	-	-	-

(-)<5% окрашенных клеток

(+)>50% окрашенных клеток

Пример 3. Связывание с рекомбинантным F-белком RSV и MPV посредством ELISA и окрашиванием трансфицированных клеток

Для идентификации антигена-мишени, распознаваемого HMB2430 и HMB3210 на вирусах RSV и MPV, авторы анализировали два mAb параллельно с мотавизумабом и mAb 234 в отношении их способности связываться с гомотримерным растворимым F-белком RSV (штамм A2), который получали из временно трансфицированных клеток 293F. Как представлено на фиг. 3, HMB2430 и HMB3210 специфически взаимодействовали с F-белком RSV согласно ELISA и для них демонстрировали отличающийся профиль связывания по сравнению с мотавизумабом. Кроме того, HMB2430 и HMB3210 окрашивали внутриклеточно клетки 293F временно трансфицированные экспрессирующими векторами на основе клеток млекопитающих, кодирующих полноразмерный F-белок из RSV (штамма A2) или MPV (штамма NL/1/99 B1) (табл. 6), свидетельствуя о том, что HMB2430 и HMB3210 распознают общий эпитоп, презентруемый на F-белках RSV и MPV. Это открытие является особенно неожиданным, учитывая, что F-белки RSV и MPV обладают только 33-35% идентичностью аминокислотных последовательностей. Как и ожидалось, паливизумаб и мотавизумаб связывались с клетками, экспрессирующими F-белок RSV, но не с клетками, экспрессирующими F-белок MPV (табл. 6). В свою очередь, mAb 234 связывалось с клетками, экспрессирующими F-белок MPV, но не с клетками, экспрессирующими F-белок RSV (табл. 6).

Таблица 6. Окрашивание нетрансфицированных клеток 293F или клеток 293F, трансфицированных F-белком RSV или MPV, как измеряют проточной цитометрией

Антитело (10 мкг/мл)	293F+RSV F (A/A2/61; A)	293F+MPV F (NL/1/99; B1)	Нетрансфицированные 293F
HMB3210	+	+	-
HMB2410	+	+	-
Паливизумаб	+	-	-
Мотавизумаб	+	-	-
234	-	+	-

(-)<5% окрашенных клеток

(+)>50% окрашенных клеток

Пример 4. Картирование эпитопов с использованием анализа ингибирования связывания на инфицированных RSV клетках

Для того чтобы установить эпитоп F-белка, распознаваемый HMB2430 и HMB3210, авторы разработали анализ ингибирования связывания с использованием клеток Нер-2, инфицированных штаммом A2 RSV. Следующую ниже панель специфических к F-белку RSV mAb приобрели или получали синтезом генов: (i) мотавизумаб, специфический для антигенного участка II; (ii) 101F, специфическое для антигенного участка IV; (iii) D25 неопределенной специфичности; (iv) 131-2а, специфическое для антигенного участка I. mAb метили биотином и тестировали на связывание с инфицированными клетками Нер-2 для определения оптимальной концентрации mAb, необходимой для получения 70-80% максимального

связывания. Затем использовали меченые биотином mAb в качестве зондов для оценки, ингибировалось ли их связывание (измеряемое с использованием стрептавидина, конъюгированного с флуорофором) предварительной инкубацией клеток, инфицированных A2 RSV, с 50-кратным избытком гомологичных или гетерологичных немеченых mAb. Как и ожидалось, связывание меченного биотином HMB2430 блокировали предварительной инкубацией клеток с немеченым HMB2430, но его также частично блокировали немеченым HMB3210 (фиг. 4). В противоположность этому, связывание всех других тестируемых меченых биотином mAb, не предотвращали предварительной инкубацией с HMB2430 или HMB3210 (фиг. 4). В своей совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что HMB2430 и HMB3210 распознают частично перекрывающиеся эпитопы на F-белке, которые являются общими в RSV и MPV, и что эти эпитопы отличаются от эпитопов в антигенном участке II F-белка (распознаваемом мотавизумабом и паливизумабом), антигенном участке IV (распознаваемым mAb 101F) и антигенном участке I (распознаваемым mAb 131-2A). Кроме того, эпитопы, распознаваемые mAb HMB2430 и HMB3210 на F-белке RSV отличаются от неизвестного эпитопа, распознаваемого mAb D25.

Пример 5. Реактивность моноклонального антитела по отношению к F-белкам RSV и MPV в восстановительных и невосстановительных условиях

Для дополнительного подтверждения открытия, что HMB2430 и HMB3210 распознают F-белок RSV и MPV, авторы тестировали два mAb на их способность окрашивать F-белки RSV и MPV в вестерн-блоттинге. Клетки Hep-2 инфицировали RSV и клетки LLC-MK2 инфицировали MPV, лизировали с мягким детергентом и прогоняли на геле SDS-PAGE в восстановительных или невосстановительных условиях. Затем белки переносили на мембрану PVDF, которую затем инкубировали с HMB2430, HMB3210, мотавизумабом или mAb 234. Связывание mAb детектировали с использованием антитела, конъюгированного с HRP, против антитела человека в комбинации с ECL реагентом для детекции для вестерн-блоттинга. HMB2430 и HMB3210 связывались с F-белком, получаемым из инфицированных RSV клеток (фиг. 5) и инфицированных MPV клеток (фиг. 6) в невосстановительных условиях. Специфическое к MPV mAb 234 (которое распознает эпитоп на F-белке MPV, который соответствует антигенному участку II на F-белке RSV) связывалось с F-белком MPV в невосстановительных условиях, но не связывалось с F-белком RSV. В противоположность этому специфическое к RSV mAb мотавизумаб связывалось с F-белком RSV как в восстановительных, так и в невосстановительных условиях, подтверждая распознавание преимущественно линейного эпитопа. Эти результаты позволяют предположить, что, в отличие от мотавизумаба и паливизумаба HMB2430 и HMB3210 распознают конформационные эпитопы, которые также обусловлены наличием дисульфидных связей между аминокислотными остатками в F-белках RSV и MPV.

Пример 6. Нейтрализация всех групп и подгрупп RSV и MPV HMB2430 и HMB3210

Очищенные HMB2430 и HMB3210 mAb тестировали на их способность нейтрализовать инфекцию RSV или MPV клеток Hep-2 или LLC-MK2, соответственно. Тестировали следующие ниже штаммы RSV и MPV: A2 RSV (A, 1961 Australia; A/A2/61), RSV Long (A, Maryland US, 1956; A/Long/56), RSV Randall (A, Chicago US, 1958; A/Randall/58), RSV 9320 (B, Massachusetts US, 1977; B/9320/77), WV/14617/85 (B, Huntington West Virginia, 1985; B/14617/85), 18537 (B, Washington District of Columbia US, 1962; B/18537/62), RSV 9727/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9727/09), RSV 9736/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9736/09), RSV 9847/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9847/09), MPV I-PV-03/01-6621 (A1, Pavia IT, 2001; A1/6621/01), MPV I-PV-02/06-8938 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8938/06), I-PV-02/06-8908 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8908/06), I-PV-02/06-8909 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8909/06), I-PV-03/04-4702 (B1, Pavia IT, 2004; B1/4702/04) и I-PV-02/04-3817 (B2, Pavia IT, 2004; B2/3817/04).

В том же эксперименте HMB2430 и HMB3210 сравнивали с паливизумабом (специфическим к RSV) и mAb 234 (специфическим к MPV). HMB3210 нейтрализовало все 11 тестируемых штаммов RSV и все 6 тестируемых штаммов MPV, характерных для известных групп и подгрупп RSV и MPV (табл. 7). HMB2430 нейтрализовало все 11 тестируемых штаммов RSV и все тестируемые штаммы A1 и A2 MPV, но не тестируемые штаммы B1 или B2 MPV. Как и ожидалось, паливизумаб нейтрализовал все 11 тестируемых штаммов RSV, но ни одного из 6 тестируемых штаммов MPV, тогда как mAb 234 нейтрализовал все 6 тестируемых штаммов MPV, но ни одного из 11 тестируемых штаммов RSV.

HMB3210 и HMB2430 эффективно нейтрализовали все 11 тестируемых штаммов RSV (средние значения IC_{50} 0,070 и 0,133 мкг/мл соответственно). Эти значения являлись в среднем в 5,4 и 2,6 раза выше, чем значение IC_{50} паливизумаба (0,284 мкг/мл).

HMB3210 эффективно нейтрализовало все 6 тестируемых штаммов MPV (средние значения IC_{50} 0,113 мкг/мл), которое являлось в среднем в 1,7 раза ниже, чем значение IC_{50} 234 (0,046 мкг/мл).

Таблица 7. Нейтрализация штаммов RSV и MPV

Вирус	IC ₅₀ нейтрализации (мкг/мл)			
	Паливизумаб.	mAb 234	HMB2430	HMB3210
RSV A/A2/61	0,617	–	0,350	0,184
RSV A/Long/56	0,599	–	0,361	0,187
RSV A/Randall/58	0,440	–	0,179	0,116
RSV A/9846/09	0,283	–	0,123	0,06
RSV A/9835/09	0,284	–	0,076	0,063
RSV B/18537/62	0,143	–	0,094	0,034
RSV B/14617/85	0,129	–	0,096	0,038
RSV B/9727/09	0,275	–	0,084	0,051
RSV B/9320/77	0,069	–	0,021	0,012
RSV B/9736/09	0,092	–	0,027	0,007
RSV B/9847/09	0,209	–	0,053	0,026
MPV A1/6621/01	–	0,040	0,744	0,071
MPV A2/8938/06	–	0,044	1,049	0,045
MPV A2/8908/06	–	0,057	2,795	0,066
MPV A2/8909/06	–	0,012	0,161	0,007
MPV B1/4702/04	–	0,019	–	0,029
MPV B2/3817/04	–	0,106	–	0,465

Пример 7. Отсутствие селекции ускользнувших мутантов вирусов RSV и MPV

HMB3210, паливизумаб и mAb 234 тестировали на их способность отбирать устойчивые к моноклональным антителам мутанты RSV или MPV (MARM) *in vitro*. Несмотря на неоднократные попытки, HMB3210 не отбирал каких-либо MARM RSV или MPV при тестировании против 32***10e6 TCID₅₀ RSV A/Long/58 TCID₅₀ и против 16***10e6 TCID₅₀ MPV A1/6621/01. В противоположность этому, паливизумаб отбирал MARM с высокой частотой (всего 8 5 независимых от паливизумаба MARM отбирали из входных данных 16***-10e6 TCID₅₀ RSV A/Long/58, что соответствовало частоте TCID₅₀ 1 из 185000). mAb 234 в тех же экспериментальных условиях не отбирает какие-либо MARM MPV. Трудность выделения MARM mAb 234 согласуется с опубликованными данными Ulbrandt et al. (J. General. Virol., 2008), которые демонстрировали, что для выделения небольшого числа MARM необходимым являлся высокий уровень вируса. Ускользнувшие вирусы картировали по мутации K242N с использованием изолята B1 NL/1/99 MPV. Собирали независимые от паливизумаба MARM (PZ-MARM) и F-белок 10 из них подвергали полному секвенированию (табл. 8). PZ-MARM2, PZ-MARM3, PZ-MARM4, PZ-MARM5, PZ-MARM6, PZ-MARM8 и PZ-MARM10 обладали одинаковыми двумя мутациями аминокислот (P101S/K272T); PZ-MARM1 также содержал две мутации аминокислот в том же положении, но с другой заменой аминокислот (P101S/K272Q); PZ-MARM7 содержал мутацию одной аминокислоты (K272N) снова в положении 272, наконец, PZ-MARM9 содержал мутацию в общем с другими PZ-MARM положении и уникальную мутацию в положении 262 (P101S/N262Y). Точечные мутации в этой области (положение нуклеотида 827 и 828) были уже описаны (Zhao et al., Virology, 2004) и приводят к двум различным заменам аминокислот в положении 272 (K272Q и K272M). Первая мутация (т.е. K272Q) также присутствует в PZ-MARM1, описанном в настоящем описании. Вирусы, несущие такие точечные мутации, являлись полностью устойчивыми к профилактическим эффектам паливизумаба у хлопковых хомяков (Zhao et al., Virology, 2004), и аналогичные мутации наряду с другими были описаны у инфицированных RSV хлопковых хомяков с ослабленным иммунитетом, которых профилактически обрабатывали паливизумабом.

Затем тестировали HMB3210, HMB2430 и паливизумаб на их способность нейтрализовать инфекцию PZ-MARM6 клеток Нер-2. Несмотря на то, что паливизумаб не нейтрализовал PZ-MARM6, HMB3210 и HMB2430 эффективно нейтрализовали этот вирус до уровней, сравнимых с уровнями, наблюдаемыми для соответствующего вируса дикого типа (фиг. 7).

В своей совокупности эти результаты демонстрируют, что HMB3210 и HMB2430 не отбирает MARM RSV или MPV *in vitro*. Эти результаты соответствуют представлению, что эпитопы-мишени, распознаваемые HMB3210 и HMB2430, являются очень консервативными, и что мутации, которые отменяют связывание антитела является крайне редкими или могут быть ассоциированы с потерей репликативной способности вируса.

Таблица 8. Изменения аминокислот MARM RSV, отбираемых паливизумабом

	положение а.к. (положение нуклеотида)				
	101 (314)	262 (797)	272 (827)	272 (828)	272 (829)
RSV A/Long/56	P	N	K	K	K
PZ-MARM1	S (C на T)		Q (A на C)		
PZ-MARM2	S (C на T)			T (A на C)	
PZ-MARM3	S (C на T)			T (A на C)	
PZ-MARM4	S (C на T)			T (A на C)	
PZ-MARM5	S (C на T)			T (A на C)	
PZ-MARM6	S (C на T)			T (A на C)	
PZ-MARM7	P				N (G на T)
PZ-MARM8	S (C на T)			T (A на C)	
PZ-MARM9	S (C на T)	Y (A на T)			
PZ-MARM10	S (C на T)			T (A на C)	

Пример 8. Удаление участка гликозилирования в LCDR3 не влияет на активность HMB3210

Вариабельная область легкой цепи HMB3210 содержит мотив N-гликозилирования (NxS/T, где x может представлять собой любую аминокислоту, за исключением пролина) в LCDR3 в положении 113 (нумерация IMGT). Аспарагин в положении 113 (N113) заменяет серин, содержащийся в зародышевой последовательности. Наличие мотивов гликозилирования в вариабельной области может оказывать положительное или отрицательное влияние на активность антитела и признано, что оно обуславливает гетерогенность антитела. Содержание гликана в легкой цепи HMB3210 оценивали на геле SDS-PAGE в восстановительных условиях после инкубации в присутствии или отсутствии N-гликозидазы PNG-азы F (фиг. 8). Этот анализ указывал на то, что меньшая часть легкой цепи является фактически гликозилированной. Затем удаляли остаток N113 и восстанавливали соответствующий кодируемый зародышевой последовательностью остаток серина. Параллельно также удаляли другую соматическую мутацию в кармашной области -1 легкой цепи (P7T) для восстановления кодируемого зародышевой последовательностью остатка пролина в положении 7 (нумерация IMGT в соответствующем гене IGLV1 -40*02). Затем получали новый вариант HMB3210 (называемый HMB3210v3), состоящий из VH.2 тяжелой цепи HMB3210 (SEQ ID 17) и VL. 3 легкой цепи HMB3210, и тестировали его нейтрализующую активность против штаммов A2 RSV и I-PV 03/01-6621 MPV параллельно с HMB3210v2 (состоящим из VH.2 тяжелой цепи HMB3210 (SEQ ID NO: 17) и VL легкой цепи SEQ ID NO: 14). Для этого варианта (HMB3210v3) демонстрировали незначительно улучшенную нейтрализацию в отношении тестируемых штаммов RSV и MPV (фиг. 9), таким образом, демонстрируя, что удаление участка гликозилирования легкой цепи не влияет на связывание с эпитопами-мишенями RSV и MPV. Затем параллельно тестировали два варианта антител в отношении панели вирусов RVS и MPV, и демонстрировали, что они обладают сравнимыми активностями против всех тестируемых вирусов (фиг. 10). В заключении HMB3210v3 является не гликозилированным в вариабельной области легкой цепи и является в целом слабо мутированным по сравнению с зародышевыми генами тяжелых и легких цепей, содержит только 8 соматических мутаций аминокислот в тяжелой цепи и 4 в легкой цепи: S58A (HCDR2), I65S (HCDR2), Y66D (HFR3), V71A (HFR3), N85T (HFR3), Y88F (HFR3), V101I (HFR3), Y103F (HFR3), G56D (LCDR2), S65N (LCDR2), G78A (LFR3) и S109R (LCDR3) (все положения указаны в соответствии с нумерацией IMGT).

Пример 9. Перекрестная реактивность HMB3210 и HMB2430 против MPV обусловлена соматическими мутациями

Для понимания роли соматических мутаций в перекрестной реактивности HMB2430 и HMB3210 против RSV и MPV синтезировали варианты mAb без модификации на уровне зародышевых генов и тестировали на их способность нейтрализовать штаммы A2 RSV и I-PV 03/01-6621 MPV. mAb HMB2430 и HMB3210 без модификации на уровне зародышевых генов (HMB2430-GL и HMB3210-GL, соответствен-

но) состояли из VH.3 и VL. 2 в случае HMB2430-GL и из VH.3 и VL.4 в случае HMB3210-GL. Обе формы mAb без модификации на уровне зародышевых генов эффективно нейтрализовали RSV до уровней, сравнимых с уровнями, наблюдаемыми для исходных HMB3210 и HMB2430 с соматическими мутациями (фиг. 11). Однако HMB3210-GL и HMB2430-GL оказались неспособны нейтрализовать MPV, таким образом, свидетельствуя о том, что соматические мутации являются необходимыми для нейтрализации MPV. Для дополнительного понимания, являются ли соматические мутации тяжелой или легкой цепи ответственны за нейтрализацию MPV, авторы получали антитела, несущие либо тяжелую, либо легкую цепь в зародышевой конфигурации: HMB2430-VHGL-VLSM, состоящий из VH.3 и VL; HMB2430-VHSM-VLGL, состоящий из VH.2 и VL.2; HMB3210-VHGL-VLSM, состоящий из VH. 3 и VL; HMB3210-VHSM-VLGL, состоящий из VH.2 и VL.4. Удаление соматических мутаций в тяжелой цепи HMB3210 не влияло на нейтрализацию вирусов RSV или MPV, тогда как удаление соматических мутаций в тяжелой цепи HMB2430 влияло на нейтрализацию MPV, хотя и сохраняя нейтрализацию RSV. Удаление соматических мутаций в легкой цепи HMB2430 и HMB3210 устраняло нейтрализацию MPV, при это не влияя на нейтрализацию RSV (фиг. 11). В своей совокупности эти открытия указывают на то, что HMB3210 и HMB2430 изначально отбирались по RSV и затем развивались, посредством накопления соматических мутаций, перекрестной реактивности против MPV. Всего только 3 соматические мутации в CDR легкой цепи обуславливают приобретение перекрестной реактивности против MPV в специфическом к RSV антителе без модификации на уровне зародышевых генов. Следует отметить, что HMB2430 и HMB3210 (клонально не родственные) содержат одинаковую соматическую мутацию в LCDR3 S на R в положении 109.

Пример 10. Распознавание HMB3210 конформаций F-белка до и после слияния

Конструкцию ДНК, кодирующую F-остатки 26-136 и 147-512 RSV (соответствующие эктодомену F без пептида слияния штамма A2 RSV), с С-концевой гистиридиновой меткой подвергали оптимизации кодона и синтезировали. Рекомбинант F экспрессировали с использованием экспрессирующего вектора на основе бакуловируса в клетках Sf21 и очищали из супернатанта посредством никель-аффинной и эксклюзионной хроматографии (SEC). Аналогичную конструкцию уже использовали другие исследователи (Swanson et al., PNAS, 2011 и McLellan et al., J. Virol., 2011) для исследования кристаллической структуры F-белка после слияния. Белок анализировали в невосстановительных условиях на геле SDS-PAGE и получали полосу ≈ 65 -70 кДа, а затем анализировали SEC на колонке S200 F-белок "после слияния" RSV, элюируемый в виде симметричного пика с кажущейся молекулярной массой ≈ 150 кДа, что соответствует M_w тримерного F-белка и частично совпадает с объемом элюирования антител IgG1 человека. F-белок "после слияния" инкубировали с HMB3210 или паливизумабом и пропускали две смеси через колонку S200. Инкубация F-белка "после слияния" с паливизумабом смещала пик элюирования к более низкому объему элюирования (соответствующему кажущейся $M_w \approx 300$ кДа) по сравнению с одним F-белком, указывая на то, что паливизумаб связывается с F-белком "после слияния", как уже описано. Следует отметить, что инкубация HMB3210 с F-белком "после слияния" не приводит к сдвигу объема элюирования (фиг. 12). Тот факт, что HMB3210 и F-белок "после слияния" элюируются в виде независимых молекул, указывает на то, что HMB3210, в отличие от паливизумаба не связывается с F-белком "после слияния".

Затем синтезировали стабилизированную форму полноразмерного F-белка RSV до слияния согласно стратегии, адаптированной Magro et al., PNAS, 2012, путем замены 4 аминокислотных остатков (L481, D489, S509 и D510) на цистеины и путем замены 9 основных аминокислотных остатков (R106, R108, R109, K131, K132, R133, K134, R135 и R136) в двух участках расщепления F-белка на N-остатки для абляции участков расщепления фурином. Последовательность F-белка дополнительно модифицировали посредством встраивания участка расщепления TEV после трансмембранной области с последующими GFP и меткой 6-His на С-конце для облегчения очистки. Четыре введенных цистеина располагали в соответствии со структурой F до слияния PIV-5 таким образом, что образование межмономерных дисульфидных связей являлось возможным, только когда F-белок находился в конформации до слияния, но не когда повторно сворачивался в структуру после слияния, таким образом, обеспечивая стабилизацию F-белка до слияния. Magro et al. описали что стабилизированный F-белок до слияния является гетерогенным, вследствие того, что он также содержит часть молекул, в которых дополнительные остатки цистеина не связаны дисульфидными связями. Описанную в настоящем описании конструкцию F-белка получали с использованием экспрессирующего вектора на основе бакуловируса в клетках Sf21, солубилизировали из клеточной мембраны мягким детергентом и очищали никель-аффинной и эксклюзионной хроматографией. Очищенный F-белок до слияния анализировали посредством SEC на колонке S200 и элюировали в виде симметричного пика с кажущейся молекулярной массой ≈ 150 кДа, что соответствует M_w тримерного F-белка и что частично совпадает с объемом элюирования IgG1 человека. Инкубация F-белка до слияния с паливизумабом сдвигала пик элюирования к более низкому объему элюирования (соответствующему кажущейся $M_w \approx 300$ кДа) по сравнению с одним F-белком, а также индуцировала образование высокомолекулярного комплекса, который элюировался в мертвом объеме колонки, что может быть связано с образованием более крупных агрегатов. Аналогичный сдвиг объема элюирования также наблюдали, когда HMB3210v2 инкубировали с белком до слияния (фиг. 13). Эти результаты указывают на

то, что паливизумаб связывается с формами F-белка до слияния и после слияния, тогда как HMB3210 избирательно распознает форму F-белка до слияния. Два F белка (формы до и после слияния) также тестировали поверхностным плазмонным резонансом (SPR).

Паливизумаб связывался с белками до и после слияния со сходными аффинностями, тогда как HMB3210v3 избирательно связывался с F-белком до слияния с высокой аффинностью (константа K_d 0,1 нМ по сравнению с K_d паливизумаба 2 нМ) (фиг. 14).

Пример 11. HMB3210v3 перекрестно нейтрализуют два парамиксовируса животных: респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (BRSV) и вирус пневмонии мышей (PVM)

Также оценивали спектр реактивности HMB3210 на двух других парамиксовирусах животных: BRSV и PVM, двух вирусах, которые обладают 81 и 40% идентичностью аминокислот в F-белка с RSV, соответственно. HMB3210 тестировали на его способность нейтрализовать штамм 15 PVM и штамм RB94 BRSV, было продемонстрировано, что оно является эффективным против этих вирусов со значениями IC_{50} 100 и 10 нг/мл соответственно. Эти результаты указывают на то, что наряду с парамиксовирусами человека RSV и MPV HMB3210 также является эффективным против других двух вирусов семейства Paramyxoviridae

Пример 12. Ингибирование распространения вируса HMB3210

Авторы также измеряли способность HMB3210 и специфического антитела к RSV D25 предотвращать распространение вируса от клетки к клетке, для которого было описано, что оно является отличительным свойством антител против RSV независимо от нейтрализующей активности. Авторы инфицировали клетки Нер-2 штаммами А или В RSV, добавляли через 20 ч различные концентрации антител и анализировали образование синцитиев на 3 сутки для определения 50% концентрации антитела, ингибирующей распространение вируса, обозначаемой в настоящем описании как IS_{50} . Оба антитела оказались способны ингибировать распространение вируса, но в более высоких концентрациях. Следует отметить, что в этом анализе для HMB3210 демонстрировали IS_{50} , сравнимую с IS_{50} более эффективного нейтрализующего антитела D25 (фиг. 15).

Пример 13. Профилактическая и терапевтическая эффективность HMB3210 против RSV, MPV и PVM

На модели RSV на мышах HMB3210 являлся в среднем от пяти до десяти раз более эффективным, чем паливизумаб в отношении снижения титров RSV в легких и являлся эффективным в концентрациях, настолько низких как 0,12 мг/кг (фиг. 16a). На модели MPV на мышах HMB3210 являлось сравнительно эффективным (фиг. 16b). Для тестирования терапевтического потенциала HMB3210 авторы инфицировали RSV мышей с дефицитом STAT1 и вводили HMB3210 на сутки 1, 2 или 3 после инфекции. Несмотря на ограничения этой модели вследствие слабой репликации вируса, для HMB3210 демонстрировали терапевтическую эффективность во все моменты времени и сниженные титры вирусов и воспалительных цитокинов в легких (фиг. 17).

Для тестирования HMB3210 на более релевантной модели острой инфекции нижних дыхательных путей на животных авторы использовали его перекрестную реактивность против вируса PVM, вируса, который вызывает заболевание с летальным исходом у мышей после очень небольшого инокулята и воспроизводит признаки тяжелой инфекции RSV и MPV у людей. В профилактических условиях HMB3210 полностью защищало мышей от летальности при 0,12 мг/кг и от потери массы тела при 0,6 мг/кг (фиг. 18a). Кроме того, в терапевтических условиях HMB3210 полностью защищало от летальности при введении через 3 суток после инфекции при 30 и 5 мг/кг и обеспечивало существенную защиту при введении на 4 или 5 сутки при 30 мг/кг (фиг. 18b-d). В этой системе рибавирин, который представляет собой единственный утвержденный стандарт лечения при терапии у людей, как описано ранее (Bonville et al., 2004, Journal of Virology, 78:7984-7989) являлся неэффективным. Следует отметить, что терапевтическая доставка HMB3210 эффективно блокировала дальнейшее увеличение РНК вируса в легких (фиг. 19). Для определения роли эффекторных механизмов *in vivo* авторы сравнивали HMB3210 IgG1 с мутантом, в котором отсутствует комплемент и связывание Fc-рецептора (HMB3210-LALA). Два антитела сравнивали в отношении нейтрализующей активности *in vitro*, и было продемонстрировано, что они являются эквивалентными. При сравнении в ограниченных количествах в профилактических условиях (0,12 мг/кг) HMB3210-LALA демонстрировал существенно сниженную эффективность (фиг. 20a). В противоположность этому, при использовании в терапевтических условиях HMB3210-LALA являлся таким же эффективным, как HMB3210 во всех тестируемых дозах (фиг. 20b). Терапевтическая эффективность HMB3210 на модели инфекции PVM, где рибавирин является неэффективным, может быть обусловлена сочетанием факторов, таких как эффективная нейтрализующая и ингибирующая распространение активность, избирательное распознавание белка до слияния, что позволяет избегать расходования антитела содержащимися в избытке белками после слияния, действующими как ловушки, и неспособностью отбирать ускользнувших мутантов. Неожиданно для терапевтической эффективности HMB3210 на модели PVM на мышах не требуются эффекторные функции, подтверждая, что активность антитела *in vivo* обусловлена преимущественно нейтрализацией вируса и ингибированием распространения вируса.

Пример 14. HMB3210 связывается с высококонсервативной бета-цепью в F-белке до слияния, которая является недоступной в F-белке после слияния

Для идентификации эпитопа, распознаваемого HMB3210, авторы проводили скрининг библиотеки из 7095 структурированных пептидов, включающих полную последовательность F-белка RSV человека. Эксперименты, представленные в примере 5, демонстрировали, что HMB3210 взаимодействовало в вестерн-блоттингах с F-белками RSV и MPV в невосстановительных условиях, подтверждая, что HMB3210 направлено на эпитоп, конформация которого является стабильной в присутствии анионного детергента SDS (фигуры 5 и 6). Подход скрининга библиотеки приводил к идентификации предполагаемого эпитопа HMB3210 в N-концевой области F2, включая остатки SAVSKGYLSALRTGWYTSVIT (SEQ ID NO: 63). Коровья последовательность в этой области, YLSALRTGW (SEQ ID NO: 64), является высококонсервативной у RSV, MPV, BRSV и PVM (фиг. 21), где варианты YLSVLRTGW (SEQ ID NO: 65), YF-SALRTGW (SEQ ID NO: 66), YFSVLRTGW (SEQ ID NO: 67), YKSALRTGW (SEQ ID NO: 68) и YKSVLRTGW (SEQ ID NO: 69) также распознаются HMB3210. Эта последовательность не экспонируется на поверхности F-белка RSV после слияния, но в модели F-белка RSV до слияния, выстроенного вокруг структуры F-белка PIV5 (Yin et al., 2006, Nature, 439:38-44), предполагают, что она располагается в экспонируемой бета-цепи вблизи области петли, на которую направлен паливизумаб (фиг. 22). Такое картирование соответствует специфичности HMB3210 в отношении F-белка до слияния, продемонстрированной в примере 10. Этот эпитоп является близким, но отличным от эпитопа, распознаваемого паливизумабом, и сосредоточен вокруг последовательности YLSVLRTGW, которая является высококонсервативной у 551 штаммов вирусов, включая штаммы 364 HRSV, 162 HMPV, 8 BRSV и 5 PVM (фиг. 23).

Таблица последовательностей и номеров SEQ ID

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	а.к. CDRH1	GFTFSSYS
2	а.к. CDRH2	ISASSSYS
3	а.к. CDRH3	ARARATGYSSITPYFDI
4	а.к. CDRL1	SSNIGAGYD
5	а.к. CDRL2	DNN
6	а.к. CDRL3	QSYDRNLGV
7	нуклеотиды CDRH1	ggattcaccttcagtagttatagc
8	нуклеотиды CDRH2	attagtcaagtagcagttacagc
9	нуклеотиды CDRH3	gcgagagctcgggcaactggctacagtccattaccccctactttgacatt
10	нуклеотиды CDRL1	agctccaacatcggggcaggttatgat
11	нуклеотиды CDRL2	gataacaac
12	нуклеотиды CDRL3	cagtcctatgacaggaacctgagtggtgac
13	а.к. тяжелой цепи	EEQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISASSYSYADSAKGRFTISRDNAKTSFLQPM NSLRAEDTAIYFCARARATGYSSITPYFDIWDGQGLTVTVSS
14	а.к. легкой цепи	QSVVTQTPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYDNNRPSGVPRFSASKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDRNLGSVFGTGTQVTVL
15	нуклеотиды тяжелой цепи	gaggaaacagctgctagagctggggaggcctgggtcaagcctgggggctcctgagactctcc tgtgcagcctctggattcaccttcagtagttatagcatgaactgggtccgaggtccaggga ggggctggagtggtctcatccattagtgcaagtagcagttacagcgattacgagactcagcg aaggggcgaattcacctctccagagacaacccaagacctcactgtttgcaaatgaacagcct gagagccgaggacacggctatctattctgtgcgagagctcgggcaactggctacagttccatta ccccctactttgacatttggggcagggaacctgggtcaccgtctcctcag
16	нуклеотиды легкой цепи	cagtcgtgctgacgcagacgcctcagtgctggggcccgaggcagagggtcaccatctcct gcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcaactccagg aacagccccaaactcctcatctatgataacaacaatcgaccctcagggtcccgagcattct ctgcctccaagtctggcactcagcctcctggccatcacgggctccaggctgaggatgagge tgattattactgccagtcctatgacaggaacctgagtggtgtcttcggaactgggaccaagggtcac cgctcctag

17	а.к. тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISASSSYSDYADSAKGRFTISRDNAKTSLFLQM NSLRAEDTAIFYCARARATGYSSITPYFDIWGQGTLTVSS
18	а.к. тяжелой цепи	gaggtgcagctggtgagctctggggaggcctggtaagcctgggggtccctgagactctcc tgtgcagcctctggattcaccttcagtagttatagcatgaactgggtccgaggtccagggaag ggggctggagtggtctcatccattagtgcaagtagcagttacagcgattacgcagactcagcg aaggggcggattcaccatctccagagacaacgccaagacctcactgtttctgcaaatgaacagcct gagagccgaggacacggctatctatttctgtgcgagagctcgggcaactggctacagttccatta ccccctactttgacatttggggcagggaacctggtaaccgtctcctcag
19	а.к. CDRH1	GFAFTGYG
20	а.к. CDRH2	ITAGSSYI
21	а.к. CDRH3	ARVASPLVRGLHLDY
22	а.к. CDRL2	AND
23	а.к. CDRL3	QSYDRTLSTV
24	нуклеотиды CDRH1	ggattcgcattcactgggtatggt
25	нуклеотиды CDRH2	atcactgctggaagctcatacatc
26	нуклеотиды CDRH3	gcgagagttgcgtctcctctggttcggggactccacttagactac
27	нуклеотиды CDRL2	gtaacgac
28	нуклеотиды CDRL3	cagtcctatgaccgcaccctgagtgtagtg
29	а.к. тяжелой цепи	EVHVESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFAFTGYGLNWVRQVP GKGLEWVSSITAGSSYIDYAESVKGRFTISRDNKNTLFLQM SDLRADDTAVYYCARVASPLVRGLHLDYWGQALTVSS
30	а.к. легкой цепи	QSVLTQPPMSGAPGQRTVISTGSSNIGAGYDVQWYQQL PGAAPKLLIYANDNRPSGVPDRFSGSKSGTSGSLVIAGLRAE DEADYYCQSYDRTLSTVVFGGGKLTVL
31	нуклеотиды тяжелой цепи	gaggtgcacctggtgagctctggggaggcctggtaagcctgggggtccctgagactctcc tgtgcagcctctggattcgcattcactgggtatggtctaaattgggtccgaggttcagggaag ggcctggagtggtttcatccatcactgctggaagctcatacatcgactacgcagagtcagtgaa ggggcggattcaccatctccagagacaacggcaagaatacactgtcctgcaaatgagcgacctg agagccgacgacacggctgtctattactgtgcgagagttgcgtctcctctggttcggggactcca cttagactactggggcaggaggacctggtaaccgtctcctcag
32	нуклеотиды легкой цепи	cagtcctgtgctgacgcagccgcctcaatgtccggggcccccagggcagagggtcaccatctcc tgacttggggcagctccaacatcggggcaggttatgatgtcagtggtaccagcaactccag gagcagccccaaactcctcatctatgctaacgacaatcgccctcagggtccctgaccgattc tctggctccaagtctggcacctcaggctccctagtcagctggcctccgggctgaggatgagg ctgattattactgccagtcctatgaccgcacctgagtgtagtggttcggcgaggaggaccaagctg accgtcctgg

33	а.к. тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFTGYGLNWVRQVP GKGLEWVSSITAGSSYIDYAESVKGRFTISRDNKGNTLFLQM SDLRADDTAVYYCARVASPLVRGLHLDYWQQGALVTVSS
34	нуклеотиды тяжелой цепи	gaggtgcagctgggtgagctctggggaggcctggtcaagcctggggggtccctgagactctcc tgtgcagcctctggattcgatcactgggtatggtctaaattgggtccgccagggtccagggaag ggcctggagtggtttcatccatcactgctggaagctcatactgactacgcagagtcagtgaa ggcccgattcaccatctccagagacaacggcaagaatacactgttctgc aaatgagcgacctg agagccgacgacacggctgtctattactgtgcgagagttgcgtctctctggttcggggactcca cttagactactggggccaggagccctggtcaccgtctctcag
35	а.к. CDRL3	QSYDRSLSGV
36	нуклеотиды CDRL3	cagtcctatgacaggagcctgagtggtgc
37	а.к. легкой цепи	QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWHYQQLP GTAPKLLIYDNNNRPSGVPDRFSASKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDRSLSGVFGTGTGKVTVL
38	нуклеотиды легкой цепи	cagtctgtcgtgacgcagccgcctcagtgctctggggcccccagggcagagggtcaccatctct gcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgtactggtaccagcaactccagg aacagccccaaactctcatctatgataacaacaatcgacctcaggggtcccgaccgattct ctgcctccaagtctggcacctcagctccctggccatcaccgggtccaggctgaggatgaggc tgattattactgccagtcctatgacaggagcctgagtggtgtcttcggaactgggaccaaggtcac cgtcctag
39	а.к. CDRH2	ISSSSSYI
40	а.к. CDRH3	ARARATGYNSITPYFDI
41	а.к. CDRL2	GNS
42	а.к. CDRL3	QSYDSSLSGV
43	нуклеотиды CDRH1	ggcttcacattcagctcctactct
44	нуклеотиды CDRH2	atctcaagctcctctagttacatc
45	нуклеотиды CDRH3	ggccgggctagagcaacaggctataacagcattactccttactttgacatc
46	нуклеотиды CDRL1	tcaccaacatcggc
47	нуклеотиды CDRL2	gggaacagc
48	нуклеотиды CDRL3	cagtcctatgattctctctgtctggagtc
49	а.к. тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARARATGYNSITPYFDIHWGQGLVTVSS
50	а.к. легкой цепи	QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWHYQQLP GTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDSSLSGVFGTGTGKVTVL

51	нуклеотиды тяжелой цепи	gagggtgcagctgtgtggagagcggaggcggactgggtcaaacctggcgggtcactgagactgtc atgcgcagcaagcgggttcacattcagctcctactctatgaactgggtgcgacaggctcctggca agggactggagtgggtctctagatctcaagctcctctagttacatctactatgcagactccgtgaa gggaaggtcaccatctcacgcgataacgcaaaaatagcctgtatctgcagatgaattccctga gagccgaagacaccgctgtctactattgcgccgggctagagcaaacaggctataacagcattac tccttactttgacatctggggacagggcacactgggtgaccgtctctca
52	нуклеотиды легкой цепи	cagtcgctgcctcactcagcctccaagcgtcagcggggcacctgggcagcgggtcacaatctcat gcactgggtcctcatccaacatcggcgtgggtacgacgtgcactgggtatcagcagctgcctgg aacagcacctaagctgctgatctacgggaacagcaatcgccatctggagtccccgatagattc agcggatccaaatctggcaccagtgcctcactggctattacagggctgcaggcagaggacgaa gccgattactattgccagctttatgattctctctgtctggagtcttcggcaccggcacaaaagtcac cgtcctg
53	а.к. CDRH3	ARVASPMVRGLHFDY
54	а.к. CDRL3	QSYDSSLVSV
55	нуклеотиды CDRH1	ggctttaccttttagctcctactct
56	нуклеотиды CDRH3	ggccgcgtcgtacgccctatgggtgcgggggctgcattttgattat
57	нуклеотиды CDRL1	tcttcaaacatcggcgctgggtacgac
58	нуклеотиды CDRL3	cagagctacgattcatccctgagcgtggtc
59	а.к. тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARVASPMVRGLHFDYWGQGLTVTVSS
60	а.к. легкой цепи	QSVLTQPPSVSGAPGQVRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYGNSNRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDSSLVSVFGGGTKLTVL
61	нуклеотиды тяжелой цепи	gaagtgacagctgtgtgaatctggggcggggctgggtcaaacctggcgggaagtctgaggctgtcc tgtgtgctagtggtttaccttttagctcctactctatgaactgggtgcgacaggcacctggcaag ggactggagtgggtctctagatctcaagctcctctagttacatctactatgctgactccgtgaagg gccgggtcaccatctcaagagataacgcaaaaatagcctgtatctgcagatgaattccctgagg gcagaagacacagccgtgtactattgcgcccgctcgtacccctatgggtgcggggctgcatt ttgattattggggacagggaactctgtgaccgtctcatcc
62	нуклеотиды легкой цепи	cagagcgtcctgacccagccaccatcctgtagcggcgccacccggccagcagtgactatttcc tgtaccggcagttcttcaaacatcggcgtgggtacgacgtgcactgggtatcagcagctgcctgg aacagcacctaagctgctgatctacgggaacagcaatcgccatctggagtccccgatagattc agcggatccaaatctggcaccagtgcctcactggctattacagggctgcaggcagaggacgaa gccgattactattgccagagctacgattcatccctgagcgtgtcttcggaggcgccacaaaact gactgtcctg
63	а.к.	SAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
64	а.к.	YLSALRTGW
65	а.к.	YLSVLRTGW
66	а.к.	YFSALRTGW
67	а.к.	YFSVLRTGW
68	а.к.	YKSALRTGW
69	а.к.	YKSVLRTGW

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который нейтрализует инфекцию RSV (респираторно-синцитиальный вирус),

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит (i) области, определяющие комплементарность CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; (ii) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно; (iii) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; (iv) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно; (v) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23 соответственно; (vi) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 53 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 54 соответственно; (vii) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 53 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23 соответственно; или (viii) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 54 соответственно.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает F-белок RSV до слияния, но не F-белок после слияния.

3. Антитело по п.1 или 2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нейтрализует инфекцию RSV и группы A, и группы B.

4. Антитело по п.1 или 2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нейтрализует инфекции RSV и MPV (метапневмовирус).

5. Антитело по п.1 или 2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нейтрализует инфекции RSV, MPV и PVM (вирус пневмонии мышей).

6. Антитело по п.1 или 2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывается с F-белком RSV в сайте, который перекрывает антигенный сайт I, антигенный сайт II или антигенный сайт IV.

7. Антитело по п.1 или 2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с каждой из консервативных областей в N-концевом участке F-белка RSV, содержащем любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NOs: 64-69.

8. Антитело по п.1 или 2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необходимая для нейтрализации 50% RSV, составляет 500 нг/мл или меньше.

9. Антитело по п.1 или 2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50;

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

(v) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50;

(vi) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30;

(vii) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30;

(viii) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59, и вариабельную область легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60;

(ix) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30; или

(x) вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60.

10. Антитело по п.1 или 2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (i) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (ii) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (iii) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; (iv) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; (v) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; (vi) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; (vii) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; (viii) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; (ix) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или (x) переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

11. Антитело по одному из предыдущих пунктов или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека, моноклональное антитело, моноклональное антитело человека, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

12. Антитело по одному из предыдущих пунктов или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предназначены для лечения или аттенуирования инфекции RSV или MPV или обеих RSV и MPV.

13. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13, где нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 75% идентична любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NOs: 7-12, 15, 16, 18, 24-28, 31, 32, 34, 43-48, 51-52, 55-58 или 61-62.

15. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.13 или 14.

16. Клетка, экспрессирующая антитело по любому из пп.1-12 или его антигенсвязывающий фрагмент, где клетка содержит экспрессионный вектор по п.15.

17. Фармацевтическая композиция для производства лекарственного средства для лечения или аттенуирования RSV или MPV или обеих RSV и MPV инфекций, содержащая антитело по любому из пп.1-12 или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу нуклеиновой кислоты по п.13 или 14, вектор по п.15 или клетку по п.16, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

18. Фармацевтическая композиция для производства лекарственного средства для лечения или аттенуирования RSV или MPV или обеих RSV и MPV инфекций, содержащая первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антитело является антителом по любому из пп.1-12, и второе антитело нейтрализует RSV или MPV или обе RSV и MPV инфекции.

19. Применение антитела по любому из пп.1-12 или его антигенсвязывающего фрагмента в производстве лекарственного средства для лечения или аттенуирования RSV или MPV или обеих RSV и MPV инфекций.

20. Применение антитела по любому из пп.1-12 или его антигенсвязывающего фрагмента в диагностике RSV или MPV инфекций.

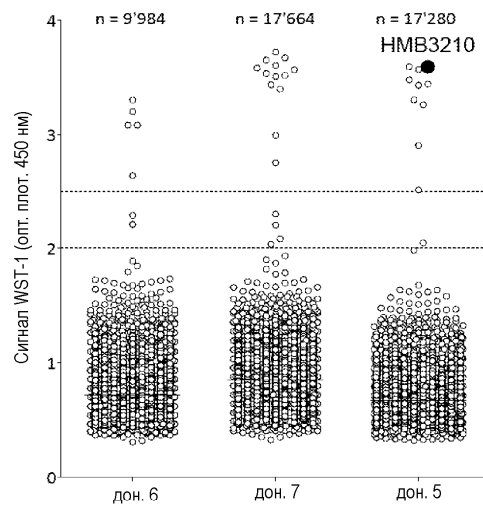
21. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.13 или 14 в производстве лекарственного средства для лечения или аттенуирования RSV или MPV или обеих RSV и MPV инфекций.

22. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.13 или 14 в диагностике RSV или MPV инфекций.

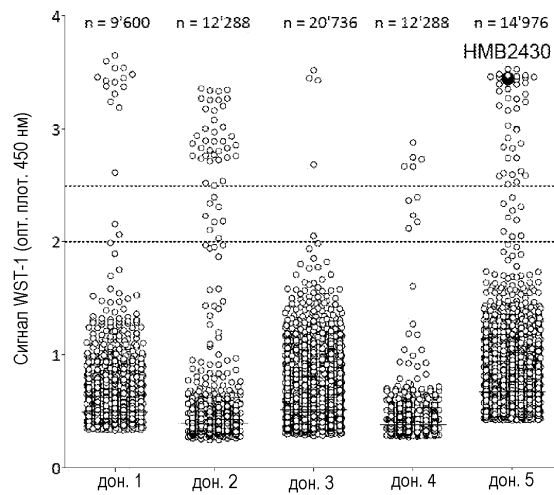
23. Применение антитела по любому из пп.1-12 или его антигенсвязывающего фрагмента для мониторинга качества анти-RSV или анти-MPV вакцин.

24. Способ аттенуирования RSV или MPV инфекции или снижения риска развития инфекции RSV и MPV, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1-12 или его антигенсвязывающего фрагмента.

Первичный скрининг с использованием анализа микронеutralизации MPV

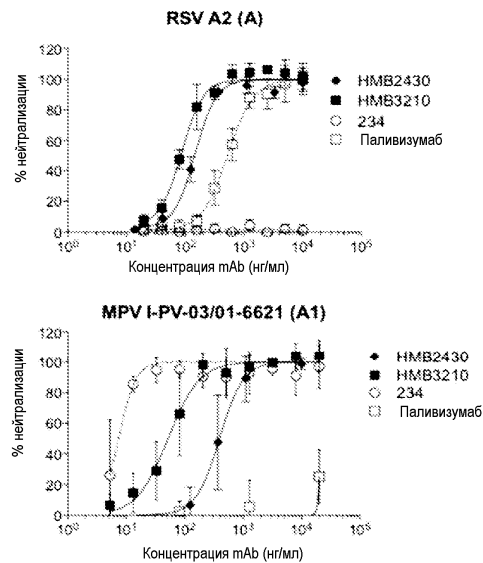


Первичный скрининг с использованием анализа микронеutralизации RSV

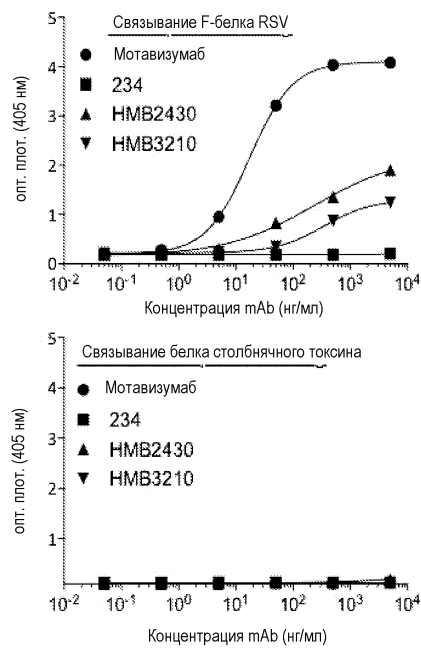


Фиг. 1

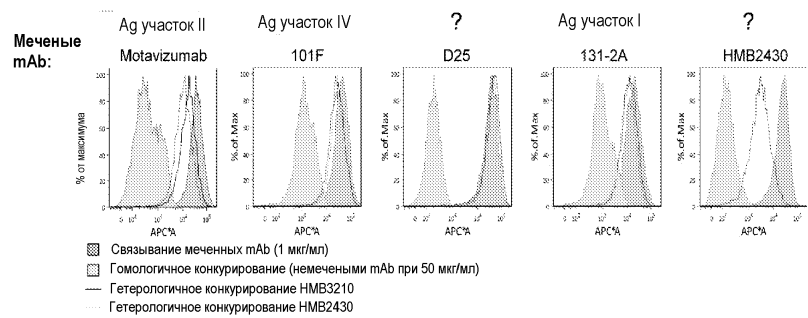
HMB2430 и HMB3210 перекрестно нейтрализуют инфекцию RSV и MPV in vitro



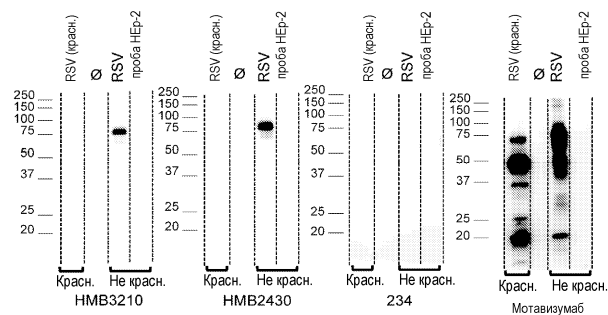
Фиг. 2



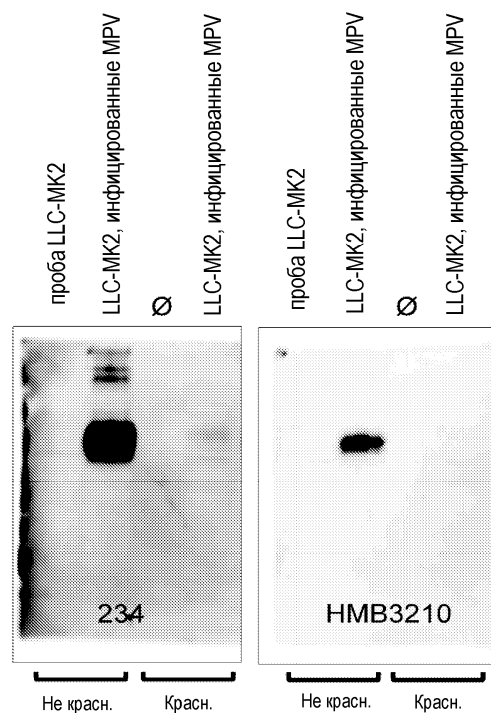
Фиг. 3



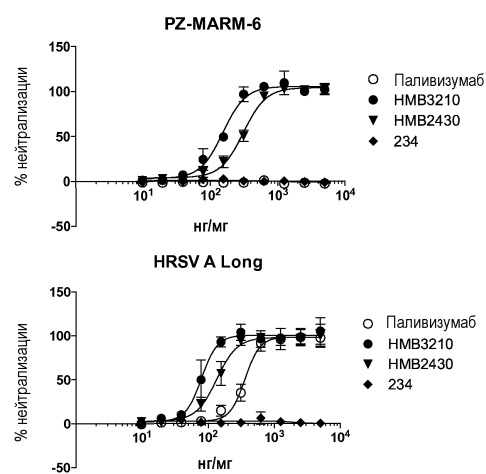
Фиг. 4



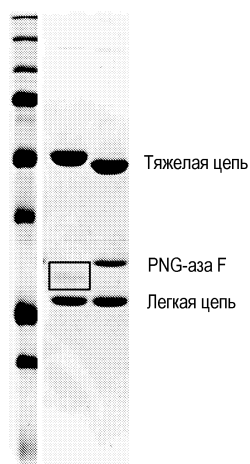
Фиг. 5



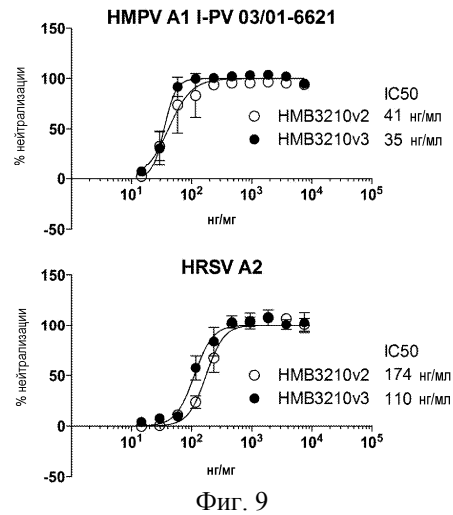
Фиг. 6



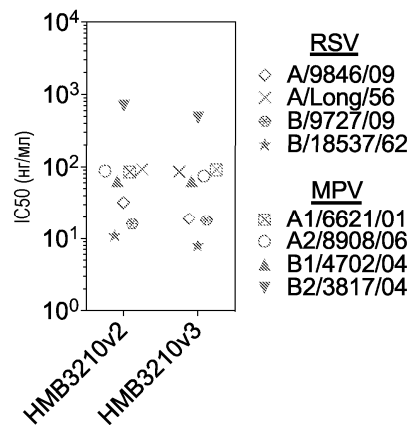
Фиг. 7



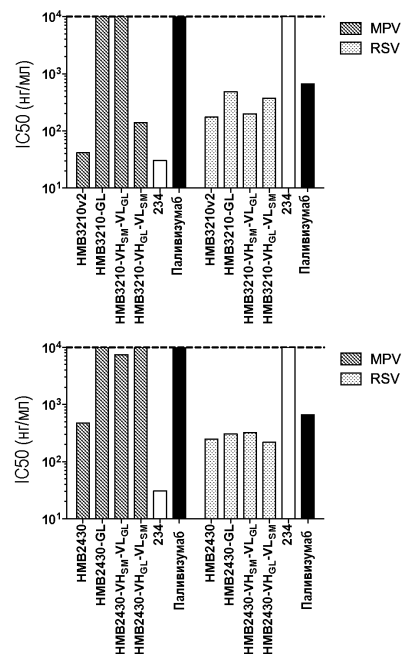
Фиг. 8



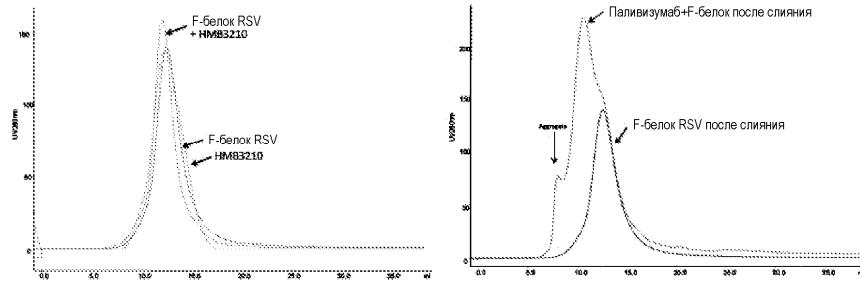
Фиг. 9



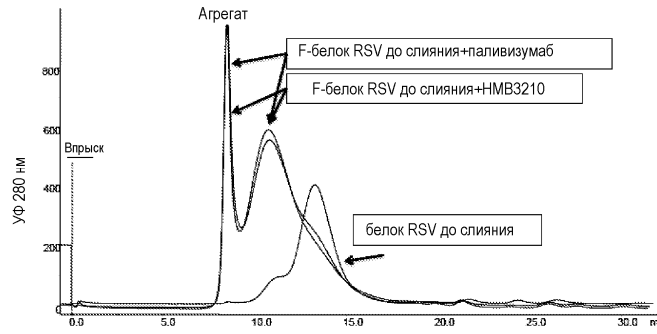
Фиг. 10



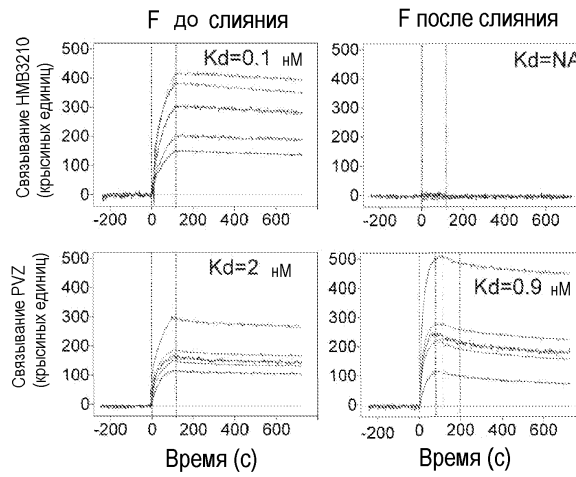
Фиг. 11



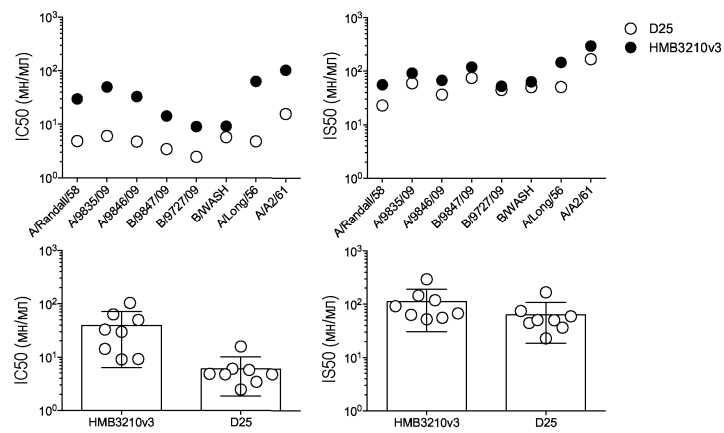
Фиг. 12



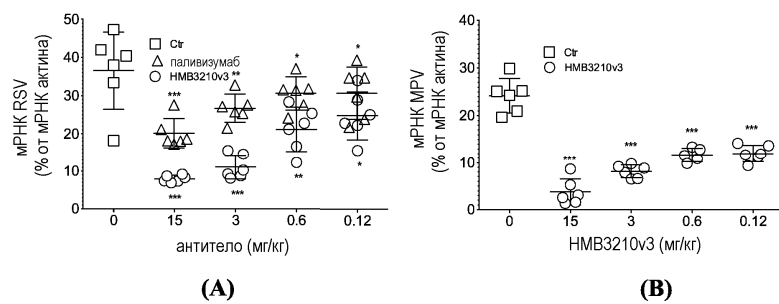
Фиг. 13



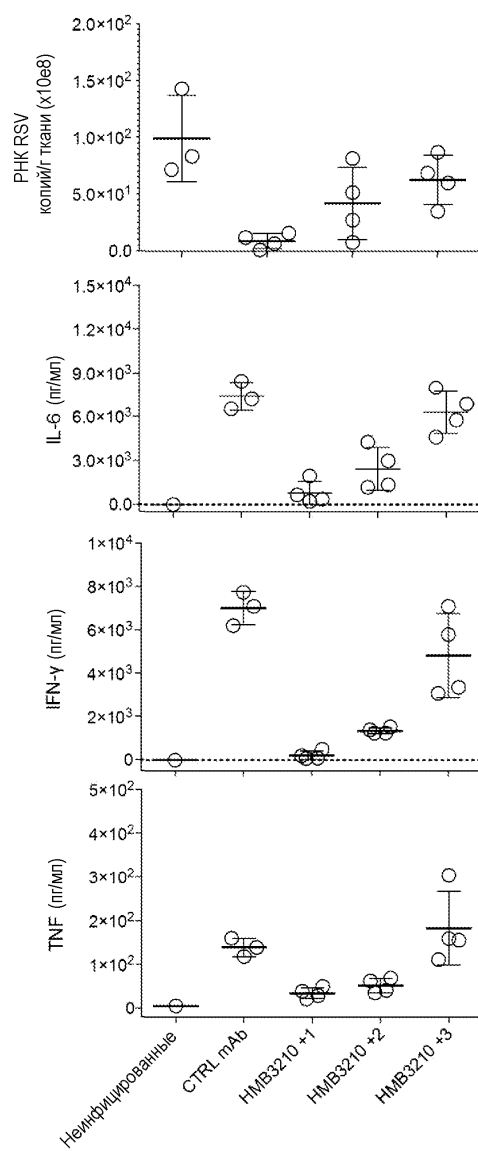
Фиг. 14



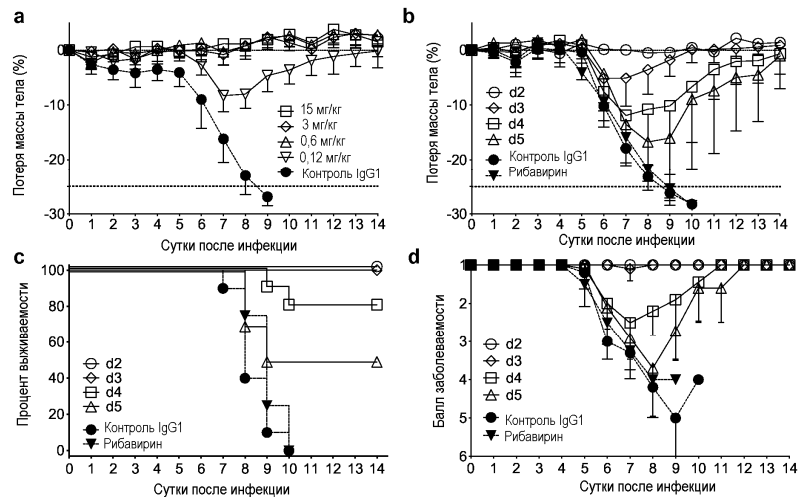
Фиг. 15



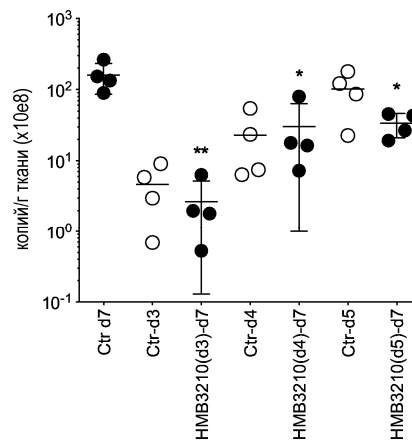
Фиг. 16



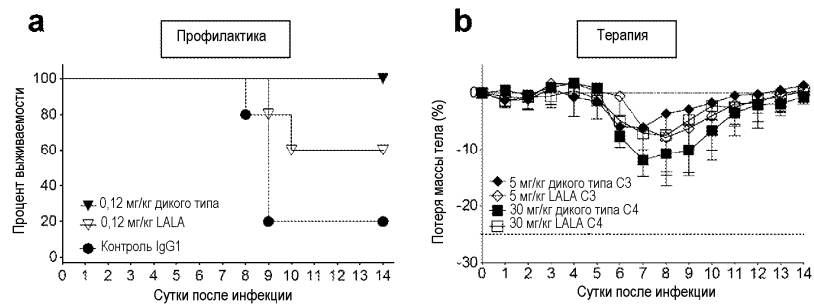
Фиг. 17



Фиг. 18



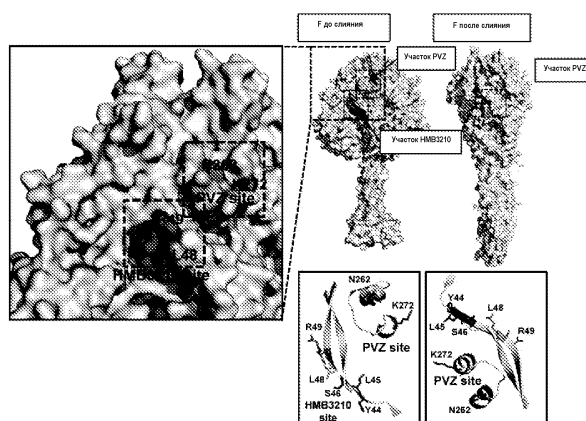
Фиг. 19



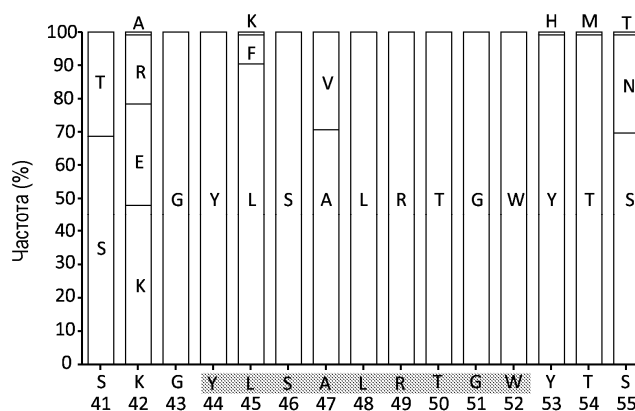
Фиг. 20

RSV	SAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI
BRSV	 R V K .
PVM	. VETA . K HMT . MS . K . . Q .
MPV	. TITE . . . V N . F . L . VGDV
PIV5	IPTNVRQ . MYYTEASSAFIVVKLMPT .

Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

Последовательности для HMB3210

Нуклеотиды VH.1

gaggaacagctgctagagctctgggggaggcctggtcaagcctggggggtccctgagactctcct
 gtgcagcctct**ggattcaccttcagtagttatagc**atgaactgggtccgccaggctccaggga
 ggggctggagtggtctcatcc**attagtgcaagtagcagttacagc**gattacgcagactcagcg
 aagggccgattcaccatctccagagacaacgccaaagcctcactgtttctgcaaatgaacagcc
 tgagagccgaggacacggctatctatttctgt**gcgagagctcgggcaactggctacagttccat**
tacccctactttgacatttggggccagggaacccctgggtaccggtctcctcag

Аминокислоты VH.1

EEQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKGLEWVSS**ISASSSYS**DYADSA
 KGRFTISRDNAKTSLFLQMNSLRAEDTAIYFC**ARARATGYSSITPYFDI**WGQGLTVTVSS

Нуклеотиды VH.2

gaggtgcagctgggtggagctctgggggaggcctggtcaagcctggggggtccctgagactctcct
 gtgcagcctct**ggattcaccttcagtagttatagc**atgaactgggtccgccaggctccaggga
 ggggctggagtggtctcatcc**attagtgcaagtagcagttacagc**gattacgcagactcagcg
 aagggccgattcaccatctccagagacaacgccaaagcctcactgtttctgcaaatgaacagcc
 tgagagccgaggacacggctatctatttctgt**gcgagagctcgggcaactggctacagttccat**
tacccctactttgacatttggggccagggaacccctgggtaccggtctcctcag

Аминокислоты VH.2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKGLEWVSS**ISASSSYS**DYADSA
 KGRFTISRDNAKTSLFLQMNSLRAEDTAIYFC**ARARATGYSSITPYFDI**WGQGLTVTVSS

Фиг. 24A

Последовательности для HMB3210

Нуклеотиды VL

cagtctgtcgtgacgcagacgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcct
gcactgggagc**agctccaacatcggggcaggttatgat**gtacactgggtaccagcaacttccagg
aacagccccaaaactcctcatctat**gataacaaca**aatcgaccctcaggggtcccgacogattc
tctgcctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcaccgggtccaggctgaggatgagg
ctgattattactgc**cagtcctatgacaggaacctgagtggtgtct**tcggaactgggaccaaggt
cacgctcctag

Аминокислоты VL

QSVVTQTPSVSGAPGQRVITISCTGSS**SNIGAGYD**VHWYQQLPGTAPKLLIY**DNNNR**PSGVPDRF
SASKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC**QSYDRNLSGV**FGTGTKVTVL

Нуклеотиды VL.3

cagtctgtcgtgacgcagccgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcct
gcactgggagc**agctccaacatcggggcaggttatgat**gtacactgggtaccagcaacttccagg
aacagccccaaaactcctcatctat**gataacaaca**aatcgaccctcaggggtcccgacogattc
tctgcctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcaccgggtccaggctgaggatgagg
ctgattattactgc**cagtcctatgacaggagcctgagtggtgtct**tcggaactgggaccaaggt
cacgctcctag

Аминокислоты VL.3

QSVVTQPPSVSGAPGQRVITISCTGSS**SNIGAGYD**VHWYQQLPGTAPKLLIY**DNNNR**PSGVPDRF
SASKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC**QSYDRSLSGV**FGTGTKVTVL

Фиг. 24В

Последовательности для HMB3210

VH.3 (VH-GL)

gaggtgcagctggaggagagcggaggcggactgggtcaaacctggcgggtcactgagactgtcat
gcgacgaagc**ggcttcacattcagctcctactct**atgaactgggtgcgacaggtccttggcaa
gggactggagtggtctctagat**atctcaagctcctctagttacatc**tactatgcagactccgtg
aaggaaggttcaccatctcacgcgataacgccaataatagcctgtatctgcagatgaattccc
tgagagccgaagacacgcgtgtctactattgc**gccccgggctagagcaacaggctataacagcat**
tactccttactttgacatctggggacagggcacactggtgaccgtctcctca

VH.3 (VH-GL)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKLEWVSS**ISSSSYI**YYADSV
KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARARATGYN**SIT**PFYDI**WGQTLTVSS

VL.4 (VL-GL)

Cagtccgtcgtcactcagcctccaagcgtcagcggggcacctgggcagcgggtcacatctcat
gcactgggtcc**tcattccaacatcggc**gctgggtacgacgtgcactgggtatcagcagctgcctgg
aacagcacctaagctgctgatctac**gggaacagc**aatcgccatctggagtccccgatagattc
agcggatccaaatctggcaccagtgctcactggctattacagggctgcaggcagaggacgaag
ccgattactattgc**cagtccttatgattcttctctgtctgagtc**ttcggcaccggcacaaaagt
cacgctcctg

VL.4 (VL-GL)

QSVVTQPPSVSGAPGQRVITISCTGSS**SNIGAGYD**VHWYQQLPGTAPKLLIY**GN**SNRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC**QSYDSSL**SGVFGTGTKVTVL

Фиг. 24С

Последовательности для HMB2430

Нуклеотиды VH.1

gaggtgcacctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctggggggtccctgagactctcct
 gtgcagcctct**ggattcgcattcactggttatggt**ctaaattgggtccgccaggttccaggga
 gggcctggagtgggtttcatcc**atcactgctggaagctcatacatc**gactacgcagagtcagtg
 aagggccgattcaccatctccagagacaacggcaagaatacactgttcctgcaaatagagcgacc
 tgagagccgacgacacggctgtctattactgt**gcgagagttgcgtctcctctggttcggggact**
ccacttagactactggggccaggagccctggtcacctgtctcctcag

Аминокислоты VH.1

EVHIVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFAFTGYG**LNWVRQVPGKLEWVSS**ITAGSSYI**DYAESV
 KGRFTISRDNKGNTLFLQMSDLRADDTAVYYC**ARVASPLVRGLHLDY**WGQALVTVSS

Нуклеотиды VH.2

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctggggggtccctgagactctcct
 gtgcagcctct**ggattcgcattcactggttatggt**ctaaattgggtccgccaggttccaggga
 gggcctggagtgggtttcatcc**atcactgctggaagctcatacatc**gactacgcagagtcagtg
 aagggccgattcaccatctccagagacaacggcaagaatacactgttcctgcaaatagagcgacc
 tgagagccgacgacacggctgtctattactgt**gcgagagttgcgtctcctctggttcggggact**
ccacttagactactggggccaggagccctggtcacctgtctcctcag

Аминокислоты VH.2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFAFTGYG**LNWVRQVPGKLEWVSS**ITAGSSYI**DYAESV
 KGRFTISRDNKGNTLFLQMSDLRADDTAVYYC**ARVASPLVRGLHLDY**WGQALVTVSS

Фиг. 25А

Последовательности для HMB2430

Нуклеотиды VL

cagtctgtgctgacgcagccgccctcaatgtccggggcccccagggcagagggtcaccatctcct
gcactgggggc**agctccaacatcggggcaggttatgat**gtgcagtggtaccagcaacttccagg
agcagccccaaactcctcatctat**gctaacgaca**aatcggccctcaggggtccctgaccgattc
tctggctccaagtctggcacctcaggtccctagtcacgcctggcctccgggctgaggatgagg
ctgattattactgc**cagtcctatgaccgcaccctgagtgtagtg**ttcggcggagggaccaagct
gaccgtcctgg

Аминокислоты VL

QSVLTQPPMSGAPGQRVTISCTGSS**SNIGAGYD**VQWYQQLPGAAPKLLIY**AND**NRPSGVPDRF
SGSKSGTSGSLVIAGLRAEDEADYYC**QSYDRTL**SVVFSGGGLTLTVL

Нуклеотиды VH.3 (VH-GL)

gaagtgcagctggtggaatctggggcgggctggtcaaacctggcgggaagtctgaggtgtcct
gtgctgctagt**ggctttacctttagctcctactct**atgaactgggtgcgacaggcacctggcaa
gggactggagtggtctctagt**atctcaagctcctctagttacatc**tactatgctgactccgtg
aagggccggttcaccatctcaagagataacgcaaaaaatagcctgtatctgcagatgaattccc
tgagggcagaagacacagccgtgtactattgc**gcccgcgtcgtcagccctatgggtcgggggct**
gcattttgattattggggacagggaactctggtgaccgtctcatcc

Аминокислоты VH.3 (VH-GL)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKLEWVSS**ISSSSSYI**YYADSV
KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARVASPMVRGLHFDY**WGQGLTVTVSS

Нуклеотиды VL.2 (VL-GL)

CAGAGCGTCCTGACCCAGCCACCATCCGTGAGCGGCGCACCCGGCCAGCGAGTGACTATTTCTT
GTACCGGCAGT**TCTTCAAACATCGGCGCTGGGTACGAC**GTGCACTGGTATCAGCAGCTGCCTGG
AACAGCACCTAAGCTGCTGATCTAC**GGGAACAGCA**ATCGGCCATCTGGAGTCCCCGATAGATT
AGCGGATCCAAATCTGGCACCAGTGCTCACTGGCTATTACAGGGCTGCAGGCAGAGGACGAAG
CCGATTACTATTGC**CAGAGCTACGATT**CATCCCTGAGCGTGGTCTTCGGAGGCGGCACAAACT
GACTGTCTTG

Аминокислоты VL.2 (VL-GL)

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSS**SNIGAGYD**VHWHYQQLPGTAPKLLIY**GNS**NRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC**QSYDSSL**SVVFSGGGLTLTVL

Фиг. 25B



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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