



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.07**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**202090559**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.08.31**

**(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ЭПИТОПОВ ВИРУСА ЗИКА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

**(31)** РСТ/ЕР2017/071891

**(32)** 2017.08.31

**(33)** ЕР

**(43)** 2020.06.17

**(86)** РСТ/ЕР2018/073489

**(87)** WO 2019/043166 2019.03.07

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ХУМАБС БИОМЕД СА (СН)**

**(72)** Изобретатель:  
**Корти Давиде (СН)**

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

**(56)** WANG JIAQI ET AL.: "A Human Bi-specific Antibody against Zika Virus with High Therapeutic Potential", CELL, vol. 171, no. 1, 21 September 2017 (2017-09-21), pages 229-e15, XP002776943, DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.002, the whole document

GIOVANNA BARBA-SPAETH ET AL.: "Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization", NATURE, vol. 536, no. 7614, 23 June 2016 (2016-06-23), pages 48-53, XP055328133, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature18938, the whole document

ANONYMOUS: "Zika virus antigens and antibodies", INTERNET CITATION, 7 March 2017 (2017-03-07), pages 1-3, XP002767868, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.amsbio.com/zika-virus-antigens-antibodies.aspx>[retrieved on 2017-03-07], the whole document

ANONYMOUS: "C01864M Data Sheet", INTERNET CITATION, 3 May 2016 (2016-05-03), XP002767869, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.amsbio.com/datasheets/C01864M-1.pdf>[retrieved on 2017-03-07], the whole document

ANONYMOUS: "C01865M Datasheet", INTERNET CITATION, 23 June 2016 (2016-06-23), XP002767870, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.amsbio.com/datasheets/C01865M-1.pdf>[retrieved on 2016-03-07], the whole document

www.amsbio.com/datasheets/C01865M-1.pdf[retrieved on 2016-03-07], the whole document

ANONYMOUS: "C01866M Datasheet", INTERNET CITATION, 26 April 2016 (2016-04-26), XP002767871, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.amsbio.com/datasheets/C01866M-1.pdf>[retrieved on 2017-03-07], the whole document

K. STETTLER ET AL.: "Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection", SCIENCE, vol. 353, no. 6301, 19 August 2016 (2016-08-19), pages 823-826, XP055352097, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aaf8505, the whole document

ANONYMOUS: "Choose the best ZIKA virus antibodies", INTERNET CITATION, 7 March 2017 (2017-03-07), pages 1-5, XP002767866, Retrieved from the Internet: URL: [https://www.arigobio.com/news/view/Zika\\_Virus](https://www.arigobio.com/news/view/Zika_Virus)[retrieved on 2017-03-07], the whole document

GOPAL SAPPARAPU ET AL.: "Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice", NATURE, vol. 540, no. 7633, 7 November 2016 (2016-11-07), pages 443-447, XP055412748, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature20564, the whole document

J. A. SWANSTROM ET AL.: "ABSTRACT", MBO, vol. 7, no. 4, 19 July 2016 (2016-07-19), pages e01123-16, XP055436611, DOI: 10.1128/mBio.01123-16, the whole document

WILLIS ELINOR ET AL.: "Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies", VIROLOGY, vol. 508, 2 May 2017 (2017-05-02), pages 1-6, XP085068375, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/J.VIROL.2017.04.031, the whole document

DIOGO M. MAGNANI ET AL.: "A human inferred germline antibody binds to an immunodominant epitope and neutralizes Zika virus", PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, vol. 11, no. 6, E0005655, 12 June 2017 (2017-06-12), pages 1-17, XP055435535, DOI: 10.1371/journal.pntd.0005655, the whole document

LEI YU ET AL.: "Delineating antibody recognition against Zika virus during natural infection", JCI INSIGHT, vol. 2, no. 12, 15 June 2017 (2017-06-15), XP055387424, DOI: 10.1172/jci.insight.93042, the whole document

ZHAO HAIYAN ET AL.: "Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection", CELL, vol. 166, no. 4, 27 July 2016 (2016-07-27), pages 1016-1027, XP029682895, CELL PRESS, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2016.07.020, the whole document

WU CHENGBIN ET AL.: "Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin", NATURE BIOTECHNOLOGY

- 
- (57) Изобретение относится к мультиспецифическим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с определенными эпитопами вируса Зика и эффективно нейтрализуют инфекцию ZIKV. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют такие антитела и фрагменты антител. Кроме того, изобретение относится к применению антител и фрагментов антител по изобретению для профилактики и лечения инфекции ZIKV.

043940 B1

043940 B1

Изобретение относится к мультиспецифическим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с различными эпитопами вируса Зика (ZIKV). Такие антитела эффективно нейтрализуют инфекцию вируса Зика (ZIKV) и минимизируют или прекращают образование вакцин-ускользающих мутантов вируса Зика. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют такие антитела и фрагменты антител. Изобретение также относится к применению антител и фрагментов антител по настоящему изобретению для профилактики и лечения инфекции ZIKV.

Вирус Зика (ZIKV) относится к флавивирусам, переносится комарами и представляет угрозу для общественного здравоохранения. Впервые ZIKV был выделен из макак в 1947 году в лесу Зика в Уганде (Dick G.W.A. с соавт., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 1952, 509-520) и первая инфекция у человека была описана в Нигерии в 1954 году (Macnamara F.N., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 1954, 139-145). С тех пор инфекции ZIKV периодически регистрировали в Африке и Юго-Восточной Азии (Musso D., Cao-Lormeau V.-M., Gubler D. J., *The Lancet.* 386, 2015, 243-244), а эпидемии были отмечены в Макронезии в 2007 году (Duffy M.R. с соавт., *N Engl J Med.* 360, 2009, 2536-2543) и Французской Полинезии в 2013-2014 годах, с последующим распространением вируса в другие страны Океании (Cao-Lormeau V.-M., Musso D. *Lancet.* 384, 2014, 1571-1572); Musso D., Nilles E. J., Cao-Lormeau V.-M. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 2014, 0595-6). После своего появления в Бразилии в 2015 году ZIKV быстро распространился, и в феврале 2016 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в связи с его распространением объявила о чрезвычайной ситуации в области здравоохранения, имеющей международное значение (Baden L.R. с соавт. *N. Engl. J. Med.* 374, 2016, 1552-1563; Fauci A.S., Morens D.M. *N Engl J Med*, 160113142101009, 2016; Neumann D.L. с соавт. *Lancet.* 387, 2016, 719-721). Основное распространение инфекции ZIKV происходит через укусы комаров *Aedes*, но этот вирус также может распространяться половым путем (Musso D. с соавт. *Emerg Infect Dis.* 21, 2015, 359-361) и передаваться вертикально (от родителей детям) (Mlakar J. с соавт. *N Engl J Med.* 374, 2016, 951-958). Хотя большинство инфекций ZIKV бессимптомны или симптомы проявляются в легкой форме, есть свидетельства того, что инфекция ZIKV может вызвать неврологические осложнения, например синдром Гийена-Барре у взрослых (Cao-Lormeau V.-M. с соавт. *Lancet.* 0, 2016, doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6) и врожденные дефекты, включая микроцефалию у развивающегося плода (Calvet G. с соавт. *Lancet Infect Dis* 2016, doi:10.1016/s1473-3099(16)00095-5; Mlakar J. с соавт. *N Engl J Med.* 374, 2016, 951-958; Rubin E. J. с соавт. *N Engl J Med* 2016, doi:10.1056/NEJMe1601862), вероятно, благодаря своей способности инфицировать нейрональные клетки-предшественники человека (Tang H. с соавт. *Stem Cell*, 2016, 1-5).

ZIKV принадлежит к роду *Flavivirus*, к которому также относят вирус Западного Нила, вирус денге, вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки и несколько других вирусов, которые могут вызывать энцефалит. Флавивирусы имеют оболочку икосаэдрической или сферической формы. Диаметр около 50 нм. Геномы являются позитивно-полярными линейными нитями РНК и несегментированы, около 10-11 т.о. в длину. Геном флавивирусов кодирует 3 структурных белка (капсид, ргМ и оболочку) и 8 неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 и NS5B).

Хотя белки оболочки флавивирусов (E - envelope) опосредуют слияние и являются основной мишенью нейтрализующих антител, неструктурный белок 1 (NS1) секретируется инфицированными клетками и участвует в уклонении от иммунитета и в патогенезе (Muller D.A., Young P.R. *Antiviral Res.* 98, 2013, 192-208). Два недавних структурных исследования показали высокий уровень структурного сходства между белком E вируса ZIKV и этим же белком других флавивирусов, например, вируса денге (DENV), вируса желтой лихорадки (YFV) и вируса Западного Нила (WNV), но с другой стороны выявили уникальные свойства, которые могут быть связаны с нейротропизмом ZIKV (Dai L. с соавт., *Cell Host Microbe* (2016), doi:10.1016/j.chom.2016.04.013; Sirohi D. с соавт., *Science*, aaf5316 (2016). Аналогичным образом, структурный анализ NS1 вируса ZIKV выявил консервативные признаки NS1 других флавивирусов, хотя и с различными электростатическими свойствами (Kim J., 1-6 (2016)).

Феноменом, который характерен для некоторых флавивирусов, является усиливающая болезнь активность перекрестно-реактивных антител, вызванных предыдущей инфекцией гетерологичными вирусами. В случае вируса денге (DENV), у которого известны 4 серотипа, имеются эпидемиологические данные, свидетельствующие о том, что первичная инфекция защищает от повторного заражения тем же серотипом, но представляет собой фактор риска развития тяжелого заболевания при повторном заражении другим серотипом (Halstead S.B., *Microbiol Spectr.* 2, 2014, 249-271). Обостренное заболевание вызывается E и ргМ-специфическими антителами, которые не способны нейтрализовать поступающий вирус, но вместо этого усиливают его захват клетками, экспрессирующими рецептор Fc (FcR +), что приводит к усиленной репликации вируса и активации перекрестно-реактивных Т-клеток памяти. Возникающий цитокиновый шторм предположительно является основой самой тяжелой формы болезни, известной как геморрагическая лихорадка денге/синдром шока денге (Halstead S.B., *Adv Virus Res.* 60, 2003, 421-467; Screaton G., Mongkolsapaya J., Yasoub S., Roberts C. *Nat Rev Immunol.* 15, 2015, 745-759). Роль антител при тяжелой форме денге подтверждается исследованиями, показывающими, что снижение уровня материнских антител у детей представляет повышенный риск развития тяжелой формы денге (Halstead S.B., *Adv Virus Res.* 60, 2003, 421-467; Halstead S.B. с соавт., *Emerging Infect Dis.* 8, 2002, 1474-1479); Nguyen

T.H. с соавт., J Infect Dis. 189, 2004, 221-232; Rothman A.L., J Clin Invest. 113, 2004, 946-951).

Ранее было показано, что большинство антител, которые реагировали на белок оболочки DENV, также связывались с ZIKV, но те, которые распознают большой линейный эпитоп петли слияния (linear fusion-loop epitope - FLE), не нейтрализовали ZIKV и вместо этого способствовали антителозависимому усилению (ADE) инфекции ZIKV (Dejnirattisai W., Nat Immunol. 2016 г., 23 июня, doi: 10.1038/ni.3515. [публикация в интернете до выхода в печати]).

Кроме того, организмы с высоким уровнем мутирования, например, различные вирусы, например, вирус Зика, часто используют так называемое "избавление за счет мутаций" в качестве механизма, позволяющего избежать разрушения клетками-хозяевами. А именно, вирус может защищаться от иммунных реакций хозяина, за счет мутаций в своем геноме и фенотипе ("избавление за счет мутаций"). Соответственно, выработка мутаций избавления (то есть появление вирусов, несущих мутации избавления) может снизить эффективность лекарственных препаратов антител.

Ввиду вышеизложенного, задача, решаемая в настоящем изобретении, заключается в разработке мультиспецифических антител, которые могут нейтрализовать вирус Зика (ZIKV). Такие антитела не способствуют предпочтительному антителозависимому усилению (ADE) инфекции вирусом Зика. Также целью настоящего изобретения является предоставление высокоспецифичных анти-ZIKV-антител, устраняющих или минимизирующих возникновение мутантов ZIKV, защищающихся за счет мутаций.

Решение задачи, лежащее в основе настоящего изобретения, приводится в формуле изобретения.

Хотя настоящее изобретение подробно описано ниже, следует учитывать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методологиями, протоколами и реагентами, описанными в данном описании, поскольку их можно варьировать. Также следует учитывать, что используемая в настоящем изобретении терминология не предназначена для ограничения рамок охвата настоящего изобретения, ограничиваемого только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном изобретении, имеют те же значения, которые применяют специалисты в данной области.

Ниже приводят описание элементов настоящего изобретения. Эти элементы перечислены при описании некоторых конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, однако следует учитывать, что их можно комбинировать каким-либо образом и в каком-либо количестве для создания дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Различные описанные примеры и предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения не должны истолковываться как ограничивающие настоящее изобретение только приведенными вариантами его осуществления. Это описание следует рассматривать как поддерживающее и охватывающее варианты осуществления настоящего изобретения, которые объединяют конкретные варианты осуществления с каким-либо количеством описанных и/или предпочтительных элементов. Кроме того, какие-либо перестановки и комбинации всех описанных элементов в изобретении должны рассматриваться как раскрытые в описании настоящего изобретения, если из контекста не следует иное.

В настоящем описании и в приводимой ниже формуле изобретения, если из контекста не следует иное, понятие "содержит", а также понятия "включает" и "содержащее", означает включение определенного объекта, целого числа или стадии, но не исключает какие-либо другие объекты, целые числа или стадии. Понятие "состоит из" означает конкретно понятие "содержит" и исключает какой-либо неуказанный элемент, целое число или стадию. В контексте настоящего изобретения понятие "включает" охватывает понятие "состоит из". Таким образом, понятие "содержащий" охватывает понятие "включающий", а также "состоящий", например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может включать в себя что-то дополнительное, например, X + Y.

В контексте настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) может подразумеваться как единственное, так и множественное число объектов, если не указано иное или нет явного противоречия контексту. Перечисление диапазонов величин в настоящем изобретении предназначено для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, находящееся в диапазоне. Если в настоящем изобретении не указано иначе, каждое отдельное значение включают в описание так, как если бы оно было отдельно в нем указано. Язык изложения в настоящем описании не должен истолковываться как указывающий на какой-либо незаявленный элемент, существенный для практического применения изобретения.

Понятие "по существу" не исключает понятия "полностью", например, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может быть полностью свободна от Y. При необходимости слово "по существу" может быть опущено из описания настоящего изобретения.

Понятие "примерно" применительно к численному выражению  $\times$  означает  $\pm 10\%$ .

Понятие "заболевание" в контексте настоящего изобретения является синонимом и используется взаимозаменяемо с понятиями "расстройство" и "состояние" (состояние здоровья), поскольку все они отражают ненормальное состояние организма человека или животного или какой-либо из его частей, приводящее к нарушению функционирования, которое обычно проявляется в изменении признаков и симптомов и приводит к тому, что у человека или животного снижается продолжительность или качество жизни.

В настоящем изобретении упоминание понятия "лечение" субъекта или пациента включает профилактику, ослабление проявления заболевания, улучшение и терапию. Понятия "субъект" или "пациент" применяются в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения всех млекопитающих, включая людей. К субъектам, например, относят людей, коров, собак, кошек, лошадей, коз, овец, свиней и кроликов. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения пациентом является человеком.

В настоящем изобретении понятия "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент" и "фрагмент антитела" используют взаимозаменяемо для обозначения какого-либо фрагмента антитела по настоящему изобретению, который сохраняет антигенсвязывающую активность антитела. Примеры фрагментов антител включают, но ими не ограничиваются, одноцепочечные антитела, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или scFv. Кроме того, понятие "антитело" в контексте настоящего описания включает как антитело, так и их антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящем изобретении понятие "антитело" охватывает различные формы антител, включая, но ими не ограничиваясь, целые антитела, фрагменты антител, в частности антигенсвязывающие фрагменты, антитела человека, химерные антитела, гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела и генно-инженерные антитела (варианты или мутантные антитела) до тех пор, пока сохраняются характерные свойства согласно настоящему изобретению. Моноклональные антитела являются предпочтительными и особенно предпочтительными являются моноклональные антитела с CDR человека или переменными областями человека. В частности, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются производными антител человека (то есть они содержат CDR и/или переменные области антител человека). Более предпочтительно, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, по настоящему изобретению также содержат константные области антител человека. Наиболее предпочтительно все константные и переменные области антител или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением имеют происхождение от человека, то есть константные и переменные области человека, такие как константные и переменные области антитела человека.

Антитела человека хорошо известны специалистам в данной области (van Dijk M.A., van de Winkel J.G., *Surf. Opin. Chem. Biol.* 5, 2001, 368-374). Антитела человека могут также вырабатываться у трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации вырабатывать полный спектр или отбирать антитела человека при отсутствии выработки эндогенного иммуноглобулина. Перенос массива генов иммуноглобулина зародышевой линии человека в зародышевую линию таких мутантных мышей приводит к выработке антител человека при заражении антигеном (см., например, Jakobovits A. с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, 2551-2555; Jakobovits A. с соавт., *Nature* 362, 1993, 255-258; Bruggermann M. с соавт., *Year Immunol.* 7, 1993, 3340). Антитела человека также могут вырабатываться в библиотеках фагового дисплея (Hoogenboom H.R., Winter G., *J. Mol. Biol.* 227, 1992, 381-388; Marks J. D. с соавт., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, 581-597). Методы Cole с соавт. и Voernig с соавт. также могут использоваться для получения моноклональных антител человека (Cole с соавт., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, с. 77, 1985; Voernig P. с соавт., *J. Immunol.* 147, 1991, 86-95). Предпочтительно моноклональные антитела человека получают с использованием улучшенной иммортализации клеток EBV-B, как описано в публикации Traggiai E. с соавт., *Nat Med.* 10(8), 2004, 871-875. В контексте настоящего изобретения понятие "антитело человека" также охватывает модифицированные антитела, например, в переменной области или константной области, которые проявляют свойства по настоящему изобретению.

Антитела по настоящему изобретению могут относиться к какому-либо изотипу (например, IgA, IgG, IgM, т.е. тяжелая цепь  $\alpha$ ,  $\gamma$  или  $\mu$ ), но предпочтительно к IgG. В рамках изотипа IgG антитела могут быть из подклассов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, причем подкласс IgG1 является предпочтительным. Антитела по настоящему изобретению могут иметь к или  $\lambda$  легкую цепь.

Антитело по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть очищенным антителом или одноцепочечным антителом, например, биспецифичным одноцепочечным фрагментом Fv(scFv).

Изобретение также предусматривает фрагменты антител по настоящему изобретению, в частности фрагменты, которые сохраняют антигенсвязывающую активность антител. Хотя описание настоящего изобретения, включающее формулу изобретения, может в некоторых местах явно относиться к антигенсвязывающему фрагменту (фрагментам), фрагменту (фрагментам) антитела, варианту (вариантам) и/или производному (производным) антител, подразумевается, что понятие "антитело" или "антитело по настоящему изобретению" включает все категории антител, а именно антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты), фрагмент (фрагменты) антител, вариант (варианты) и производное (производные) антител. Фрагменты антител по настоящему изобретению могут быть получены из антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщеплением дисульфидных связей путем химического восстановления. Альтернативно, фрагменты антител могут быть получены путем клонирования и экспрессии части последовательностей тяжелых или легких цепей. Например, изобретение включает биспецифичный scFv, содержащий CDR из антитела по настоящему изобретению.

Фрагменты антител по настоящему изобретению могут придавать одновалентные или многовалентные взаимодействия и могут содержаться в различных структурах. Например, молекулы scFv могут быть синтезированы для создания трехвалентного "триантитела" или четырехвалентного "тетраантитела". Молекулы scFv могут включать домен области Fc, что приводит к образованию двухвалентных миниантител.

Антитела по настоящему изобретению могут быть предусмотрены в очищенной форме. Обычно антитело бывает в составе композиции, которая, по существу, не содержит других полипептидов, например, других полипептидов в композиции менее 90% (по массе), обычно менее 60 и наиболее часто менее 50%.

Антитела по настоящему изобретению могут быть иммуногенными в организмах-хозяевах у людей и/или других видов (гетерологичных), например у мышей. Например, антитела могут иметь идиотоп, который является иммуногенным для хозяев, не для людей, но не для организма человека-хозяина. Антитела по настоящему изобретению для использования человеком включают антитела, которые не могут быть легко выделены из хозяев, таких как мыши, козы, кролики, крысы, млекопитающие, не являющиеся приматами, и т.д., и обычно не могут быть получены гуманизацией или от ксено-мышей.

В контексте настоящего изобретения понятие "нейтрализующее антитело" означает антитело, которое может нейтрализовать, то есть предотвращать, ингибировать, уменьшать или препятствовать способности патогена инициировать и/или сохранять инфекцию у хозяина. Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. Эти антитела могут быть использованы по отдельности или в комбинации, в качестве профилактических или терапевтических агентов при подходящем составе, в сочетании с активной вакцинацией, в качестве диагностического инструмента или в качестве производственного инструмента, как описано в настоящем изобретении.

Дозы часто разрабатывают с учетом массы тела. Например, доза, выраженная в [г, мг или другой единице]/кг (или г, мг и т.д.) обычно относится к [г, мг или другой единице] "на кг (или г, мг и т.д.) массы тела", даже если понятие "масса тела" точно не указывается.

Понятие "специфически связывающий" и аналогичная ссылка не включают неспецифическое прилипание.

В контексте настоящего изобретения понятие "вакцина" обычно означает профилактический или терапевтический материал, обеспечивающий, по меньшей мере, один антиген, предпочтительно иммуноген. Антиген или иммуноген могут быть получены из какого-либо материала, который подходит для вакцинации. Например, антиген или иммуноген могут быть получены из патогена, такого как бактерии или частицы вируса и т.д., или из опухоли или раковой ткани. Антиген или иммуноген стимулирует адаптивную иммунную систему организма для обеспечения адаптивного иммунного ответа. В частности, "антиген" или "иммуноген" обычно обозначают вещество, которое может распознаваться иммунной системой, предпочтительно адаптивной иммунной системой, и которое способно вызывать антиген-специфический иммунный ответ, например, путем образования антител и/или антиген-специфических Т-клеток как части адаптивного иммунного ответа. Обычно, антиген может быть, или может включать, пептид или белок, который может быть презентирован главным комплексом гистосовместимости (ГКГС) Т-клеткам.

В контексте настоящего изобретения понятие "вариант последовательности" (также просто "вариант") относится к какому-либо изменению в эталонной последовательности, в результате чего исходная последовательность представляет какую-либо из последовательностей, перечисленных в разделе "Таблицы последовательностей и номера SEQ ID NO" (перечень последовательностей), т.е. из последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 273. Таким образом, понятие "вариант последовательности" включает варианты нуклеотидной последовательности и варианты аминокислотной последовательности. Следует отметить, что варианты последовательности, упоминаемые в настоящем изобретении, являются, в частности, функциональными вариантами последовательности, то есть вариантами последовательности, поддерживающими биологическую функцию, например, антитела. В контексте настоящего изобретения такой поддерживаемой биологической функцией предпочтительно является нейтрализация инфекции ZIKV и/или связывание антитела с ZIKV E белком. Таким образом, предпочтительные варианты последовательности представляют собой такие функциональные варианты последовательности, которые, по меньшей мере, на 70, по меньшей мере, на 75, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85, по меньшей мере, на 88, по меньшей мере, на 90, по меньшей мере, на 92, по меньшей мере, на 95, по меньшей мере, на 96, по меньшей мере, на 97, по меньшей мере, на 98 или по меньшей мере, на 99% идентичны исходной последовательности.

Таким образом, предпочтительные варианты последовательности представляют собой функциональные варианты последовательности, которые, по меньшей мере, на 70, по меньшей мере, на 75, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85, по меньшей мере, на 88, по меньшей мере, на 90, по меньшей мере, на 92, по меньшей мере, на 95, по меньшей мере, на 96, по меньшей мере, на 97, по меньшей мере, на 98 или по меньшей мере, на 99% идентичны исходной последовательности.

В настоящем изобретении выражение "функциональный вариант последовательности, который

идентичен исходной последовательности, по меньшей мере, на 70, по меньшей мере, на 75, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85, по меньшей мере, на 88, по меньшей мере, на 90, по меньшей мере, на 92, по меньшей мере, на 95, по меньшей мере, на 96, по меньшей мере, на 97, по меньшей мере, на 98 или по меньшей мере, на 99%" означает, что (i) вариант последовательности является функциональным, согласно описанному в настоящем изобретении, и (ii) чем выше процент идентичности последовательности, тем более предпочтителен такой вариант последовательности. Иначе говоря, выражение "функциональный вариант последовательности, который идентичен исходной последовательности, по меньшей мере, на 70, по меньшей мере, на 75, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85, по меньшей мере, на 88, по меньшей мере, на 90, по меньшей мере, на 92, по меньшей мере, на 95, по меньшей мере, на 96, по меньшей мере, на 97, по меньшей мере, на 98 или по меньшей мере, на 99%" означает, в частности, что функциональный вариант последовательности по отношению к исходной последовательности идентичен, по меньшей мере, на 70, предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 75, предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 80, более предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 85, более предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 88, еще более предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 90, еще более предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 92, и еще более предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 95, и еще более предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 96, особенно предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 97, особенно предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 98, и наиболее предпочтительно идентичен, по меньшей мере, на 99%.

Понятие "вариант последовательности" включает, в частности, такие варианты, которые содержат мутации и/или замещения по отношению к исходной последовательности. Примеры вариантов последовательности фрагмента Fc включают, но ими не ограничиваются, те варианты, которые имеют замещение L на A в положении CH2 4, CH2 5 или в обоих этих положениях.

Идентичность последовательности обычно рассчитывают относительно полной длины исходной последовательности (то есть последовательности, которая приведена в изобретении). Процент идентичности, согласно описанному в настоящем изобретении, может быть определен, например, с использованием BLAST, применяя параметры по умолчанию, определенные NCBI (the National Center for Biotechnology Information - Национальный центр биотехнологической информации; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 matrix; штраф открытие гэпа = 11 и штраф за продление гэпа = 1].

В контексте настоящего изобретения понятие "вариант нуклеотидной последовательности" имеет измененную последовательность, в которой один или несколько нуклеотидов в контрольной последовательности делетированы или замещены, или один или несколько нуклеотидов инсертированы в последовательность исходной нуклеотидной последовательности. В настоящем изобретении нуклеотиды обозначают стандартным однобуквенным кодом (A, C, G или T). Из-за вырожденности генетического кода "вариант нуклеотидной последовательности" может либо привести к изменению соответствующей исходной аминокислотной последовательности, то есть к "варианту аминокислотной последовательности", либо нет. Предпочтительными вариантами последовательностей являются такие варианты нуклеотидных последовательностей, которые не приводят к вариантам аминокислотных последовательностей (молчащие мутации), но другие не молчащие мутации также входят в объем настоящего изобретения, в частности мутантные нуклеотидные последовательности, которые приводят к аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере, 80, последовательно по меньшей мере, 90, более последовательно по меньшей мере, 95% последовательности идентична контрольной последовательности.

"Вариант аминокислотной последовательности" имеет измененную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот по сравнению с контрольной последовательностью делетированы или замещены, или одна или несколько аминокислот инсертированы по сравнению с контрольной последовательностью. В результате изменений, вариант аминокислотной последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80 идентична контрольной последовательности, предпочтительно, по меньшей мере, на 90 идентична, более предпочтительно, по меньшей мере, на 95 идентична, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 99% идентична контрольной последовательности. Варианты последовательности, которые, по меньшей мере, на 90% идентичны, имеют не более 10 изменений, то есть какую-либо комбинацию делеций, инсерций или замещений на 100 аминокислот контрольной последовательности.

Хотя возможно иметь неконсервативные аминокислотные замещения, предпочтительно, чтобы замещения были замещениями консервативных аминокислот, в которых замещенная аминокислота имеет сходные структурные или химические свойства с соответствующей аминокислотой в исходной последовательности. В качестве примера, консервативные аминокислотные замещения включают замещение одной алифатической или гидрофобной аминокислоты, например, аланина, валина, лейцина и изолейцина, на другую; замещение одной гидроксилсодержащей аминокислоты, например, серина и треонина, на другую; замещение одного кислотного остатка, например глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, на другую; замещение одного амид-содержащего остатка, например, аспарагина и глутамина, на другой; замещение одного ароматического остатка, например, фенилаланина и тирозина, на другой; замещение одного основного остатка, например лизина, аргинина и гистидина, на другой; и замещение одной малой аминокислоты, например аланина, серина, треонина, метионина и глицина, на другую.

Инсерции аминокислотной последовательности включают слияния amino-и/или карбокси-конца длиной от одного остатка до полипептида, содержащего сто или более остатков, а также инсерции в последовательность одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают слияние N- или C-конца аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

Важно отметить, что изменения в вариантах последовательности не отменяют соответствующей функциональности исходной последовательности, в данном случае, например, функциональности последовательности антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, связываться с тем же эпитопом и/или существенно нейтрализовать инфекцию ZIKV. Методики определения того, какие нуклеотиды и аминокислотные остатки, соответственно, могут быть замещены, инsertированы или делетированы без нарушения такой функциональности, находятся с помощью компьютерных программ, известных в данной области.

В контексте настоящего изобретения понятие последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, "производной от" определенной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, касается происхождения нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, которая получена как производная определенной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая в значительной степени идентична той последовательности или ее части, из которой она получена, посредством чего будучи "по существу идентичной" включает варианты последовательности, что описано выше. Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, которая получена как производная определенного пептида или белка, происходит из соответствующего домена в определенном пептиде или белке. Таким образом, понятие "соответствующая" относится, в частности, к одной и той же функциональности. Например, "внеклеточный домен" соответствует другому "внеклеточному домену" (другого белка), или "трансмембранный домен" соответствует другому "трансмембранному домену" (другого белка). "Соответствующие" части пептидов, белков и нуклеиновых кислот, таким образом, легко идентифицируются специалистами в данной области. Более того, последовательности, "производные от" другой последовательности, обычно легко идентифицируются специалистами в данной области, поскольку происходят от этой последовательности.

Предпочтительно, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, производная от другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентичной исходной нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (от которого она производна). Однако последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может также иметь одну или несколько мутаций относительно исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (от которого она производна), в частности, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может представлять собой вариант функциональной последовательности, как описано выше, исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (от которого она производна). Например, в пептиде/белке один или несколько аминокислотных остатков могут быть замещены другими аминокислотными остатками, или могут происходить вставки или делеции одного или нескольких аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения понятие "мутация" относится к изменению в последовательности нуклеиновой кислоты и/или аминокислотной последовательности относительно контрольной последовательности, например, соответствующей геномной последовательности. Мутация, например, по сравнению с геномной последовательностью, может быть, например, (природной) соматической мутацией, спонтанной мутацией, индуцированной мутацией, например, вызванной ферментами, химическими веществами или радиацией, или мутацией, полученной сайт-направленным мутагенезом (методами молекулярной биологии для внесения специфических и продуманных изменений в последовательность нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотную последовательность). Таким образом, понятия "мутация" и "мутирование" следует понимать также как физическое действие по созданию мутации, например, в последовательности нуклеиновой кислоты или в аминокислотной последовательности. К мутациям относятся замещения, делеции и инсерции одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот, а также инверсии нескольких последовательно расположенных нуклеотидов или аминокислот. Для получения мутации в аминокислотной последовательности предпочтительно, чтобы мутация могла быть введена в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную аминокислотную последовательность, для экспрессии (рекомбинантного) мутировавшего полипептида. Мутация может быть достигнута, например, путем изменения, например, путем сайт-направленного мутагенеза, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну аминокислоту, чтобы получить кодон, кодирующий другую аминокислоту, или путем синтеза варианта последовательности, например, зная нуклеотидную последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, и синтезируя разработанную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует вариант полипептида, без необходимости мутировать один или несколько нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты.

Несколько документов цитируются по всему тексту данного описания. Каждый из цитируемых документов (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), выше или ниже в тексте включен в настоящее изобретение в качестве ссылки. Ничто в настоящем изобретении не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имеет права предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего изобретения.

Следует учитывать, что настоящее изобретение не ограничено определенной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящем изобретении, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем изобретении терминология предназначена только для описания определенных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначена для ограничения области охвата настоящего изобретения, которое ограничивается только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют те же значения, которые обычно приняты специалистами в данной области.

Мультиспецифические антитела, связывающиеся с определенными эпитопами вируса Зика.

Настоящее изобретение основано, наряду с другими результатами, на открытии того обстоятельства, что мультиспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с разными эпитопами вируса Зика.

Такие антитела минимизируют или элиминируют образование мутантов вируса Зика, ускользающих от антител (антитела-ускользающие мутанты). В частности, в настоящее время нет мер профилактики/лечения инфекции, вызванной вирусом Зика. Антитела по настоящему критерию высоко эффективны для предотвращения, а также лечения или ослабления инфекции вирусом Зика. Более того, благодаря специфичности антител к вирусу Зика, они не вызывают ADE, а скорее блокируют ADE.

Первый объект настоящего изобретения относится к отдельным мультиспецифическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с разными эпитопами вируса Зика. Иначе говоря, настоящее изобретение предусматривает выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат, по меньшей мере, два сайта связывания эпитопа, которые специфически связываются с разными эпитопами вируса Зика.

Важно, что в отличие от обычных ("ординарных") антител, проявляющих только одну специфичность, мультиспецифические антитела способны связываться, по меньшей мере, с двумя разными эпитопами. В данном случае мультиспецифические антитела специфически связываются (по меньшей мере, с двумя) разными эпитопами вируса Зика.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения понятие "мультиспецифический" относится к способности связываться, по меньшей мере, с двумя разными эпитопами, например, на разных антигенах, например таких как разные белки вируса Зика (ZIKV), или на одном и том же антигене, например, на том же белке ZIKV. Предпочтительно, мультиспецифические антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, по настоящему изобретению связываются, по меньшей мере, с двумя разными эпитопами на одном и том же белке ZIKV, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, с двумя разными эпитопами на (E) белке оболочки вируса Зика.

Предпочтительно, мультиспецифические антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, по настоящему изобретению являются биспецифическими, триспецифическими, тетраспецифическими или пентаспецифическими, более предпочтительно антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, является биспецифическим или триспецифическим, и наиболее предпочтительно антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, является биспецифическим.

В контексте настоящего изобретения понятия "биспецифическое", "триспецифическое", "тетраспецифическое" связаны с числом разных эпитопов, с которыми антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, могут связываться. Например, обычные моноспецифические антитела типа IgG имеют два идентичных сайта связывания эпитопа (паратопы) и, таким образом, могут связываться только с идентичными эпитопами (не с разными эпитопами). Напротив, мультиспецифическое антитело имеет, по меньшей мере, два разных типа сайтов связывания эпитопов (паратопов) и может, таким образом, связываться по меньшей мере с двумя разными эпитопами. В контексте настоящего изобретения понятие "паратоп" относится к эпитоп-связывающему сайту антитела. Соответственно, термины "паратоп" и "сайт связывания эпитопа" используются здесь взаимозаменяемо.

Кроме того, одна "специфичность" может относиться к одному, двум, трем или нескольким одинаковым паратомам в одном антителе. Фактическое количество паратопов в одной молекуле антитела называется "валентностью". Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, является двухвалентным, трехвалентным, тетравалентным, шестивалентным или восьмивалентным, более предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является двухвалентным или тетравалентным, чаще всего, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются тетравалентными.

Наиболее предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению является биспецифическим или тетравалентным.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает точно две (идентичные) копии каждого из отличающихся сайтов связывания эпи-

топов, специфически связывающихся, по меньшей мере, с двумя разными эпитопами вируса Зика.

Например, одно нативное антитело IgG является моноспецифическим и бивалентным, поскольку оно имеет два идентичных паратопа (две идентичные копии). Однако, мультиспецифическое антитело включает, по меньшей мере, два (разных) паратопа. Таким образом, понятие "мультиспецифическое" относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, имеющим более одного паратопа и способным связываться с двумя или более различными эпитопами. Понятие "мультиспецифические антитела/антигенсвязывающие фрагменты" включает, в частности, биспецифические антитела, согласно описанному выше, но обычно также белок, например антитело, каркасы молекул, которые связывают, в частности, три или более разных эпитопа, то есть антитела, имеющие три или более паратопов.

В частности, мультиспецифическое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, может включать два или более паратопов, причем некоторые паратопы могут быть идентичными, так что все паратопы антитела принадлежат по меньшей мере к двум разным типам паратопов и, следовательно, антитело имеет, по меньшей мере, две специфичности.

Например, мультиспецифическое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению могут включать четыре паратопа, причем каждые два паратопа идентичны (имеют равную специфичность) и, таким образом, антитело или его фрагмент являются биспецифическим и тетравалентным (два идентичных паратопа для каждой из двух специфичностей). Таким образом, понятие "одна специфичность" относится, в частности, к одному или нескольким паратопам, проявляющим равную эффективность (которая обычно означает, что такие один или несколько паратопов идентичны) и, таким образом, "две специфичности" могут быть осуществлены за счет двух, трех, четырех, пяти, шести или более паратопов, поскольку они принадлежат только к двум специфичностям. Например, мультиспецифическое антитело может включать единственный паратоп для каждой (по меньшей мере, для двух) специфичностей, т.е. мультиспецифическое антитело включает всего, по меньшей мере, два паратопа. Например, биспецифическое антитело содержит единственный паратоп для каждой из двух специфичностей, т.е. антитело включает всего два паратопа. Наиболее предпочтительно, антитело включает точно два (идентичных) паратопа для каждой из двух специфичностей, т.е. антитело включает всего четыре паратопа. В другом варианте, антитело может включать три (идентичных) паратопа для каждой из двух специфичностей, т.е. антитело включает всего шесть паратопов.

В контексте настоящего изобретения понятие "антиген" означает какое-либо структурное вещество, которое служит мишенью для рецепторов адаптивного иммунного ответа, в частности, в качестве мишени для антител, рецепторов Т-клеток и/или рецепторов В-клеток. "Эпитопом", также называемым "антигенным детерминантом", является часть (или фрагмент) антигена, который распознается иммунной системой, в частности, антителами, рецепторами Т-клеток и/или рецепторами В-клеток. Таким образом, один антиген имеет, по меньшей мере, один эпитоп, т.е. один антиген содержит один или несколько эпитопов. Антиген может быть (i) пептидом, полипептидом или белком, (ii) полисахаридом, (iii) липидом, (iv) липопротеином или липопептидом, (v) гликолипидом, (vi) нуклеиновой кислотой или (vii) низкомолекулярным лекарственным средством или токсином. Таким образом, антиген может быть пептидом, белком, полисахаридом, липидом, их комбинацией, включающей липопротеины и гликолипиды, нуклеиновую кислоту (например, ДНК, мРНК, мшРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, ДНК-ловушку, плазмиду) или низкомолекулярным лекарственным средством (например, циклоспорином А, паклитакселом, доксорубицином, метотрексатом, 5-аминолевулиновой кислотой) или какой-либо их комбинацией. Предпочтительно, антиген выбран из (i) пептида, полипептида или белка, (ii) полисахарида, (iii) липида, (iv) липопротеина или липопептида и (v) гликолипида; более предпочтительно, антиген является пептидом, полипептидом или белком.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению связывается, по меньшей мере, с двумя разными эпитопами вируса Зика. По меньшей мере, к разным эпитопам вируса Зика могут быть расположены разные антигены вируса Зика, такие как разные белки вируса Зика (ZIKV), или один и тот же антиген вируса Зика, например, на том же белке ZIKV. Предпочтительными примерами антигенов/белков ZIKV являются капсид, ргМ, белки оболочки и неструктурные белки NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 и NS5B. Наиболее предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связывается с (по меньшей мере, двумя) разными эпитопами оболочки вируса Зика (ZIKV Е белок). Иначе говоря, наиболее предпочтительно антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, два сайта связывания эпитопа, которые специфически связываются с разными эпитопами белка оболочки вируса Зика (Е белок ZIKV). ZIKV включает нуклеокапсидную сердцевину, которая содержит одноцепочечную РНК, окруженную белками сердцевины. Ядро нуклеокапсида инкапсулировано липидной бислоемной мембраной с "мембранными белками" и "белками оболочки". Белок оболочки ZIKV (Е белок) является доминирующим антигеном. Структура и домены ZIKV Е белка описаны, например, в публикации Dai L. с соавт., *Cell Host Microbe*. 19(5), 2016, 696-704.

Предпочтительно, (по меньшей мере, два) разных эпитопа вируса Зика, с которыми связывается антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению являются неперекрещивающимися эпитопами. В частности, аминокислоты, формирующие первый эпитоп вируса Зика, с кото-

рым связывается антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению отличаются от аминокислот, формирующих второй эпитоп вируса Зика, с которым связывается антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может быть антителом какого-либо формата. В частности, мультиспецифические антитела предпочтительно охватывают "целые" антитела, например, целые IgG- или IgG-подобные молекулы, в то время как антигенсвязывающие фрагменты в контексте настоящего изобретения предпочтительно относятся к небольшим рекомбинантным форматам, например, к формату, основанному на биспецифических активаторах Т-клеток (ViTE®; за исключением того, что в контексте настоящего изобретения обе специфичности нацелены на вирус Зика, соответственно, Т-клеточная специфичность ViTE® может быть заменена (второй) специфичностью ZIKV), молекулах тандемных одноцепочечных переменных фрагментов (taFv), диантителах (Db), одноцепочечных диантителах (scDb) и различных других их производных (форматы биспецифических антител описаны в публикации Byrne H. с соавт., Trends Biotech, 31(11), 2013, 621-632 на фиг. 2, где представлены различные форматы биспецифических антител; Weidle U.H., с соавт., Cancer Genomics and Proteomics 10, 2013, 1-18, в частности, на фиг. 1 представлены различные форматы биспецифических антител; Chan A.C., Carter P.J. Nat Rev Immunol 10, 2010, 301-316, где на фиг. 3 представлены различные форматы биспецифических антител). Примеры форматов биспецифических антител включают, но ими не ограничиваются, Fabs-in-tandem-Ig, DVD-Ig, квадрогобридому, химически связанный Fab (фрагментное связывание с антигеном) и ViTE® (биспецифический Т-клеточный активатор). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предпочтительно антитело является антителом Fabs-in-tandem-Ig (FIT-Ig) или DVD-Ig.

Таким образом, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может быть выбран из группы, включающей Fabs-in-tandem-Ig (FIT-Ig); DVD-Ig; гибридную гибридому (квадрому); мультиспецифическую антикалиновую платформу (фирма Pieris); диантитела; одноцепочечные антитела; тандемные одноцепочечные Fv фрагменты; тандемные антитела (TandAbs), триспецифические антитела (Trispecific Abs) (фирма Affimed) (105-110 кДа); Dart (dual affinity retargeting - переориентирующееся антитело с двойной аффинностью; фирма Macrogenics); биспецифические антитела Xmab (фирма Xenocor); биспецифические активаторы Т-клеток (Bispecific T cell engagers - Bites; фирма Amgen; 55 кДа); Triplebodies; Tribody = Fab-scFv гибридный белок (фирма Creative Biolabs) производные многофункциональных рекомбинантных антител (110 кДа); платформу Duobody (фирма Genmab); платформу Dock and lock (замка на причале); платформу выступ-во-впадину (Knob into hole - KIH); гуманизованное биспецифическое антитело IgG (REGN1979) (фирма Regeneron); Mab<sup>2</sup> биспецифические антитела (F-Star); DVD-Ig = двойной переменной домен иммуноглобулина (фирма Abbott); каппа-лямбда антитела; ТВТИ = тетравалентный биспецифический тандемный Ig; и CrossMab.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может быть выбран из биспецифических IgG-подобных антител (BsIgG), включая CrossMab; DAF (два-в-одном); DAF (четыре-в-одном); DutaMab; DT-IgG; Knobs-in-holes (выступ-во-впадину), обычно LC; сборку выступ-во-впадину (Knob into hole - KIH); заряженную пару (Charge pair); Fab-arm exchange (обмен Fab фрагментами); гибридные белки SEEDbody; Triomab; LUZ-Y; Fcab; κλ-body; ортогональный Fab. Такие форматы биспецифических антител описаны, например, Spiess C., Zhai Q., Carter P.J. Molecular Immunology 67, 2015, 95-106, в частности, на фиг. 1 и в соответствующем описании, например, на стр. 95-101.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может быть выбран из фрагментов биспецифических антител, включая нанотела, нанотела-HAS; ViTE; диантитела; DART; TandAb; scDiabody; sc-Diabody-CH3; Diabody-CH3; Triple Body; миниантитела; минибоды; TriVi минибоды; scFv-CH3 KIH; Fab-scFv; scFv-CH-CL-scFv; F(ab')<sub>2</sub>; F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>; scFv-KIH; Fab-scFv-Fc; тетравалентное HCAb; scDiabody-Fc; Diabody-Fc; Tandem scFv-Fc; Intrabody. Такие форматы биспецифических антител описаны, например, Spiess C., Zhai Q., Carter P.J. Molecular Immunology 67, 2015, 95-106, в частности, на фиг. 1 и в соответствующем описании, например, на стр. 95-101.

Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может быть выбрано из IgG-связанных антител с дополнительным антигенсвязывающим фрагментом, к которым относятся DVD-IgG; IgG(H)-scFv; scFv-(H)IgG; IgG(L)-scFv; scFv-(L)IgG; IgG(L,H)-Fv; IgG(H)-V; V(H)-IgG; IgG(L)-V; V(L)-IgG; KIH IgG-scFab; 2scFv-IgG; IgG-2scFv; scFv4-Ig; scFv4-Ig; Zybody; и DVI-IgG (четыре-в-одном). Такие форматы биспецифических антител описаны, например, Spiess C., Zhai Q., Carter P.J. Molecular Immunology 67, 2015, 95-106, в частности, на фиг. 1 и в соответствующем описании, например, на стр. 95-101. Из таких фрагментов антител еще более предпочтительным является DVD-Ig (иммуноглобулин с двойным переменным доменом (фирма Abbott)). Такой формат антител описан подробно, например, в публикации Wu C. в соавт., Nat Biotechnol. 25(11), 2007, 1290-1297; или в публикации DiGiammarino E., Ghayur T., Liu J. Methods Mol Biol. 899, 2012, 145-156.

Наиболее предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению является IgG-присоединенным антителом формата Fabs-in-tandem-Ig (FIT-Ig). Иначе говоря, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению является наиболее пред-

почтительно относящимся к формату Fabs-in-tandem-Ig (FIT-Ig). Формат Fabs-in-tandem-Ig (FIT-Ig) подробно описан, например, в WO 2015/103072 A1, включенным в настоящее изобретение в виде ссылки, или в работе Gong S. с соавт., MAbs 2017. Аналогично DVD-Ig, также FIT-Ig является биспецифическим тетравалентным антителом симметричного формата. FIT-Ig может быть получен, используя три полипептида: полипептид 1 обычно включает легкую цепь внешнего гибридного Fab, предпочтительно без линкеров, с N-концевой областью тяжелой цепи внутреннего Fab; полипептид 2 обычно включает переменную и CH1 области тяжелой цепи внешнего Fab; и полипептид 3 обычно включает легкую цепь внутреннего Fab. Таким образом, антитело формата FIT-Ig обычно включает "внутренний Fab" и "внешний Fab".

Предпочтительно, антитело по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий, нейтрализует инфекцию вируса Зика. Иначе говоря, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению снижает способность к заражению у вируса Зика.

Для изучения и количественной оценки инфекционности вируса (или "нейтрализации") в лабораторных условиях специалистам в данной области известны разные стандартные "анализы нейтрализации". Для анализа нейтрализации животные вирусы животных обычно размножают в клетках и/или клеточных линиях. В контексте настоящего изобретения анализ нейтрализации предпочтителен, причем культивируемые клетки инкубируют с фиксированным количеством вируса Зика (ZIKV) в присутствии (или в отсутствие) исследуемого антитела. Для снятия данных может применяться, например, жидкостная цитометрия. В другом варианте осуществления настоящего изобретения возможно также снятие других показателей, например, количества неструктурных белков ZIKV (например, ZIKV NS1), секретируемых в супернатант культуры. Например, неструктурный белок 1 вируса ZIKV (NS1) иммуноферментный анализ (ELISA) на основе захвата антигена, тест на инфекционную дозу-50 (TCID50) на культуре ткани (TCID50-ELISA) может применяться в качестве альтернативы методу стандартного подсчета вирусных бляшек для титрования вируса Зика - сходным образом с методом, описанным для вируса денге (DENV) в работе Li J. с соавт., PLoS ONE 2011, 6:e22553. В таком исследовании, например, ZIKV NS1 - связывающие антитела, описанные в настоящем изобретении, могут быть полезны.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения для анализа нейтрализации ZIKV культивируемые клетки, например, клетки Vero, инкубируют с определенным количеством ZIKV в присутствии или в отсутствие исследуемого антитела, например, в течение примерно четырех дней. После инкубирования клетки можно промыть и дополнительно культивировать. Для измерения инфекционности вируса можно использовать жидкостную цитометрию. С этой целью клетки могут быть зафиксированы, например, 2% формальдегидом, агентами повышения проницаемости, например, 1% ФСТ (фетальная сыворотка теленка) в ФСБ (фосфатно-солевом буфере), 0,5% сапонином и окрашены, например, с антителом мыши 4G2. Затем клетки можно инкубировать с козьим антителом против иммуноглобулина мышь (goat anti-mouse IgG), конъюгированным с красителем, например Alexa Fluor488, и исследованы методом жидкостной цитометрии. В другом варианте осуществления настоящего изобретения жизнеспособные клетки могут быть выявлены жидкостной цитометрией, используя, например, реагент WST-1 (фирма Roche). Предпочтительным штаммом ZIKV для применения в таком анализе нейтрализации является ZIKV N/PF/2013.

Антитело и антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обладают высокой нейтрализующей активностью. Концентрация антитела, требуемая для нейтрализации 50% вируса ZIKV ( $IC_{50}$ ), по сравнению с контролями без антител, составляет, например, до около 3 мкг/мл или до примерно 1 мкг/мл. Предпочтительно концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для нейтрализации 50% вируса ZIKV ( $IC_{50}$ ), составляет примерно 500 нг/мл, более предпочтительно концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для нейтрализации 50% вируса ZIKV ( $IC_{50}$ ), составляет примерно 250 нг/мл, еще более предпочтительно концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для нейтрализации 50% вируса ZIKV ( $IC_{50}$ ), составляет примерно 150 нг/мл. Наиболее предпочтительно, концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для нейтрализации 50% вируса ZIKV ( $IC_{50}$ ), составляет примерно 100 нг/мл или менее, например, примерно 90 или менее, примерно 80 или менее, примерно 70 или менее, примерно 60 или менее, примерно 50 или менее, примерно 45 или менее, примерно 40 или менее, примерно 35 или менее, примерно 30 или менее, примерно 25 или менее, примерно 20 или менее или, особенно предпочтительно, примерно 15 нг/мл или менее. В частности, концентрация антитела по настоящему изобретению, требуемая для нейтрализации 50% вируса ZIKV ( $IC_{50}$ ), предпочтительно составляет примерно 50 нг/мл или менее. Это означает, что только низкие концентрации антитела требуются для нейтрализации 50% вируса ZIKV. Концентрация антитела по настоящему изобретению, необходимая для 50% нейтрализации ZIKV ( $IC_{50}$ ), может быть измерена с использованием стандартных методов анализа нейтрализации, известных специалистам в данной области или, в частности, по приведенному выше описанию.

В общем, связывание антитела может быть оценено с использованием стандартного метода ELISA (фермент-связанного твердофазного анализа), который хорошо известен специалистам. Вариант стандартного метода ELISA может быть следующим: в планшеты ELISA может быть нанесено покрытие (например, в течение ночи при 4°C) в достаточном количестве (например, 1 мкг/мл) бел-

ка/комплекса/частиц, с которыми связывается исследуемое антитело (например, для описанного ниже связывания DENV, применяют белки E DENV и/или DENV VLP), например, в ФСБ. Планшеты затем блокируют, например, 1 мас.% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ и инкубируют с исследуемым антителом (например, около 1,5 ч при комнатной температуре). После промывки связывание антитела может быть выявлено, например, с помощью козьего антитела против IgG человека (goat anti-human IgG), соединенного с щелочной фосфатазой. Планшеты затем могут быть промыты, требуемый субстрат (например, p-NPP) может быть внесен и планшеты могут быть прочитаны, например, при 405 нм. Относительная аффинность связывания антитела может быть определена путем измерения концентрации mAb ( $EC_{50}$ ), требуемой для достижения 50% максимального связывания при насыщении. Величины  $EC_{50}$  могут быть подсчитаны путем интерполяции кривых связывания, снабженных четырехпараметрической нелинейной регрессией с переменным наклоном.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению существенным образом не связываются с вирус Денге-подобными частицами и/или с белком оболочки вируса Денге. Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению существенным образом не связываются с вирус Денге-подобными частицами и/или с белком оболочки вируса Денге какого-либо из четырех DENV серотипов DENV1, DENV2, DENV3 и DENV4. Таким образом, "по существу, не связывается" означает, что для антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, величина  $EC_{50}$  не достигает  $10^2$  нг/мл, предпочтительно  $10^3$ , более предпочтительно  $5 \times 10^3$ , еще более предпочтительно  $8 \times 10^3$  и наиболее предпочтительно до  $10^4$  нг/мл, что может быть определено стандартным методом ELISA для вирус Денге-подобных частиц (DENV VLP) и/или белка оболочки вируса Денге (белка E DENV). Иначе говоря, концентрация антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, необходимая для достижения 50% максимального связывания при насыщении ( $EC_{50}$ ) вирус Денге-подобными частицами (DENV VLP) и/или белком оболочки вируса Денге (белком E DENV) в стандартном методе ELISA обычно составляет более  $10^2$ , предпочтительно более  $10^3$ , более предпочтительно более  $5 \times 10^3$ , еще более предпочтительно более  $8 \times 10^3$  и наиболее предпочтительно более  $10^4$  нг/мл.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению не способствует антитело-зависимому усилению (antibody-dependent enhancement - ADE) инфицирования вирусом Зика. Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению блокирует антитело-зависимое повышение инфицирования (ADE) вирусом Зика. ADE можно оценить методом жидкостной цитометрии, используя, например, культивируемые клетки или линии клеток, например, клетки K562. Например, исследуемые антитела и ZIKV можно перемешивать в течение 1 ч при 37°C и вносить к 5000 K562 клеток/лунку. Через четверо суток клетки можно фиксировать, насыщать и окрашивать m4G2, например, согласно описанному выше в методах нейтрализации. Количество инфицированных клеток определяют жидкостной цитометрией, согласно описанному выше для метода нейтрализации.

Предпочтительно, антитело по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, элиминирует образование ускользающих от антител мутантов ZIKV. Элиминацию размножения ускользающих мутантов специалисты в данной области могут легко определить. Например, для определения склонности антитела или фрагмента антитела к образованию ускользающих мутантов, ZIKV неоднократно пассируют в присутствии суб-нейтрализующих концентраций исследуемого антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента. В примерах 10 и 11 настоящего изобретения ускользающие мутанты ZIKV ("MARM") обычно появляются после третьего или четвертого пассажа ZIKV. Соответственно, можно читать, что антитело элиминирует размножение ускользающих мутантов вируса, если все еще ускользающие мутанты ZIKV не выявляются после пяти пассажей вируса (ZIKV) в присутствии суб-нейтрализующих концентраций антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению. Более предпочтительно, ускользающие мутанты ZIKV не выявляются после шести пассажей вируса (ZIKV) в присутствии суб-нейтрализующих концентраций антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению. Еще более предпочтительно, ускользающие мутанты ZIKV не выявляются после семи пассажей вируса (ZIKV) в присутствии суб-нейтрализующих концентраций антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению. Наиболее предпочтительно, ускользающие мутанты ZIKV не выявляются после восьми пассажей вируса (ZIKV) в присутствии суб-нейтрализующих концентраций антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению.

Например, чтобы оценить склонность антитела или фрагмента антитела к образованию ускользающих мутантов, ZIKV, например штамм N/PF/2013, инкубируют с различными субнейтрализующими концентрациями интересующего антитела/антигенсвязывающего фрагмента, например, по меньшей мере, в течение 30 мин, например, примерно при 37°C (температура тела). Затем добавляют (живые) клетки, например, клетки Vero, и инкубируют, например, в течение, по меньшей мере, одного дня, предпочтительно 3-4 дня, например, примерно при температуре 37°C (температура тела) чтобы допустить размножение вируса. Затем отбирают супернатанты из трех вариантов: самая низкая концентрация пред-

ставляющего интерес антитела/антигенсвязывающего фрагмента, при которой наблюдают полную защиту монослоя клеток; концентрация, при которой наблюдают частичное воздействие СРЕ на монослой клеток; и концентрация, при которой 100% монослоя клеток было разрушено ZIKV СРЕ.

Одна часть отобранного супернатанта может быть использована для анализов микро-нейтрализации и последующего секвенирования вируса (для выявления антитело-избегающих мутантов), в то время как другая часть (того же самого) выбранного супернатанта может быть использована для следующего этапа отбора (пассажа). А именно, для следующего пассажа часть отобранного супернатанта можно смешать с различными суб-нейтрализующими концентрациями исследуемого антитела/антигенсвязывающего фрагмента и инкубировать, согласно описанному выше, с последующим добавлением (живых) клеток и инкубировать, согласно описанному выше, чтобы, наконец, снова выбрать супернатанты. Такой отбор и способ размножения повторяют на протяжении, по меньшей мере, пяти пассажей, предпочтительно, по меньшей мере, шести пассажей, более предпочтительно, по меньшей мере, семи пассажей, и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, восьми пассажей.

Предпочтительно, каждая CDR или каждая варибельная область, по меньшей мере, один сайт связывания эпитопа антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению является CDR человека или варибельной областью человека, соответственно. Наиболее предпочтительно, все константные области и варибельные области, включенные в антитело, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению являются константными областями человека и варибельными областями человека.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению является моноклональным антителом, предпочтительно моноклональным, в котором каждая CDR или ее каждая варибельная область, включенная в антитело, или ее антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению является CDR человека, или варибельной областью человека, соответственно.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению относится к типу IgG, например, типу IgG1, типу IgG2, типу IgG3 или типу IgG4, более предпочтительно, к типу IgG1. Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает (i) константную область тяжелой цепи типа IgG1 CH1-CH2-CH3, где "CH1" означает константный домен 1 тяжелой цепи, "CH2" означает константный домен 2 тяжелой цепи, "CH3" означает константный домен 3 тяжелой цепи; и (ii) константную область легкой цепи типа IgG CL, где "CL" означает константный домен легкой цепи. Еще более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает константную область тяжелой цепи типа IgG1 CH1-CH2-CH3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91 или 92 или функционального варианта этой последовательности, и константную область легкой цепи типа IgG CL, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93 или 94, или функционального варианта этой последовательности.

Соответственно, предпочтительно, чтобы антитело по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, включало фрагмент Fc. Более предпочтительно, фрагмент Fc происходит от человека, например, от IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4 человека, причем IgG1 человека особенно предпочтителен. Различные форматы мультиспецифических антител, включающих фрагмент Fc, известны в данной области. Предпочтительными форматами антител, включающих фрагмент Fc, являются форматы антител с присоединенным IgG, описанные выше. Как правило, антитело, содержащее фрагмент Fc, является более эффективным и обладает более длительным периодом полужизни, чем антитела или фрагменты антител без фрагмента Fc.

В контексте настоящего изобретения, понятие "фрагмент Fc" относится к последовательности, полученной из части тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирной области непосредственно перед сайтом расщепления папаином (например, остаток 216 в нативном IgG, принимающий первый остаток константной области тяжелой цепи, является 114) и заканчивающийся в С-конце тяжелой цепи иммуноглобулина. Соответственно, фрагмент Fc может быть полным фрагментом Fc или его частью (например, его доменом). Полный фрагмент Fc содержит, по меньшей мере, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 (например, положения аминокислот 216-446 по классификации ЕС). Дополнительный остаток лизина (K) иногда присутствует на самом С-конце фрагмента Fc, но часто отщепляется от зрелого антитела. Каждое из аминокислотных положений во фрагменте Fc было пронумеровано в соответствии с общепризнанной в ЕС системой нумерации Kabat (см., например, Kabat с соавт., в кн.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Департамент здравоохранения и сферы услуг США. Службы, 1983 и 1987).

Предпочтительно, в контексте настоящего изобретения фрагмент Fc содержит, по меньшей мере, одну составляющую из следующих: домена шарнирной области (например, upper, middle, и/или lower hinge region), домена CH2, домена CH3 или их варианта, части или фрагмента. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фрагмент Fc содержит, по меньшей мере, шарнирный домен, домен CH2 или домен CH3. Более предпочтительно, фрагмент Fc является полным фрагментом Fc. Фрагмент Fc также может включать одну или более аминокислотных инсерций, делеций или замеще-

ний относительно природного фрагмента Fc. Например, по меньшей мере, одна из следующих составляющих, шарнирного домена, домена CH2 или домена CH3 (или их часть), может быть deletирована. Например, фрагмент Fc может включать или состоит из: (i) шарнирного домена (или его части), гибридного с доменом CH2 (или его частью), (ii) шарнирного домена (или его части), гибридного с доменом CH3 (или его частью), (iii) домена CH2 (или его части), гибридного с доменом CH3 (или его частью), (iv) шарнирного домена (или его части), (v) домена CH2 (или его части), или (vi) домена CH3 (или его части).

Специалистам очевидно, что фрагмент Fc может быть модифицирован таким образом, что его аминокислотная последовательность варьирует относительно полного фрагмента Fc природной молекулы иммуноглобулина, сохраняя, по меньшей мере, одну желательную функцию, обусловленную природным фрагментом Fc. Такие функции включают связывание рецептора Fc (FcR), модулирование периода полураспада антитела, ADCC function, связывание белка A, связывание белка G и связывание комплемента. Части природных фрагментов Fc, которые ответственны и/или важны для таких функций, известны специалистам в данной области.

Например, для активации каскада комплемента C1q связывает, по меньшей мере, две молекулы IgG1 или одну молекулу IgM, прикрепленную к антигенной мишени (Ward E. S., Ghetie V., *Theor. Immunol.* 2, 1995, 77-94). В публикации (Burton D. R., *Mol. Immunol.* 22, 1985, 161-206) показано, что область тяжелой цепи, включающая аминокислотные остатки с 318 по 337, участвует в фиксации комплемента. В публикации (Duncan A. R., Winter G. *Nature* 332, 1988, 738-740) методом сайт-направленного мутагенеза установлено, что Glu318, Lys320 и Lys322 формируют сайт связывания с C1q. Роль остатков Glu318, Lys320 и Lys322 в связывании C1q подтвердили способностью короткого синтетического пептида, содержащего эти остатки, ингибировать лизис, опосредованный комплементом.

Например, связывание FcR может быть опосредовано взаимодействием фрагмента Fc (антитела) с рецепторами Fc (FcR), которые являются специализированными рецепторами на поверхности кроветворных клеток. Было показано, что рецепторы Fc, принадлежащие надсемейству иммуноглобулинов, опосредуют как удаление покрытых антителами патогенов путем фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (antibody dependent cell mediated cytotoxicity - ADCC; Van de Winkel J.G., Anderson C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49, 1991, 511-524). FcR определяют по специфичности в отношении классов иммуноглобулинов; рецепторы Fc для антител IgG обозначают как FcγR, для IgE - как FcεR, для IgA - как FcαR и так далее; неонатальные рецепторы Fc обозначают как FcRn. Связывание рецептора Fc описано, например, в публикации Ravetch J.V., Kinet J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9, 1991, 457-492; Capel P.J. с соавт., *Immunomethods* 4, 1994, 25-34; de Haas M. C. соавт., *J. Lab. Clin. Med.* 126, 1995, 330-341; Gessner J. E. с соавт., *Ann. Hematol.* 76, 1998, 231-248.

Перекрестное связывание рецепторов доменом Fc нативных антител IgG (FcγR) запускает широкий спектр эффекторных функций, включая фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность и высвобождение медиаторов воспаления, а также клиренс иммунных комплексов и регуляцию выработки антител. Следовательно, Fc-фрагменты, обеспечивающие сшивание рецепторов (FcγR), являются предпочтительными. У людей были описаны три класса FcγR, а именно: (i) FcγRI (CD64), который связывает мономерный IgG с высокой аффинностью и экспрессируется на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и эозинофилах; (ii) известно, что FcγRII (CD32), который связывает комплексный IgG со средней или низкой аффинностью, широко экспрессируется, в частности на лейкоцитах, является центральным игроком в опосредованном антителами иммунитете и который можно разделить на FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIC, которые выполняют различные функции в иммунной системе, но связываются с аналогичным низким сродством к IgG-Fc, и эктодомены этих рецепторов являются высоко гомологичными; и (iii) FcγRIII (CD16), который связывает IgG со средним или низким сродством и существует в виде двух типов: FcγRIIIA, обнаруженный на NK-клетках, макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и T-клетках, и опосредующий ADCC и FcγRIIIB, который высоко экспрессируется на нейтрофилах. FcγRIIA обнаружен на многих клетках, участвующих в уничтожении (например, макрофаги, моноциты, нейтрофилы) и, предположительно, способен активировать процесс уничтожения клеток. Предполагают, что FcγRIIIB участвует в процессах ингибирования, он обнаружен на V-клетках, макрофагах и тучных клетках, а также на эозинофилах. Важно, что 75% всех FcγRIIIB обнаруживают в печени (Ganesan L.P. с соавт., *J. of Immunology* 189, 2012, 4981-4988). FcγRIIIB избыточно экспрессируется в синусоидальной эндотелии печени, обозначаемом LSEC, и в клетках Купфера в печени и LSEC, основных местах очистки малых иммунных комплексов (Ganesan L.P. с соавт., *J. of Immunology* 189, 2012, 4981-4988).

Таким образом, в настоящем изобретении предпочтительны такие тела, и их антигенсвязывающие фрагменты, которые способны связываться с FcγRIIb, например, антитела, включающие фрагмент Fc для связывания с FcγRIIb, в частности, с областью Fc, например, антител типа IgG. Более того, возможно конструирование фрагмента Fc для повышения связывания FcγRIIb путем внедрения мутаций S267E и L328F, что описано Chu S.Y. с соавт., *Molecular Immunology* 45, 2008, 3926-3933. Таким образом, клиренс

иммунных комплексов может быть усилен (Chu S. с соавт., 2014, в кн.: Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts). Соответственно, в контексте настоящего изобретения предпочтительны такие антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые включают сконструированный фрагмент Fc с мутациями S267E и L328F, в частности, согласно описанию Chu S.Y. с соавт., *Molecular Immunology* 45, 2008, 3926-3933. На В-клетках он, по-видимому, действует, подавляя дальнейшую выработку иммуноглобулина и переключение изотипов, например, класса IgE. На макрофагах FcγRIIB действует, подавляя фагоцитоз, опосредуемый через FcγRIIA. На эозинофилах и тучных клетках b-форма может способствовать супрессии активации таких клеток через связывание IgE с их отдельным рецептором.

Касательно связывания FcγRI, модификация в нативном IgG, по меньшей мере, одного остатка из E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329, снижает связывание с FcγRI. Остатки IgG2 в положениях 233-236, замещенных в IgG1 и IgG4, снижает связывание с FcγRI в  $10^3$  раз и элиминирует ответ моноцитов человека на сенсibilизированные антителами эритроциты (Armour K.L. с соавт., *Eur. J. Immunol.* 29, 1999, 2613-2624). Касательно связывания FcγRII установлено, что пониженное связывание FcγRIIA, например, для мутации IgG, по меньшей мере, одного остатка из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 и K414. Касательно связывания FcγRIII, пониженное связывание с сγRIIA установлено, например, по меньшей мере, для одного остатка из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 и D376. Картирование сайтов связывания на IgG1 человека для рецепторов Fc, указанные выше сайты мутирования и методы измерения связывания с FcγRI и FcγRIIA описаны в публикации Shields R.L. с соавт., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, 6591-6604.

Касательно связывания с критическим FcγRII, две области нативного Fc IgG, по-видимому, являются критическими для взаимодействия FcγRIIs и IgG, а именно (i) нижнего шарнирного сайта IgG Fc, в частности, аминокислотные остатки L, L, G, G (234 - 237, нумерация EU), и (ii) смежная область домена CH2 в Fc IgG, в частности, петлю и нити в верхнем домене CH2, примыкающем к нижней шарнирной области, например, области (Wines B.D. с соавт., *J. Immunol.* 164, 2000, 5313-5318). Более того, FcγRI, по-видимому, связывается с одним и тем же сайтом на Fc IgG, тогда как FcRn и белок A связываются с разными сайтами в Fc IgG, который, по-видимому, находится на границе раздела CH2-CH3 (Wines B.D. с соавт., *J. Immunol.* 164, 2000, 5313-5318).

Например, фрагмент Fc может включать или состоять, по меньшей мере, из части фрагмента Fc, о котором известно, что он необходим для связывания FcRn или продления полу-жизни. В другом варианте или дополнительно фрагмент Fc антитела по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, известную в данной области часть, необходимую для связывания белка A и/или фрагмента Fc антитела по настоящему изобретению, содержащее, по меньшей мере, часть молекулы Fc, о которой известно, что она необходима для связывания белка G. Предпочтительно, сохраняемой функцией является нейтрализация вирусной инфекции Зика, которая, как предполагается, опосредуется связыванием FcγR. Соответственно, предпочтительный фрагмент Fc включает, по меньшей мере, часть, о которой в данной области известно, что она необходима для связывания FcγR. Выше отмечено, что предпочтительный фрагмент Fc, таким образом, может, по меньшей мере, содержать (i) сайт нижнего шарнира нативного Fc IgG, в частности, аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, нумерация Евросоюза (EU)), и (ii) примыкающую область домена CH2 нативного Fc IgG, в частности, петли и нити в верхнем домене CH2, примыкающем к нижней шарнирной области, например, в области P331, например, области, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот в верхнем домене CH2 нативного Fc IgG вокруг P331, например, между аминокислотами 320 и 340 (нумерация EU) нативного Fc IgG.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению содержит область Fc. В контексте настоящего изобретения понятие "область Fc" относится к части иммуноглобулина, сформированной двумя или более фрагментами Fc тяжелых цепей антитела. Например, область Fc может быть мономерной или "одноцепочечной" областью Fc (т.е., областью scFc). Одноцепочечные области Fc состоят из фрагментов Fc, связанных в одну полипептидную цепь (например, кодируемую одной непрерывной последовательностью нуклеиновой кислоты). Примеры областей scFc описаны в WO 2008/143954 A2. Предпочтительно область Fc является димерной. Понятие "димерная область Fc" или "dcFc" означает димер, сформированный фрагментами Fc двух разных тяжелых цепей иммуноглобулина. Димерная область Fc может быть гомодимером двух идентичных фрагментов Fc (например, области Fc природного иммуноглобулина) или гетеродимером двух неидентичных фрагментов Fc.

Фрагменты Fc области Fc могут принадлежать к одному или разным классам/подклассам. Например, фрагменты Fc могут быть производными от иммуноглобулина (например, иммуноглобулина человека) из подклассов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно, фрагменты Fc области Fc из одного класса или подкласса. Однако область Fc (или одна или более фрагментов Fc области Fc) также может быть химерной, посредством чего химерная область Fc может содержать фрагменты Fc, производные от разных классов и/или подклассов иммуноглобулина. Например, по меньшей мере, два фрагмента Fc димерной или одноцепочечной области Fc могут быть от разных классов и/или подклассов иммуноглобулина. Дополнительно или в другом варианте, химерные области Fc могут содержать один химерный

фрагмент или более Fc. Например, химерная область или фрагмент Fc может включать одну или более частей, производных от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3), хотя остальная часть области или фрагмента Fc относится к другому подклассу. Например, область Fc или фрагмент полипептида Fc может включать домен CH2 и/или CH3, производный от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG4), и шарнирную область от иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG3). Например, область Fc или фрагмент могут включать шарнир и/или домен CH2, производный от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG4) и домен CH3 от иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Например, химерная область Fc может включать фрагмент Fc (например, полный фрагмент Fc) от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG4) и фрагмент Fc от иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Например, область Fc или фрагмент могут включать домен CH2 из иммуноглобулина IgG4 и домен CH3 из иммуноглобулина IgG1. Например, область Fc или фрагмент могут включать домен CH1 и домен CH2 из молекулы IgG4 и домен CH3 из молекулы IgG1. Например, область или фрагмент Fc могут содержать часть домена CH2 от определенного подкласса антитела, например, в EU положениях 292-340 домена CH2. Например, область Fc или фрагмент могут включать аминокислоты в положениях 292-340 в домене CH2, производном от фрагмента IgG4, и остаток CH2, производного от фрагмента IgG1 (в другом варианте, 292-340 домена CH2 могут быть производными от фрагмента IgG1 и остатка CH2 от фрагмента IgG4).

Более того, область Fc или фрагмент Fc может (дополнительно или в другом варианте), например, включать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может быть производным, например, частично, от молекулы IgG1, IgG2 или IgG4 (например, верхняя и нижняя последовательность шарнира) и, в частности, от молекулы IgG3 (например, средняя последовательность шарнира). В другом примере область или фрагмент Fc могут включать химерный фрагмент, производный, в частности, от молекулы IgG1, и, в частности, от молекулы IgG4. В другом примере химерный фрагмент может включать верхний и нижний домены шарнира от молекулы IgG4 и средний домен шарнира от молекулы IgG1. Такой химерный фрагмент может быть получен, например, путем интродукции замещения пролина (Ser228Pro) в положении EU 228 в среднем домене шарнира шарнирной области IgG4. В другом варианте осуществления настоящего изобретения химерный шарнир может включать аминокислоты в положении EU 233-236 от антитела IgG2 и/или мутацию Ser228Pro, причем оставшиеся аминокислоты шарнира происходят от антитела IgG4 (например, химерный шарнир последовательности ESKYGPPCPPPAPPVAGP). Другие химерные шарниры, которые могут быть применены во фрагменте Fc антитела по настоящему изобретению, описаны в US 2005/0163783 A1.

В настоящем изобретении предпочтительно, если фрагмент Fc, или область Fc, включает или состоит из аминокислотной последовательности, производной от последовательности иммуноглобулина человека (например, от области Fc или фрагмента Fc от молекулы IgG человека). Однако полипептиды могут включать одну или более аминокислот от другого вида млекопитающих. Например, фрагмент Fc приматов или сайт связывания приматов могут быть включены в полипептиды субъекта. В другом варианте, одна или несколько аминокислот мыши могут содержаться во фрагменте Fc или в области Fc.

Предпочтительно, антитело по настоящему изобретению содержит, в частности дополнительно к фрагменту Fc, согласно описанному выше, другие части, производные от константной области, в частности из константной области IgG, предпочтительно из константной области IgG1, более предпочтительно, из константной области IgG1 человека. Более предпочтительно, антитело по настоящему изобретению содержит, в частности, дополнительно к фрагменту Fc, согласно описанному выше, все другие части константных областей, в частности, все другие части константных областей IgG, предпочтительно, все другие части константных областей IgG1, более предпочтительно, все другие части константных областей IgG1 человека.

Особенно предпочтительными последовательностями константных областей являются аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 91-94 (кодируемые, например, последовательностями нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 95-98, соответственно). Предпочтительно, аминокислотная последовательность IgG1 CH1-CH2-CH3 соответствует SEQ ID NO: 91, или варианту функциональной последовательности, согласно описанию настоящего изобретения. Еще более предпочтительно, аминокислотная последовательность IgG1 CH1-CH2-CH3 соответствует SEQ ID NO: 92 или функциональному варианту этой последовательности, согласно описанию настоящего изобретения, где мутация "LALA" сохраняется. Выше было отмечено, что особенно предпочтительное антитело по настоящему изобретению содержит (полную) область Fc, производную от IgG1 человека. Более предпочтительно, антитело по настоящему изобретению содержит, в частности, дополнительно к (полной) области Fc, производной от IgG1 человека, также все части константных областей IgG, предпочтительно все другие части константных областей IgG1, более предпочтительно, все другие части константных областей IgG1 человека.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что антитело-зависимое усиление (antibody-dependent enhancement - ADE) инфекции вируса Зика вызывается связыванием фрагмента Fc антитела, в частности, фрагмента Fc тяжелой цепи молекулы IgG, к Fc-рецептору, например, рецептору Fcγ на клетке-хозяине. Таким образом, предпочтительно, чтобы антитело по настоящему изобретению, или его ан-

тигенсвязывающий фрагмент, содержало одну или более мутаций во фрагменте Fc. Мутация (мутации) может быть какой-либо мутацией, которая уменьшает связывание антитела с рецептором Fc (FcR), в частности уменьшает связывание антитела с рецептором Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R). С другой стороны, предпочтительно, чтобы антитело по настоящему количеству содержало (полный/полную) фрагмент Fc/область Fc, причем взаимодействие/связывание с FcRn не нарушено. Соответственно, особенно предпочтительно, чтобы антитело по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержало одну или более мутаций во фрагменте Fc, которые (i) уменьшают связывание антитела с рецептором Fc $\gamma$ , но не нарушают взаимодействие с FcRn. Одним из примеров таких мутаций является мутация "LALA", описанная ниже.

В общем, связывание антитела с рецептором Fc может оцениваться разными методами, известными специалистам, например, методом ELISA (Hessell A.J. с соавт., *Nature*, 449, 2007, 101-104; Grevys A. с соавт. *Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions*. 2015, 194:5497-5508) методом жидкостной цитометрии (Perez L.G. с соавт., *J Virol*, 83, 2009, 7397-7410; Piccoli L. с соавт., *Nat Commun* 2015, 6, 1-9).

В общем, антитело по настоящему изобретению может быть гликозилированным. N-связанные гликаны, присоединенные к домену CH2 тяжелой цепи, например, могут влиять на связывание C1q и FcR, причем агликозилированные антитела имеют более низкое сродство к этим рецепторам. Соответственно, домен CH2 фрагмента Fc антитела по настоящему изобретению может включать одну или более мутаций, в которых гликозилированный остаток замещен негликозилированным остатком. Структура гликана также может влиять на активность, например, различия в опосредованной комплементом гибели клеток могут наблюдаться в зависимости от количества молекул сахара галактозы (0, 1 или 2) на конце биантенарной цепи гликана. Предпочтительно, гликаны антитела не приводят к иммуногенному ответу у человека после введения.

Кроме того, антитело по настоящему изобретению может быть модифицировано путем интродукции случайных аминокислотных мутаций в определенную область домена CH2 или CH3 тяжелой цепи, чтобы изменить их а связывающую аффинность с FcR и/или их период полужизни в сыворотке по сравнению с немодифицированными антителами. Примеры таких модификаций включают, но ими не ограничиваются, замещения, по меньшей мере, одной аминокислоты из константной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков 250, 314 и 428.

Особенно предпочтительно, фрагмент Fc антитела по настоящему изобретению содержит замещение в положениях CH2 4, CH2 5 или в обоих. В общем, аминокислота в положениях 4 и 5 CH2 IgG1 и IgG3 дикого типа является лейцином ("L"). Предпочтительно, антитело по настоящему изобретению содержит аминокислоту в положении CH2 4, CH2 5 или в обоих, которая не является L. Более предпочтительно, антитело по настоящему изобретению содержит аланин ("A") в положении CH2 4 или CH2 5 или в обоих. Наиболее предпочтительно, антитело по настоящему изобретению содержит как замещение CH2 L4A, так и CH2 L5A. Такие антитела упоминаются в настоящем изобретении обозначают "LALA". Интересно, что такая мутация "LALA" во фрагменте Fc не только приводит к отсутствию вклада соответствующего антитела в антитело-зависимое усиление (ADE) инфекции вируса Зика, но также блокирует антитело-зависимое усиление (ADE) инфекции вируса Зика. Типичная аминокислотная последовательность IgG1 CH1-CH2-CH3, содержащая мутацию "LALA", соответствует SEQ ID NO: 92. Соответственно, аминокислотная последовательность IgG1 CH1-CH2-CH3 находится в соответствии с SEQ ID NO: 92 или его вариант функциональной последовательности, как описано в данном изобретении, где мутация "LALA" сохраняется. Наиболее предпочтительно, антитело имеет формат FIT-Ig, описанный выше, содержащий мутацию "LALA" во фрагменте Fc, согласно описанному в настоящем изобретении.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению не включает сайта связывания рецептора Fc. Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не включает область Fc, еще более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не включает фрагмент Fc. Различные форматы мультиспецифических антител без фрагмента Fc известны в данной области и описаны выше.

Согласно описанному выше, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, предпочтительно специфически связывается с (по меньшей мере, двумя) разными эпитопами белка оболочки вируса Зика (E белок ZIKV). Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII, также обозначаемым DIII). Иначе говоря, предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков домена III белка оболочки вируса Зика (EDIII). ZIKV включает нуклеокапсидную сердцевину, которая включает одноцепочечную РНК, окруженную сердцевинными белками. Нуклеокапсидная сердцевина инкапсулирована липидной двуслойной мембраной с "мембранными белками" и "белками оболочки". Белок оболочки ZIKV (E белок) является доминантным антигеном. Эктодомен белка оболочки включает три разных домена: домен E белка I (EDI), домен II белка E (EDII) и домен III белка E (EDIII). EDIII высоко консервативен среди разных штаммов ZIKV (см. фиг. 8 для вы-

равнивания аминокислотных последовательностей EDIII различных штаммов ZIKV). Антитела, связывающиеся с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII), показывают (i) повышенную нейтрализацию ZIKV и (ii) пониженную перекрестную реактивность с DENV (в частности, по существу отсутствие перекрестной реактивности с DENV) по сравнению с антителами, связывающимися с доменом I/II белка оболочки вируса Зика (EDI/II).

Соответственно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, более предпочтительно связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII) с EDIII, имеющим следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 263):

TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEVEXGXGDXGPKXHPXQMAVDXQTLTPVGRGLITANPVIT

EXTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGXGXKKITHHWHRS

где X может быть какой-либо (природной) аминокислотой. Иначе говоря, предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или более аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 263.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика, (EDIII) с EDIII, содержащим следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 265):

X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>YSLCTAAFTFTKX<sub>4</sub>PAEX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>HGTVTVEVEX<sub>7</sub>QYX<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>DGPKX<sub>10</sub>PX<sub>11</sub>QM

AVDX<sub>12</sub>QTLTPVGRGLITANPVITEX<sub>13</sub>TX<sub>14</sub>NSKMMLELDPPFGDSYIVIGX<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>

KITHHWHRS

в которой X<sub>1</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно K, A или E, X<sub>2</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно V, F, или L, X<sub>3</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно S или F, X<sub>4</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно I или V, X<sub>5</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно T или V, X<sub>6</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно L или D, X<sub>7</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно V или G, X<sub>8</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно A или G, X<sub>9</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно T или A, X<sub>10</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно V или I, X<sub>11</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно A или V, X<sub>12</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно M или T, X<sub>13</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно S или G, X<sub>14</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно E или K, X<sub>15</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно V или I, X<sub>16</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно E, A, K, или D, X<sub>17</sub> может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно E, A, или K, более предпочтительно K или A.

Иначе говоря, предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков последовательности SEQ ID NO: 265.

Например, отрезки EDIII от аминокислоты 309 до аминокислоты 403 белка E ZIKV штамма ZIKV H/PF/2013 (номер в базе данных Genbank KJ776791). Соответственно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, наиболее предпочтительно связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII) с EDIII, имеющим следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 264):

TAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQTLTPVGRGLITANPVITE

STENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRS.

Иначе говоря, предпочтительно, чтобы антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению связывался с белком оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков последовательности SEQ ID NO: 264.

Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков бокового гребня (LR) в EDIII и/или один или несколько аминокислотных остатков шарнирной области EDI-EDIII. EDIII бокового гребня и EDI-EDIII шарнирной области известны специалистам и описаны, например, Zhao H. с соавт., Cell 166(4), 2016, 1016-1027, и Kostyuchenko V.A. с соавт., Nature. 533(7603016), 2016, 425-428. Не ограничиваясь какой-либо теорией, приходят к заключению, что (i) связываясь с LR, можно ингибировать слияние путем захвата переходного состояния слияния вируса и (ii) связываясь с шарниром EDI-EDIII и EDIII можно препятствовать движению EDIII с образованием тримерной структуры после слияния, тем самым останавливая слияние мембран.

Соответственно, предпочтительно, чтобы антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению (были способны) ингибировать стадию после присоединения ZIKV. Понятие

"после присоединения" обычно означает какую-либо стадию инфицирования ZIKV после присоединения ZIKV к мембране клетки (клетки, на которую нацелен ZIKV). Например, предпочтительно, чтобы антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению (были способны) препятствовать слиянию мембран. Кроме того, предпочтительно, чтобы антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению (были способны) вызывать агрегирование ZIKV (частиц). Наиболее предпочтительно, чтобы антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению (были способны) (i) ингибировать стадию после присоединения ZIKV и (ii) вызывать агрегирование ZIKV (частиц). Особенно предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, одну CDR, предпочтительно все шесть CDR, более предпочтительно переменную область, еще более предпочтительно обе переменные области (т.е. сайт связывания эпитопа), в частности специфичность, в качестве примера антитела человека ZKA190, которое связывается с ZIKV EDIII (см. пример 1, фиг. 1). Аминокислотные последовательности CDR и переменные области ZKA190, которые предпочтительно содержатся в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, по настоящему изобретению, описаны в табл. 1 и 2 ниже.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, несмотря на значительную нейтрализующую активность, такие антитела обычно не обнаруживают связывания с рекомбинантным E белком ZIKV или с EDIII ZIKV в стандартном методе ELISA (согласно описанному выше), т.е. при тестировании *in vitro*, в частности, в очищенной форме (то есть с E белком ZIKV "вне/без вириона, вирусоподобной частицы или тому подобного). Таким образом, "невывяляемое связывание" обычно означает, что при использовании стандартного метода ELISA не было обнаружено EC<sub>50</sub> до 10000 нг/мл. Иначе говоря, если обнаруживаемый при стандартном методе ELISA показатель EC<sub>50</sub> выше 10000 нг/мл, значит в таком случае наблюдают "невывяляемое связывание".

Следовательно, такие антитела также упоминаются в настоящем изобретении как "нейтрализующие не-E-связывающие" (neutralizing-non-E-binding - NNB) антитела. Четвертичный эпитоп, локализованный на инфекционном вирионе ZIKV, обычно является конформационным эпитопом. Например, четвертичный эпитоп, локализованный на инфекционном вирионе ZIKV, может формироваться на границе раздела двух мономеров белка оболочки, образуя димер ("эпитоп димера оболочки"; envelope dimer epitope - EDE), или он может формироваться через соседние димеры ("эпитоп, соединяемый по типу ёлочки").

Особенно предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, одну CDR, предпочтительно, все шесть CDR, более предпочтительно, переменную область, еще более предпочтительно обе переменные области (т.е. сайт связывания эпитопа), в частности, специфичность, приведенного в качестве примера антитела человека ZKA230, которое связывается с четвертичным эпитопом, локализованным на инфекционном вирионе ZIKV (см. пример 1, фиг. 1). Аминокислотные последовательности CDR и переменные области ZKA230, которые предпочтительно включены в антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, описаны ниже в табл. 1 и 2.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с доменом II белка оболочки вируса Зика (EDII). EDII является удлиненным напоминающим палец доменом, содержащим консервативную петлю слияния, которая взаимодействует с эндосомальной мембраной клетки-хозяина, простирающейся примерно от аминокислоты в положении 52 до аминокислоты в положении 132 и примерно от аминокислоты в положении 193 до аминокислоты в положении 280 белка E ZIKV (Dai L. с соавт., Cell Host Microbe, 19(5), 2016, 696-704).

Особенно предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, одну CDR, предпочтительно все шесть CDR, более предпочтительно, переменную область, еще более предпочтительно, обе переменные области (т.е. сайт связывания эпитопа), в частности, специфичность, приведенного в качестве примера антитела человека ZKA185, которое связывается с ZIKV EDII. Аминокислотные последовательности CDR и переменных областей ZKA185, которые предпочтительно включены в антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, описаны ниже в табл. 1 и 2.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению (i) связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII) и (ii) связывается с доменом II белка оболочки вируса Зика (EDII). Иначе говоря, предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает (i) сайт связывания эпитопа, который специфически связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII), и (ii) сайт связывания эпитопа, который специфически связывается с доменом II белка оболочки вируса Зика (EDII). Согласно описанному выше, предпочтительно, если домен III белка оболочки вируса Зика включал или состоял из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 263 или 265, в особенности, SEQ ID NO: 264.

Более того, согласно описанному выше, также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или более аминокислотных остатков бокового гребня (LR) EDIII и/или один или более аминокислотных остатков шарнирной области EDI-EDIII. Иначе говоря, сайт связывания эпитопа, нацеливающийся на EDIII, связывается с одним или более аминокислотными остатками бокового гребня (LR) EDIII и/или

одним или более аминокислотными остатками шарнирной области EDI-EDIII.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению (i) связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика Zika (EDIII) и (ii) связывается с четвертичным эпитопом, представленным на инфекционном вирионе ZIKV. Иначе говоря, предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает (i) сайт связывания эпитопа, который специфически связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII), и (ii) сайт связывания эпитопа, который специфически связывается с четвертичным эпитопом, представленным на инфекционном вирионе ZIKV. Согласно описанному выше, предпочтительно, если домен III белка оболочки вируса Зика содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 263 или 265, в особенности, SEQ ID NO: 264. Более того, согласно описанному выше, также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков бокового гребня (LR) EDIII и/или один или несколько аминокислотных остатков шарнирной области EDI-EDIII. Иначе говоря, сайт связывания эпитопа, нацеливающийся на EDIII, предпочтительно связывается с одним или несколькими аминокислотными остатками бокового гребня (LR) EDIII и/или одним или несколькими аминокислотными остатками шарнирной области EDI-EDIII.

В общем, единственный сайт связывания эпитопа (также называемый "паратопом" или "рецептором антигена") антитела по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно содержит три области, определяющие комплементарность (CDR) в тяжелой цепи и (по меньшей мере) три CDR в легкой цепи. В общем, области, определяющие комплементарность (CDR) являются гипервариабельными областями, содержащимися в вариабельных доменах тяжелой цепи, и вариабельными доменами легкой цепи.

Обычно CDR тяжелой цепи и связанной легкой цепи антитела вместе образуют рецептор антигена (сайт связывания эпитопа). Обычно три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) расположены в вариабельном домене не последовательно. Поскольку сайты связывания эпитопа обычно состоят из двух вариабельных доменов (например, на двух разных полипептидных цепях, т.е. тяжелой и легкой цепи), для каждого сайта связывания эпитопа имеется шесть CDR (тяжелая цепь: CDRH1, CDRH2 и CDRH3; легкая цепь: CDRL1, CDRL2 и CDRL3). CDR в тяжелой и/или легкой цепи могут быть разделены каркасными областями, причем каркасная область (framework region - FR) является областью вариабельного домена, которая менее "вариабельная", чем CDR. Например, последовательность (или каждая последовательность, соответственно) может состоять из четырех каркасных областей, разделенных тремя CDR.

Были определены последовательности тяжелых цепей и легких цепей различных примеров антител человека против белка E вируса ZIKV, включающие три разные CDR в тяжелой цепи и три разные CDR в легкой цепи (см. приведенные ниже табл. 1 и 2). Положение аминокислот CDR выражено в соответствии системой нумерации IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>; cf. Lefranc M.-P. С соавт., *Nucleic Acids Res.* 37, 2009, D1006-D1012). Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению comprises по меньшей мере, одну CDR в приводимых ниже примерах антител. Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает все шесть CDR (сайта связывания антитела) в приводимых ниже примерах антител. Еще более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) в приводимых ниже примерах антител.

Таблица 1  
SEQ ID NO аминокислотных последовательностей CDR тяжелой цепи  
(CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и варибельной области тяжелой цепи  
(называемой "VH") типичных антител

Обозначение антитела	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
ZKA190	1	2	3	8
ZKA185	19	20	21	26
ZKA230	37	38	39	44
ZKA78	55	56	57	62
ZKA64	73	74	75	80
ZKA3	99	100	101	102
ZKA4	103	104	105	106
ZKA5	107	108	109	110
ZKA6	111	112	113	114
ZKA7	115	116	117	118
ZKA8	119	120	121	122
ZKA76	123	124	125	126
ZKA117	127	128	129	130
ZKB27	131	132	133	134
ZKB29	135	136	137	138
ZKB34	139	140	141	142
ZKB39	143	144	145	146
ZKB46	147	148	149	150
ZKB53	151	152	153	154
ZKC26	155	156	157	158
ZKD5	159	160	161	162
ZKD7	163	164	165	166
ZKD8	167	168	169	170
ZKD15	171	172	173	174
ZKD16	175	176	177	178
ZKD17	179	180	181	182
ZKD20	183	184	185	186
ZKA134	187	188	189	190
ZKA246	191	192	193	194
ZKA256	195	196	197	198
ZKB42	199	200	201	202
ZKB85	203	204	205	206
ZKB47	207	208	209	210
ZKC6	211	212	213	214
ZKA160	215	216	217	218
ZKA172	219	220	221	222
ZKA174	223	224	225	226
ZKA189	227	228	229	230
ZKA195	231	232	233	234
ZKA215	235	236	237	238
ZKA218	239	240	241	242
ZKB75	243	244	245	246
ZKB83	247	248	249	250
ZKC3	251	252	253	254
ZKC18	255	256	257	258
ZKD1	259	260	261	262

Таблица 2  
SEQ ID NO аминокислотных последовательностей CDR легкой цепи  
(CDRL1, CDRL2 и CDRL3) и варибельной области легкой цепи  
(называемой "VL") типичных антител

Обозначение антитела	CDRL1	CDRL2	CDRL2 long	CDRL3	VL
ZKA190	4	5	6	7	9
ZKA185	22	23	24	25	27
ZKA230	40	41	42	43	45
ZKA78	58	59	60	61	63
ZKA64	76	77	78	79	81

Таким образом, предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению содержит аминокислотные последовательности, которые, по меньшей мере, на 70, по меньшей мере, на 75, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85, по меньшей мере, на 88, по меньшей мере, на 90, по меньшей мере, на 92, по меньшей мере, на 95, по меньшей мере, на 96, по меньшей мере, на 97, по меньшей мере, на 98 или, по меньшей мере, на 99% идентичен, по меньшей мере, одной из последовательностей CDR, последовательности VH и/или последовательности VL, представленных в табл. 1 и/или табл. 2.



































NO: 26, или функциональный вариант этих последовательностей, который, по меньшей мере, на 70, по меньшей мере, на 75, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85, по меньшей мере, на 88, по меньшей мере, на 90, по меньшей мере, на 92, по меньшей мере, на 95, по меньшей мере, на 96, по меньшей мере, на 97, по меньшей мере, на 98 или, по меньшей мере, на 99% идентичен этой последовательности, и/или аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи (VL), соответствующую последовательности SEQ ID NO: 27, или функциональный вариант этих последовательностей, который, по меньшей мере, на 70, по меньшей мере, на 75, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85, по меньшей мере, на 88, по меньшей мере, на 90, по меньшей мере, на 92, по меньшей мере, на 95, по меньшей мере, на 96, по меньшей мере, на 97, по меньшей мере, на 98 или, по меньшей мере, на 99% идентичен этой последовательности.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению предназначен для применения в качестве медикамента. Иначе говоря, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может применяться для приготовления лекарственного средства. Более предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению предназначен для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика. Иначе говоря, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может применяться для приготовления медикамента или применяться для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика. Этот объект подробно описан ниже.

Молекулы нуклеиновых кислот.

Другим объектом, также предусмотренным в настоящем изобретении, является молекула нуклеиновой кислоты, содержащая, по меньшей мере, один полинуклеотид, кодирующий антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению согласно описанному выше или его фрагмент, причем фрагмент включает, по меньшей мере, одну CDR антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента.

Молекула нуклеиновой кислоты является молекулой, предпочтительно состоящей из компонентов нуклеиновых кислот. Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" предпочтительно относится к молекулам ДНК или РНК. В частности, он используется как синоним понятия "полинуклеотид". Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты является полимером, содержащим или состоящим из нуклеотидных мономеров, которые ковалентно связаны друг с другом фосфодиэфирными связями сахара/фосфатного остатка. Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" также охватывает модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, например, модифицированные по основанию, модифицированные сахарами или модифицированные в каркасе молекулы, например, ДНК или РНК.

В молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодируемый фрагмент антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, одну CDR антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента. Табл. 1 и 2 представляют номера SEQ ID аминокислотных последовательностей областей CDR, а также VH и VL типичных антител по настоящему изобретению. Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению предпочтительно содержит полинуклеотид, кодирующий одну или несколько аминокислотных последовательностей, показанных в табл. 1 и 2. Предпочтительно, кодируемый фрагмент антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит три CDR, более предпочтительно все три CDR тяжелой цепи сайта связывания эпитопа (CDRH1, CDRH2, CDRH3) и/или все три CDR легкой цепи сайта связывания эпитопа (CDRL1, CDRL2, CDRL3). Соответственно, предпочтительно, чтобы кодируемый фрагмент антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержал (точно) три или шесть CDR. Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включает полинуклеотид, кодирующий три или шесть аминокислотных последовательностей CDR, показанных в табл. 1 и 2, в частности соответствующие последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и/или последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Более предпочтительно, кодируемый фрагмент антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит варибельную область, например, варибельную область тяжелой цепи (VH) и/или варибельную область легкой цепи (VL). Соответственно, предпочтительно, чтобы кодируемый фрагмент антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержал (точно) одну или две варибельные области. Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению предпочтительно включает полинуклеотид, кодирующий одну или две аминокислотные последовательности варибельной области, показанные в табл. 1 и 2. Наиболее предпочтительно, кодируемый фрагмент антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит (полную) полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Такая (полная) полипептидная цепь может представлять собой, например, (полную) тяжелую цепь или (полную) легкую цепь. Однако такая (полная) полипептидная цепь может также включать элементы как тяжелой, так и легкой цепи, что известно в данной области техники для многих форматов мультиспецифических антител (например, полипептидных цепей, содержащих константные области тяжелой цепи, но также, например, в дополнение к одной или нескольким варибельным областям тяжелой цепи, варибельной области легкой цепи).

Молекула нуклеиновой кислоты может быть моно-, би- или мультицистронной, например, трехцистронной. Молекула бицистронной или мультицистронной нуклеиновой кислоты обычно является моле-

кулой нуклеиновой кислоты, которая обычно может иметь две (бицистронные) или несколько (мультицистронные) открытые рамки считывания (ORF). Открытая рамка считывания в этом контексте является последовательностью кодонов, которая транслируется в пептид или белок. В более общем случае молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, одно антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению. Если больше молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит более одного кодирующего полинуклеотида, тогда второй, третий и последующие полинуклеотиды могут кодировать другие пептиды/белки и/или могут кодировать антитела, например, по настоящему изобретению, или также их фрагменты, которые могут быть такими же или отличными от первой области, кодирующей антитело. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, два кодирующих полинуклеотида, например (точно) два или три кодирующих полинуклеотида, причем все они кодируют идентичные или разные антитела, или их фрагменты, или их варианты. Например, отдельные фрагменты антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению могут кодироваться разными полинуклеотидами на одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может кодировать более одного антитела или фрагмента антитела в одной и той же кодирующей области. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть моно-, би- или мультицистронной.

Например, в одном из предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может быть одноцепочечным антителом. В этом случае предпочтительно, чтобы полная единственная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента кодировалась единственным полинуклеотидом.

Соответственно, предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению была моноцистронной, в частности, она может включать один (единственный) полинуклеотид, кодирующий антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению содержит (точно) две разные полипептидные цепи, например, тяжелая цепь и легкая цепь. Это может быть проиллюстрировано классической гагивной молекулой IgG, которая содержит две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи и, таким образом, две различные полипептидные цепи (даже если антитело, в итоге, содержит четыре полипептидные цепи, они могут кодироваться двумя (разными) полинуклеотидами). Предпочтительно, такие две разные полипептидные цепи (например, тяжелая цепь и легкая цепь) антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению могут кодироваться двумя разными полинуклеотидами, которые могут быть расположены в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например, в бицистронной молекуле нуклеиновой кислоты или в (точно двух) отдельных молекулах нуклеиновой кислоты (например, каждая молекула нуклеиновой кислоты может быть моноцистронной). Таким образом, предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению была бицистронной, в частности она может содержать (точно) два полинуклеотида, кодирующих (вместе) антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению. Также предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержала (по меньшей мере или точно) один полинуклеотид, кодирующий фрагмент антитела, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, как описано выше (например, (полную) полипептидную цепь). Таким образом, предпочтительно, если молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению была моноцистронной. Кроме того, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может кодироваться множеством (например, моноцистронных) молекул нуклеиновых кислот. Например, антитело, содержащее две разных полипептидные цепи, может кодироваться двумя полинуклеотидами, расположенными в двух разных молекулах нуклеиновой кислоты.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению содержит (ровно) три разных полипептидных цепи. Таким образом, предпочтительно, если молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению была трехцистронной (например, кодирующей все три полипептидные цепи в таком антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, по настоящему изобретению). Однако, предпочтительно, если молекула нуклеиновой кислоты является моноцистронной или бицистронной, например, кодирующей одну или две полипептидные цепи, содержащиеся в таком антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, по настоящему изобретению. Например, множество молекул нуклеиновых кислот, например, двух или трех молекул нуклеиновых кислот, могут кодировать (вместе) антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению.

Например, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению особенно предпочтительно в формате Fabs-in-tandem-Ig (FIT-Ig), который обычно включает следующие три полипептидные цепи:

полипептид 1, содержащий или состоящий из легкой цепи внешнего Fab и тяжелой цепи внутреннего Fab, включая константные домены CH1-CH2-CH3, предпочтительно с мутацией "LALA", как описано выше, причем предпочтительно легкая цепь внешнего Fab гибридизирована, предпочтительно через лин-

керы, с N-концом тяжелой цепи внутреннего Fab;

полипептид 2, содержащий или состоящий из тяжелой цепи внешнего Fab (VH и CH1 внешнего Fab); и

полипептид 3, содержащий или состоящий из легкой цепи внутреннего Fab.

Соответственно, такой FIT-Ig предпочтительно может кодироваться одной (например, трицистронной) молекулой нуклеиновой кислоты, тремя (например, моноцистронной) молекулой нуклеиновой кислоты или двумя (например, одной моноцистронной, одной бицистронной) молекулами нуклеиновой кислоты.

Соответственно, предпочтительно, чтобы такая молекула нуклеиновых кислот по настоящему числу содержала полинуклеотид, кодирующий полипептид 1 антитела FIT-Ig по настоящему уровню. Более предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты не содержит полинуклеотидов, кодирующих полипептид 2 или полипептид 3 антитела FIT-Ig по настоящему определению. Такая молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно является моноцистронной.

Также предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему количеству содержала полинуклеотид, кодирующий полипептид 2 антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Более предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты не содержит полинуклеотидов, кодирующих полипептид 1 или полипептид 3 антитела FIT-Ig по настоящему определению. Такая молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно является моноцистронной.

Также предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему количеству содержала полинуклеотид, кодирующий полипептид 3 антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Более предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты не содержит полинуклеотидов, кодирующих полипептид 1 или полипептид 2 антитела FIT-Ig по настоящему определению. Такая молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно является моноцистронной.

Также предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержала полинуклеотид, кодирующий полипептид 1, и полинуклеотид, кодирующий полипептид 2 антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Более предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты не содержит полинуклеотида, кодирующего полипептид 3 антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Такая молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно является бицистронной.

Также предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему количеству содержала полинуклеотид, кодирующий полипептид 1, и полинуклеотид, кодирующий полипептид 3, антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Более предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты не содержит полинуклеотида, кодирующего полипептид 2 антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Такая молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно является бицистронной.

Также предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержала полинуклеотид, кодирующий полипептид 2, и полинуклеотид, кодирующий полипептид 3, антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Более предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты не содержит полинуклеотида, кодирующего полипептид 1 антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Такая молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно является бицистронной.

Особенно предпочтительно, если молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включает полинуклеотид, кодирующий полипептид 1, полинуклеотид, кодирующий полипептид 2, и полинуклеотид, кодирующий полипептид 3, антитела FIT-Ig по настоящему изобретению. Такая молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно является трицистронной.

В общем, молекула нуклеиновой кислоты может быть молекулой ДНК или молекулой РНК. Примеры молекул нуклеиновой кислоты и/или полинуклеотидов включают, например, рекомбинантный полинуклеотид, вектор, олигонуклеотид, молекулу РНК, например, рРНК, мРНК, микроРНК, миРНК или тРНК, или молекулу ДНК, например, кДНК. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты является плазмидной ДНК или молекулой мРНК. Плазмидная ДНК является кольцевой, предпочтительно двухцепочечной молекулой ДНК.

В приведенной ниже табл. 3 указаны номера SEQ ID для приведенных в качестве примеров последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CDR, а также VH и VL, приведенных в качестве примеров последовательностей антител по настоящему изобретению. Из-за избыточности генетического кода настоящее изобретение также включает варианты последовательностей соответствующих нуклеиновых кислот и, в частности, такие варианты последовательностей, которые кодируют одинаковые аминокислотные последовательности.

Таблица 3

Последовательности нуклеиновых кислот CDR, варибельной области тяжелой цепи (VH) и варибельной области легкой цепи (VL) пяти типичных антител ("ZKA190", "ZKA64", "ZKA230", "ZKA185", "ZKA78"), приведенные в качестве примеров

ZKA190	SEQ ID NO.	Последовательности аминокислоты
CDRH1	10	<b>ggattcaccttcagtaaatatggc</b>
CDRH2	11	<b>atatcatatgaggggaagtaataaa</b>
CDRH3	12	<b>gcgaaatcggggaccocaaactactatgatactactggttatgagtat aggggttggaaactcttggctac</b>
CDRL1	13	<b>cagagtgtagtagcagttac</b>
CDRL2	14	<b>gatgcatcc</b>
CDRL2 long	15	ctcatctatgatgcatccagcagggcc
CDRL3	16	<b>cagcagtaggttaggtcaaggtggaca</b>
VH	17	caggtgcagctgggtggagctctgggggagcgtgggtccagcctggg aggtccctgagactctcctgtgcagcctct <b>ggattcaccttcagt aaata</b> tggc atgcactgggtccgcagggctccaggcaagggctg gagtggtggcagttatatacatatgaggggaagtaataaaatattat gcagactccgtgaaggccgatccaccatctccagagacaattcc aagaaacagctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggac acggcagtgattactgt <b>gcgaaatcggggaccocaaactactatgat actactgggttagagtaggggttggaaactcttggctactgg ggccagggaaccctgggtcaccgtctcctcag</b>
VL	18	gaaattgtgttgacgcagctctccaggcaaccctgtctttgtctcca gggaaagagccaaccctctcctgcagggccagt <b>cagagtgtagt agcagttact</b> tagcctgggtaccagcagaaacgtggccaggctccc aggtccctcatctatgatgcatccagcagggccactggcatccca gacaggttcagtgccagtggtctgggacagactcactctcacc atcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtagtactgt <b>cag cagtaggttaggtcaaggtggacattcggccaagggaaccaaggtg gaaatcaaac</b>
ZKA185	SEQ ID NO.	Последовательности аминокислоты
CDRH1	28	<b>ggatatagttttaccagttactgg</b>
CDRH2	29	<b>tttgatcctagtgactctcaaac</b>
CDRH3	30	<b>gcgagaagatattgtagtagtagttagttgttatgtggacaat</b>
CDRL1	31	<b>gcattgccaaataaattt</b>
CDRL2	32	<b>gaggacaac</b>
CDRL2 long	33	gtcatctatgaggacaacaaacgaccc
CDRL3	34	<b>tactcaacagacagcagttctaatccccctgggagta</b>
VH	35	gaagtgcagctgggtgcagtcgggagcagaggtgaaaaagccggg gagtccttgaggatctcctgtaaggttct <b>ggatatagttttacc agttactgg</b> atcacctgggtgcgccagatgccgggaaaggcctg gagtggtggcgaagt <b>ttgatcctagtgactctcaaac</b> caactac agcccgctccttccaaggccaactcaccatctcagttgacaagtcc atcagcactgcctacttgagtgagcagcctgaaggcctoggac accgcaatgtattactgt <b>gcgagaagatattgtagtagtagtagt tgttatgtggacaattggggccagggaaccctgggtcaccatcttc tcag</b>

VL	36	t c c t a t g a g c t g a c a c a g c c a c c c t c g g t g t c a g t g t c c c c a g g a c a a c g g c c a g g a t c a c c t g c t c t g g a g a t <b>g c a t t g c c a a a t a a a t t t g c t t a t t g g t a c c g g c a g a a g t c a g g c c a g g c c c c t g t t c t g t c a t c t a t g a g g a c a a c a a c g a c c c t c c g g a t c c c t g a g a g a t t c t c t g g c t c c a g c t c a g g a c a a t g g c c a c c t t g a c t a t c a g t g g g c c c a g t g g a g g a t g a a g c t g a c t a c c a c t g t <b>t a c t c a a c a g a c a g c a g t t c t a a t c c c t g g g a g t a t c g g c g g a g g g a c c a a g c t g a c c g t c c t a g</b></b>
ZKA230	SEQ ID NO.	Последовательности аминокислоты
CDRH1	46	<b>g g t g g c t o c a t c a g t a g t g a c t a c</b>
CDRH2	47	<b>a t c t a t t a c a g t g g g a g c a c c</b>
CDRH3	48	<b>g c g a g g a g g a g a g t a t g a t t c c c t t t g g g g a g t t t t g c t t t g a t a t c</b>
CDRL1	49	<b>a g c t o c a a c a t c g g a g g t a a t t a t</b>
CDRL2	50	<b>a t t a a t g a t</b>
CDRL2 long	51	c t c a t c t g t a t t a a t g a t c a c c g g c c c
CDRL3	52	<b>g c a a c a t g g g a t g a c a g c c t g g g t g g c c t t g t a</b>
VH	53	c a g g t g c a g c t g c a g g a g t c g g g c c c a g g c c t g g t g a a g c c t c g g a g a c c c t g t c c c t c a c c t g c g c a g t c t c t <b>g g t g g c t c c a t c a g t a g t g a c t a c t g g a g c t g g a t c c g g c a g c c c c a g g a a g g a c t g g a g t g g a t t g g g t a t a t c t a t t a c a g t g g g a g c a c c a a c t a c a c c c c t c c a a g a g t c g a g t c a c c a t a t c a g t a g a c a c g t c c a a g a a c c a c t t c c c t g a a g c t g a a c t c t g t g a c c g c t g c g g a c a c g c c g t g t a t t a c t g t <b>g c g a g g a g g a g a a g t a t g a t t c c c t t g c g g a g t t t t g c t t t g a t a t c g g g c c a a g g a c a a t g g t c a c c g t c t t c a g</b></b>
VL	54	c a g t c t g t g c t g a c t c a g c c a c c c t c a g e g t e t g g g a c c c c g g g c a g a g g g t c a c c a t c t c t g t t c t g t g a a g <b>a g e t c c a a c a t o g g a g g t a a t t a t g t a t a c t g g t a c c a g c a g c t c c c a g g a a c g g c c c c a a a c t c c t c a t c t g t a t t a a t g a t c a c c g g c c c t c a g g g t c c c t g a c c g a t t c t c t g g c t c c a a g t c t g c a c c c t c a g c c t c c c t g g c a t c a g t g g g c t c c a g t c c g a g g a t g a g g c t g a t t a t t a c t g t <b>g c a a c a t g g g a t g a c a g c c t g g g t g g c c t t g t a t c g g c g g a g g g a c c a a g c t g a c c c t c c t a g</b></b>
ZKA78	SEQ ID NO.	Последовательности аминокислоты
CDRH1	64	<b>g g c t t c a c t t t t a g t a a c t a t g c a</b>
CDRH2	65	<b>a t c g g g c g c a a c g g g a c t c t a t c</b>
CDRH3	66	<b>g t g a a g a t c t g g c a t c c c c a g t c c t a c a g a a t t g a a g c t g a t t a t</b>
CDRL1	67	<b>c a g t c c g t g c t g t a c c g c t c t a a c a a c a a g a a t t a c</b>
CDRL2	68	<b>t g g g c t t c a</b>
CDRL2 long	69	c t g a t c t a t t g g g c t t c a a c c c g g g a a
CDRL3	70	<b>c a g c a g t a c t a t t c t a g t c c t e g a a c t</b>
VH	71	g a g g t g c a g t g g c a g a a t c a g g c g g g g a c t g g t c c a g c c t g g c g g c a g c c t g a c a c t g t c t t g c a g t g g a t c a <b>g g c t t c a c t t t t a g t a a c t a t g o a a t g g t g t g g g c a a g g c a g g c t c c t g g g a a g g a c t g g a t a g t c t c t g g c a t c g g g c g c a a c g g g a c t c t a t c t a c t a t a c t g a t g t g a a g g c g g t t c a c c a t c a g c a g a g a c a a t a g c a a a t c a t g g t g t a c c t g c a g a t g a g c t c c c t g c g a a c c g a a g a c a c a g c a g t g t a c t a t t g c g t g a a a g a t c t g g c a t c c c c a g a t c c t a c a g a a t t g a a g c t g a t t a t t g g g a c a g g g a c c c t g g t c a t c g t g a g c c c g</b>
VL	72	g a c a t c g t g a t g a c a c a g t c t c c a g a t a g t c t g g c a g t c a g t c t g g g g a g a g g g c a c t a t t a a c t g c a a g a g c t c c <b>a g t c c g t g c t g t t a c c g c t o t a a c a a a g a a t t a c c t g t c t t g g t a t c a g c a g a a g c c c g g a c a g c c c c t a a a c t g c t g a t c t a t t g g g c t c a a c c c g g g a a g c g g t c c c a g a c a g a t t c t c a g g c a g c g g t c c g g a a c a g a c t t c a c c c t g a c a a t t a g c c c c t g c a g g c a g a g g a c g t g g c t g t c t a c t a t t g t <b>c a g c a g t a c t a t t c t a g t c c t o c t g a a c t t t c g g c c a g g g a c c a a g g t g g a a t c a a a c</b></b>
ZKA64	SEQ ID NO.	Последовательности аминокислоты
CDRH1	82	<b>g g c t a c a c c t t c a c a g g g t a t a c c</b>
CDRH2	83	<b>a t t a a c c o t a a t t c t g g e g g g a c c</b>
CDRH3	84	<b>g c t o g g a t g a g c t c c t c t a t t t g g g c t t o g a t c a t</b>
CDRL1	85	<b>c a g t c t g t g c t g a t t a a c</b>
CDRL2	86	<b>g g a g c a t c c</b>
CDRL2 long	87	c t g a t c t a t g g a g c a t c c c c a g g g c t
CDRL3	88	<b>c a g c a g t a c a a t g a t t g g c c c c t a t e a c a</b>
VH	89	c a g g t g c a g c t g g t c c a g a g c g g a g c a g a g g t g a a g a a a c c c g g c g c c t c a g t a a g g t c a g c t g c a a a g c t t c c <b>g g t a c a c c t t c a c a g g g t a c a c a t c g a c t g g g t g a g g c a g g c a a g a g a c a g g a c t g g a a t g g a t g g g a c g g a t t a a c c o t a a t t c t g g g g g a c c a a c t a c g c c a g a a g t t t c a g g c c a g t g a c t a t g a c c a g a g a c a c c a g c a t c t c c a c a g c t t a t a t g c a g c t g t c c c g g c t g a g a t c t g a c g a t a g t g c c g t c t a c t a t t g t <b>g c t c g g a t g a g c t c c t c t a t t t g g g c t t c g a t c a t t g g g g c a g g g a c a c t g g t g a c t g t c a g t t c a g g a g a t c g t a c t c a g t c t c c a g c c a c c c t g t c a g t c a g c c c a g g a a c g g g c a a c c c t g t c t t g c a g a g c c t c c <b>a g t c t g t g c t g a t t a a c c t g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c a g g c c a g g c a c c c c g a c t g t g a t c t a t g g a g c a t c c c a g g g c t a c c g g c a t t c c t g c a c g c t t c a g t g g a t c a g g a a g c g g a a c a g a g t t t a c c c t g a c a a t c t a g t c t g c a g t c c g a a g a c t c g c t g t c t a c t a t t g t <b>c a g c a g t a c a a t g a t t g g c c c c t a t c a c a t t t g g c c a g g g a c t a g a c t g g a t c a a g c</b></b></b></b>
VL	90	g a g a t c g t g a t g a c t c a g t c t c c a g c c a c c c t g t c a g t c a g c c c a g g a a c g g g c a a c c c t g t c t t g c a g a g c c t c c <b>a g t c t g t g c t g a t t a a c c t g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c a g g c c a g g c a c c c c g a c t g t g a t c t a t g g a g c a t c c c a g g g c t a c c g g c a t t c c t g c a c g c t t c a g t g g a t c a g g a a g c g g a a c a g a g t t t a c c c t g a c a a t c t a g t c t g c a g t c c g a a g a c t c g c t g t c t a c t a t t g t <b>c a g c a g t a c a a t g a t t g g c c c c t a t c a c a t t t g g c c a g g g a c t a g a c t g g a t c a a g c</b></b>

Предпочтительно, последовательность молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включает или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующей последовательностям SEQ ID NO: 10-18, 28-36, 46-54, 64-72 и 82-90; или функционального варианта этой последовательности.

Также предпочтительно, чтобы последовательностями нуклеиновых кислот по настоящему изобре-

тению были такие последовательности нуклеиновых кислот, которые, по меньшей мере, на 70, по меньшей мере, на 75, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85, по меньшей мере, на 88, по меньшей мере, на 90, по меньшей мере, на 92, по меньшей мере, на 95, по меньшей мере, на 96, по меньшей мере, на 97, по меньшей мере, на 98 или по меньшей мере, на 99% идентичны нуклеиновой кислоте, кодирующей CDR, последовательность VH и/или последовательность VL, представленную в табл. 1 и 2, например, к последовательностям, представленным в табл. 3.

В общем, молекула нуклеиновой кислоты может быть изменена путем инсерции, делеции или изменения определенных последовательностей нуклеиновых кислот. Изменения от таких манипуляций включают, но ими не ограничиваются, изменения для интродукции сайтов рестрикции, для изменения использования кодонов, для добавления или оптимизации транскрипционных и/или трансляционных регуляторных последовательностей и т.д. Также можно изменить нуклеиновую кислоту, чтобы изменить закодированные аминокислоты. Например, может быть полезным интродуцировать одно или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т.д.) аминокислотных замещений, делеций и/или инсерций в последовательность аминокислот антитела. Такие точечные мутации могут модифицировать эффекторные функции, антигенсвязывающую аффинность, посттрансляционные модификации, иммуногенность и т.д., могут интродуцировать аминокислоты для присоединения ковалентных групп (например, меток) или могут интродуцировать метки (например, с целью очистки). Мутации могут быть интродуцированы в определенные сайты или могут быть интродуцированы случайным образом с последующим отбором (например, молекулярная эволюция). Например, одна или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих какую-либо из областей CDR, последовательность VH и/или последовательность VL (типичного) антитела по настоящему изобретению, могут быть случайно или направленно мутированы для внедрения различных свойств в кодируемые аминокислоты. Такие изменения могут быть результатом случайного процесса, причем первоначальные изменения сохраняются и интродуцируются новые изменения в других положениях нуклеотидов. Кроме того, изменения, достигнутые на независимых стадиях, могут быть объединены. Различные свойства, интродуцируемые в кодируемые аминокислоты, могут включать, но этим не ограничиваются, повышенную аффинность.

Другой объект настоящего изобретения также относится к множеству молекул нуклеиновой кислоты, согласно описанному выше, причем каждая молекула нуклеиновой кислоты содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, кодирующий фрагмент антитела, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, согласно описанному выше. Предпочтительно, множество фрагментов, кодируемых множеством молекул нуклеиновой кислоты, формирует антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению. Иначе говоря, предпочтительно, если множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует (полное) антитело, или (полный) его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению. Это означает, что, в частности, дополнительные молекулы нуклеиновой кислоты (дополнительно к множеству молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению) не требуются для кодирования/получения (полного) антитела, или (полного) его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению. Например, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирует все полипептидные цепи антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению.

Предпочтительным примером множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению являются (точно) две молекулы нуклеиновой кислоты, причем каждая из молекул нуклеиновой кислоты содержит единственный или более чем один (например, два или три) полинуклеотида, и каждый полинуклеотид кодирует (отличную от других) полипептидную цепь антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению. Соответственно, молекулы нуклеиновой кислоты такого множества молекул нуклеиновой кислоты предпочтительно являются моно- или бистронными.

Примером являются две молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вместе антитело FIT-Ig по настоящему изобретению, согласно описанному выше (например, одна молекула бистронной нуклеиновой кислоты в комбинации с соответствующей молекулой моноцистронной нуклеиновой кислоты, сочетанные таким образом, что полипептиды 1, 2 и 3 FIT-Ig кодируются двумя молекулами нуклеиновых кислот, согласно описанному выше).

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают (точно) три молекулы нуклеиновой кислоты, причем каждая из молекул нуклеиновой кислоты содержит один полинуклеотид, кодирующий (отличную) полипептидную цепь антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению. Соответственно, молекулы нуклеиновой кислоты в таком множестве молекул нуклеиновой кислоты предпочтительно являются моноцистронными. Примерами являются три молекулы нуклеиновой кислоты, совместно кодирующие антитело FIT-Ig по настоящему изобретению, согласно описанному выше (например, три (например, моноцистронные) молекулы нуклеиновой кислоты, одна из которых кодирует полипептид 1 из FIT-Ig, вторая кодирует полипептид 2 из FIT-Ig и третья кодирует полипептид 3 из FIT-Ig, согласно описанному выше).

Вектор.

В настоящем изобретении также описывают векторы, например, векторы экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Предпочтительно, вектор содержит молекулу

кулу нуклеиновой кислоты, согласно описанному выше. Понятие "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, то есть к молекуле нуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе. Вектор в контексте настоящего изобретения применим для включения или хранения требуемой последовательности нуклеиновой кислоты. Такие векторы могут быть векторами хранения, векторами экспрессии, векторами клонирования, векторами переноса и т.д. Вектором хранения является вектор, который обеспечивает удобное хранение молекулы нуклеиновой кислоты. Например, вектор может содержать последовательность, соответствующую, например, требуемому антители, или фрагменту этого антитела, по настоящему изобретению. Вектор экспрессии может быть использован для получения продуктов экспрессии, например, РНК, например, мРНК, или пептидов, полипептидов или белков. Например, вектор экспрессии может содержать последовательности, необходимые для транскрипции отрезка последовательности вектора, например, последовательности промотора. Вектор клонирования обычно является вектором, который содержит сайт клонирования, применимый для включения последовательностей нуклеиновых кислот в вектор. Клонированным вектором может быть, например, плазмидный вектор или бактериофаговый вектор. Вектор переноса может быть вектором, который применим для переноса молекул нуклеиновой кислоты в клетки или организмы, например, вирусные векторы. Вектор в контексте настоящего изобретения может быть, например, РНК-овым вектором или ДНК-овым вектором. Предпочтительно вектор представляет собой молекулу ДНК, например, плазмидной ДНК. Например, вектор в контексте настоящего изобретения содержит сайт клонирования, селективный маркер, например, признак устойчивости к антибиотику, и последовательность, применимую для размножения вектора, например, точки начала репликации. Предпочтительно вектор в контексте настоящего изобретения является плазмидным вектором.

Другой объект настоящего изобретения также предусматривает множество векторов по настоящему изобретению, предпочтительно кодирующих антители, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению. Соответственно, предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и примеры множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанные выше, также применимы для множества векторов по настоящему изобретению.

Клетки.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения также предусматривают клетки, экспрессирующие антители, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению; и/или включающие вектор по настоящему изобретению или множество векторов по настоящему изобретению.

Примерами таких клеток являются, но ими не ограничиваются, эукариотические клетки, например дрожжевые клетки, клетки животных или растительные клетки. Предпочтительно, клетки являются клетками млекопитающих, более предпочтительно, линиями клеток млекопитающих. Предпочтительные примеры включают клетки человека, клетки CHO, клетки HEK293T, клетки PER.C6, клетки NS0, клетки печени человека, клетки миеломы или клетки гибридомы.

В частности, клетка может быть трансфицирована вектором по настоящему изобретению или множеством векторов по настоящему изобретению, предпочтительно вектором экспрессии или их множеством. Понятие "трансфекция" относится к введению молекул нуклеиновой кислоты, например, молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки. В контексте настоящего изобретения понятие "трансфекция" охватывает какой-либо метод, известный специалисту, для интродукции молекул нуклеиновой кислоты в клетки, предпочтительно, в эукариотические клетки, например, в клетки млекопитающих. Такие методы включают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основе катионных липидов и/или липосом, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вирусов или трансфекцию на основе катионных полимеров, например, DEAE-декстрана или полиэтиленimina и т.д. Предпочтительно интродукция на основана на вирусах.

Более того, клетки по настоящему изобретению могут быть трансфицированы стабильно или временно вектором по настоящему изобретению или множеством векторов по настоящему изобретению, например, для экспрессии антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению. Предпочтительно, клетки стабильно трансфицируют вектором по настоящему изобретению или множеством векторов по настоящему изобретению, кодирующих антители, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительно, чтобы клетки были временно трансфицированы вектором по настоящему изобретению или множеством векторов по настоящему изобретению, кодирующих антители, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению.

Необязательные дополнительные свойства антител.

Антитела по настоящему изобретению могут быть объединены, например, с лекарственным средством доставки к месту лечения или связаны с обнаруживаемой меткой для облегчения визуализации места, содержащего исследуемые клетки. Методы связывания антител с лекарственными средствами и обнаруживаемыми метками известны специалистам в данной области, также, как и методы визуализации с использованием обнаруживаемых меток. Антитела с меткой могут быть использованы в самых разных анализах с использованием самых разных меток. Обнаружение образования комплекса антитело-антиген

между антителом по настоящему изобретению и представляющим интерес эпитопом может быть облегчено присоединением обнаруживаемого вещества к антителу. Приемлемые средства обнаружения включают, например, такие метки, как радионуклиды, ферменты, коферменты, флуорофоры, хемилюминесцирующие соединения, хромогены, ферментные субстраты или кофакторы, ингибиторы ферментов, комплексы простетических групп, свободные радикалы, частицы, красители и другие. Примеры применимых ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, Р-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетической группы включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеина, дансилхлорид или фикоэритрин; примером люминесцентного материала является люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; примеры подходящих радиоактивных материалов включают  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^3\text{H}$ . Такие меченые реагенты могут быть применены в разных известных анализах, таких как радиоиммуноанализы, иммуноферментные анализы, например, ELISA, флуоресцентные иммуноанализы и другие. Таким образом, меченые антитела по настоящему изобретению могут быть использованы в таких анализах, например, согласно описанию в патентах US 3766162; US 3791932; US 3817837; US 4233402.

Антитело по настоящему изобретению может быть конъюгировано с лекарственной составляющей, например, с фрагментом терапевтической молекулы, например, с цитотоксином, терапевтическим агентом или радиоактивным металлом или радиоизотопом. К примерам радиоизотопов относятся, но ими не ограничиваются, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 и другие. Такие конъюгаты антител могут быть применены для модификации данного биологического ответа; лекарственная составляющая не должна рассматриваться как ограниченная классическими химическими терапевтическими агентами. Например, фрагмент лекарственной молекулы может быть белком или полипептидом, обладающим требуемой биологической активностью. К таким белкам могут относиться, например, токсин, например, такой как абрин, ризин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин.

Способы конъюгирования такого терапевтического фрагмента с антителами хорошо известны. См., например, Arnon с соавт., в кн.: "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", под ред. Reisfeld с соавт., 1985, (Alan R. Liss, Inc.), 243-256; Hellstrom с соавт. в кн.: "Controlled Drug Delivery" под ред. Robinson с соавт., 1987, (2е издание; Marcel Dekker, Inc.), 623-653; Thorpe, в кн.: "Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications", под ред. Pinchera с соавт., 1985, 475-506 (Editrice Kurtis, Милан, Италия, 1985); в кн.: "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", под ред. Baldwin с соавт., 1985, (Academic Press, Нью-Йорк, 1985), 303-316; Thorpe с соавт., Immunol. Rev. 62, 1982, 119-158.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела может быть конъюгировано со вторым антителом, или фрагментом этого антитела, для формирования гетероконъюгата антитела согласно описанию в US 4676980. Кроме того, линкеры могут быть применены между метками и антителами по настоящему изобретению, например, согласно описанию в US 4831175. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть непосредственно помечены радиоактивным йодом, индием, иттрием или другими радиоактивными частицами, известными в данной области техники, например, согласно описанию в US 5595721. Лечение может состоять из комбинации лечения конъюгированными и неконъюгированными антителами, вводимыми одновременно или последовательно, например, согласно описанию в WO 00/52031; WO 00/52473.

Антитела по настоящему изобретению также могут быть присоединены к твердой подложке. Дополнительно, антитела по настоящему изобретению или функциональные фрагменты этих антител могут быть химически модифицированы путем ковалентного конъюгирования с полимером, например, для увеличения их периода полужизни в кровотоке. Примеры полимеров и методов присоединения к ним пептидов показаны в US 4766106, US 4179337, US 4495285 и US 4609546. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полимеры могут быть выбраны из полиоксиэтиленированных полиолов и полиэтиленгликоля (polyethylene glycol - PEG). PEG растворим в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу:  $\text{R}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n\text{O}-\text{R}$ , в которой R может быть водородом или защитной группой, например, алкильной или алканольной группой. Предпочтительно, защитная группа может содержать от 1 до 8 атомов углерода. Например, защитной группой является метил. Буква "n" обозначает положительное целое число. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения n означает число от 1 до 1000. В другом варианте осуществления настоящего изобретения n означает число от 2 до 500. Предпочтительно, средняя молекулярная масса PEG составляет от 1000 до 40000, более предпочтительно молекулярная масса PEG составляет от 2000 до 20000, еще более предпочтительно молекулярная масса PEG составляет от 3000 до 12000. Кроме того, PEG может содержать, по меньшей мере, одну гидроксильную группу, например, PEG может содержать одну концевую гидроксильную группу. Например, это концевая гидроксильная группа, которая активируется для взаимодействия со свободной аминогруппой в ингибиторе. Однако следует учитывать, что тип и количество реакционноспособных групп может варьироваться для достижения ковалентно конъюгированных ПЭГ/антитела по настоящему изобретению.

Водорастворимые полиоксиэтиленированные полиолы также применимы в настоящем изобретении. К

ним относятся полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированная глюкоза, полиоксиэтилированный глицерин (polyoxyethylated glycerol - POG) и другие. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения используют POG. Не опираясь на какую-либо теорию, авторы высказывают предположение, что поскольку глицериновый каркас молекулы полиоксиэтилированного глицерина такой же, как в природной молекуле, например, у животных и людей в моно-, ди- и триглицеридах, такое разветвление не обязательно будет рассматриваться в качестве чужеродных агентов в организме. POG может иметь молекулярную массу в том же диапазоне, что и PEG. Другой системой доставки лекарств, которая может быть использована для увеличения периода полужизни в кровеносной системе, является липосома. Методы приготовления систем доставки липосом известны специалистам в данной области. Другие системы доставки лекарств известны в данной области и описаны, например, в ссылках на Poznansky с соавт. (1980) и Poznansky (1984).

Антитела по настоящему изобретению могут быть получены в очищенной форме. Обычно антитело может содержаться в композиции, которая практически не содержит других полипептидов, например, менее 90% (по массе), обычно менее 60 и чаще менее 50% композиции состоит из других полипептидов.

Антитела по настоящему изобретению могут быть иммуногенными в организме гетерологичных хозяев (не людей), например у мышей. В частности, антитела могут иметь идиотоп, который является иммуногенным для хозяина, не являющегося человеком, но не для хозяина человека. В частности, антитела по настоящему изобретению для применения людьми включают антитела, которые сложно выделить из хозяев, например, из мышей, коз, кроликов, крыс, млекопитающих, не относящихся к приматам, и т.д., и которые, как правило, не могут быть получены гуманизированием или от ксено-мышей.

Фармацевтическая композиция.

Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтическую композицию, включающую один или несколько следующих компонентов:

- (i) антитело, или фрагмент этого антитела, по настоящему изобретению,
- (ii) молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению,
- (iii) вектор или множество векторов по настоящему изобретению, и/или
- (iv) клетки по настоящему изобретению.

Иначе говоря, настоящее изобретение также предусматривает фармацевтическую композицию, включающую антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению и/или клетки по настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция предпочтительно также может содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент. Хотя носитель или эксципиент могут облегчить введение, сам по себе он не должен вызывать выработку антител, вредных для индивидуума, которому вводят композицию. Кроме того, они не должны быть токсичными. Подходящими носителями могут быть крупные медленно метаболизируемые макромолекулы, например, белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицоловые кислоты, полимерные аминокислоты, аминокислотные сополимеры и неактивные вирусные частицы. В общем, фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут быть активными компонентами или неактивными компонентами. Предпочтительно, фармацевтически приемлемый носитель в фармацевтической композиции по настоящему изобретению не является активным компонентом в отношении инфекции вирусом Зика.

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

Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, например, смачивающие или эмульгирующие агенты или pH-буферные вещества. Такие носители позволяют составлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий и суспензий для приема внутрь субъектом.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в различных формах. Например, композиции могут быть приготовлены в виде инъекционных препаратов, в виде либо жидких растворов, либо суспензий. Также могут быть приготовлены твердые формы, которые могут быть в форме раствора или суспензии, в жидких носителях, приготавливаемых перед инъекцией (например, лиофилизированная композиция типа Synagis™ и Herceptin™, для разведения стерильной водой, содержащей консервант). Композиция может быть приготовлена для местного введения, например, в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть приготовлена для перорального введения, например, в виде таблеток или капсул, в виде спрея или в виде сиропа (необязательно ароматизированного). Композиция может быть приготовлена для введения в легкие, например, в виде ингалятора, с ис-

пользованием мелкого порошка или спрея. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория или пессария. Композиция может быть приготовлена для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Композиция может быть в форме набора, составленного таким образом, что комбинированную композицию восстанавливают непосредственно перед введением субъекту. Например, лиофилизованное анти тело может быть представлено в форме набора со стерильной водой или стерильным буфером.

Предпочтительно, чтобы активный ингредиент в композиции был молекулой анти тела, фрагментом анти тела, его вариантом или производным, в частности, чтобы активный ингредиент в композиции представлял анти тело, фрагмент анти тела или его варианты и производные по настоящему изобретению. Активный ингредиент может быть подвержен деградации в желудочно-кишечном тракте. Так, если композицию следует вводить через желудочно-кишечный тракт, композиция может содержать агенты, которые защищают анти тело от разрушения, но которые высвобождают анти тело после его всасывания в желудочно-кишечном тракте.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей приведено в кн.: Gennaro Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 2000, 20-е изд., ISBN: 0683306472.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно имеют pH от 5,5 до 8,5, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения это может быть от 6 до 8, в других вариантах осуществления настоящего изобретения - около 7. Величина pH может поддерживаться за счет использования буфера. Композиция может быть стерильной и/или пирогенной. Композиция может быть изотонической по отношению к человеку. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению поставляются в герметично закрытых контейнерах.

В рамки охвата настоящего изобретения входят композиции, разработанные в нескольких формах введения; формы включают, но ими не ограничиваются, формы, пригодные для парентерального введения, например, инъекцией или инфузией, например болюсной инъекцией или непрерывной инфузией. Если продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может принимать форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном растворителе и может содержать рецептурные агенты, например, суспендирующие, консервирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В другом варианте осуществления настоящего изобретения молекула анти тела может находиться в сухой форме, и для восстановления перед применением его восстанавливают соответствующей стерильной жидкостью. Под растворителем обычно понимают материал, который пригоден для хранения, транспортировки и/или введения соединения, например, фармацевтически активного соединения, в частности, анти тела по настоящему изобретению. Например, растворитель может быть физиологически приемлемой жидкостью, которая подходит для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтически активного соединения, в частности анти тел по настоящему изобретению. После составления композиции по настоящему изобретению, ее можно вводить непосредственно субъекту. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, композиции адаптированы для введения млекопитающим, например, людям.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться многочисленными способами, включая, но не ограничиваясь ими, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, внутрибрюшинный, интратекальный, интравентрикулярный, трансдермальный, чрескожный, местный, подкожный, интраназальный, энтеральный, подъязычный, интравгинальный или ректальный. Гипоспреи (безыгольные инжекторы) также могут быть использованы для введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Предпочтительно, фармацевтическая композиция может быть приготовлена для перорального введения, например, в виде таблеток, капсул и других форм, для местного применения, или в виде инъекционных форм, например, в виде жидких растворов или суспензий, причем особенно предпочтительно, если фармацевтическая композиция представляет инъекционный препарат. Твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких носителях для инъекций, также являются предпочтительными, например, фармацевтическая композиция в лиофилизованной форме.

Для инъекции, например, внутривенной, кожной или подкожной инъекции, или инъекции в место поражения, активный ингредиент предпочтительно будет в форме парентерально приемлемого водного раствора, который не содержит пирогенов и имеет подходящие pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области могут приготовить подходящие растворы, используя, например, такие изотонические растворители, как, например, инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный раствор Рингера с лактозой. При необходимости могут быть внесены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Будь то полипептид, пептид или молекула нуклеиновой кислоты, другое фармацевтически полезное соединение по настоящему изобретению, его введение индивидууму предпочтительно осуществляют в "профилактически эффективном количестве" или в "терапевтически эффективном количестве" (в зависимости от случая), достаточном для проявления полезного для человека эффекта. Фактически введенное количество, а также скорость и продолжительность введения будут зависеть от характера и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Для инъекций фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть представлена, например, в заранее заполненном шприце.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, согласно описанному выше, также можно вводить перорально в любой перорально приемлемой лекарственной форме, включая, но ими не ограничиваясь, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения обычно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие агенты, например, стеарат магния. Для перорального введения в форме капсул полезные разбавители включают лактозу и сухой кукурузный крахмал. Когда для перорального применения требуются водные суспензии, активный ингредиент, то есть конъюгат молекулы с переносимым грузом по настоящему изобретению, согласно описанному выше, объединяют с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При желании также могут быть добавлены определенные подсластители, ароматизаторы или красители.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению также можно вводить местно, особенно когда цель лечения включает области или органы, легко доступные для местного применения, например, включая заболевания кожи или любой другой доступной эпителиальной ткани. Составы, пригодные для местного применения, могут быть легко приготовлены для таких областей или органов. Для местного применения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть разработана в виде соответствующей мази, содержащей фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, особенно описанные выше компоненты, суспендированные или растворенные в одном или более носителях. Носители для местного применения включают, но ими не ограничиваются, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, полиоксипропиленовое соединение, эмульгирующий воск и воду. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть разработана в виде соответствующего лосьона или крема. В контексте настоящего изобретения к соответствующим носителям относятся, но ими не ограничиваются, минеральное масло, моностеарат сорбитана, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и вода.

Дозировка лечения может осуществляться по схеме разовых доз или по схеме множественных доз. В частности, фармацевтическая композиция может быть представлена виде одной дозы. Предпочтительно, количество антитела в фармацевтической композиции - в частности, если она предоставлена в виде однократной дозы - не превышает 200, более предпочтительно не превышает 100 и еще более предпочтительно не превышает 50 мг.

Например, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться ежедневно, например, от одного до нескольких раз в день, например, один, два, три или четыре раза в день, предпочтительно, один или два раза в день, более предпочтительно один раз в день на протяжении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дня или более, например, ежедневно на протяжении 1, 2, 3, 4, 5, 6 месяцев. Предпочтительно, по настоящему изобретению можно вводить еженедельно, например, один или два раза в неделю на протяжении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 недели или более, например, еженедельно на протяжении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или еженедельно на протяжении 2, 3, 4 или 5 лет. Более того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно может вводиться ежемесячно, например, один раз в месяц или, более предпочтительно, через месяц на протяжении 1, 2, 3, 4 или 5 или более лет. Также предпочтительно, чтобы введение проводили пожизненно. Кроме того, также предусматривается только одно введение, в частности, в отношении определенных показаний, например, для предотвращения заражения вирусом Зика при случайной экспозиции, например, субъектам, не прошедшим иммунизации.

Однако наиболее предпочтительным режимом лечения является постконтактная профилактика (post-exposure prophylaxis - PEP), при которой одну или более разовых доз вводят как можно скорее после заражения вирусом Зика. Профилактическая установка, согласно которой вводят одну или более разовых доз для предотвращения инфекции Зика (то есть до заражения вирусом Зика, особенно лицам, не иммунизированным против вируса Зика), также является предпочтительной.

В частности, предпочтительно, чтобы для однократной дозы, например суточной, еженедельной или ежемесячной дозы, предпочтительно для еженедельной дозы, количество антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в фармацевтической композиции по настоящему изобретению не превышало 1 г, предпочтительно не превышало 500 мг, более предпочтительно не превышало 200, еще более предпочтительно не превышало 100, и, особенно предпочтительно не превышало 50 мг.

Фармацевтические композиции обычно включают "эффективное" количество одного или более антител по настоящему изобретению, то есть количество, достаточное для лечения, улучшения состояния, ослабления симптомов или предотвращения определенного заболевания или состояния, или для проявления очевидного терапевтического эффекта. Терапевтические эффекты также включают снижение или ослабление тяжести заболевания или симптомов заболевания. Точное эффективное количество для любого конкретного субъекта будет зависеть от размера, веса и состояния здоровья, природы заболевания и его тяжести, а также от терапевтических средств или комбинации терапевтических средств, выбранных для введения. Эффективное количество для данной ситуации определяется обычными экспериментами и находится на усмотрении врача. Для целей настоящего изобретения эффективная доза обычно составляет примерно от 0,005 до примерно 100, предпочтительно примерно от 0,0075 до примерно 50, более пред-

почтительно примерно от 0,01 до примерно 10 и еще более предпочтительно примерно от 0,02 до примерно 5 мг/кг антитела по настоящему изобретению (например, количество антитела в фармацевтической композиции) по отношению к массе тела (в кг) индивидуума, которому вводят дозу.

Более того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также может включать дополнительный активный компонент, который может быть дополнительным антителом или компонентом, не являющимся антителом. Дополнительный активный компонент предпочтительно является ингибитором иммунных контрольных точек. Также предпочтительно, если ZIKV-нейтрализующее антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, были скомбинированы с ZIKV NS1-связывающим антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в настоящем изобретении в качестве дополнительного активного компонента (сопутствующего агента). Таким образом, патогенная роль NS1 может блокироваться в дополнение к нейтрализации ZIKV. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать один или несколько дополнительных активных компонентов, например, описанных ниже в качестве сопутствующих агентов в контексте комбинированной терапии.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может содержаться или в той же фармацевтической композиции, что и дополнительный активный компонент, или, предпочтительно антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению состоит из первой фармацевтической композиции, и дополнительный активный компонента входит в состав второй фармацевтической композиции, отличной от первой фармацевтической композиции. Соответственно, если предусматривают более одного дополнительного активного компонента, каждый дополнительный активный компонент и антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению предпочтительно входят в состав разных фармацевтических композиций. Такие разные фармацевтические композиции можно вводить либо в сочетании/одновременно, либо в разное время, либо в разные части (например, в разные части тела).

Предпочтительно, антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению и дополнительный активный компонент обеспечивают дополнительный терапевтический эффект или, предпочтительно, синергетический терапевтический эффект. Понятие "синергизм" применяют для описания комбинированного эффекта двух или более активных агентов, который больше, чем сумма отдельных эффектов каждого соответствующего активного агента. Таким образом, когда объединенное действие двух или более агентов приводит к "синергетическому ингибированию" активности или процесса, подразумевают, что ингибирование активности или процесса больше, чем сумма ингибирующих эффектов каждого соответствующего активного агента. Понятие "синергетический терапевтический эффект" относится к терапевтическому эффекту, наблюдаемому при комбинировании двух или более видов терапии, причем терапевтический эффект (измеряемый каким-либо из ряда параметров) больше, чем сумма отдельных терапевтических эффектов, наблюдаемых от соответствующих индивидуальных методов лечения.

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, соответствующее gZKA190, gZKA64, gZKA230, gZKA185, gZKA78 или их антигенсвязывающему фрагменту, и фармацевтически приемлемый носитель, является предпочтительной.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению может включать антитела по настоящему изобретению, причем антитела могут составлять, по меньшей мере, 50 мас.% (например, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 мас.% или более) от массы общего белка в композиции. В такой композиции антитела предпочтительно находятся в очищенной форме.

Настоящее изобретение также предусматривает способ получения фармацевтической композиции, включающей стадии: (i) получения антитела по настоящему изобретению; и (ii) смешивание очищенного антитела с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ получения фармацевтической композиции включает стадию смешивания антитела с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, причем антитело является моноклональным антителом, которое получают от трансформированной В-клетки или культивируемой плазматической клетки по настоящему изобретению.

В качестве альтернативы доставке антител или В-клеток в терапевтических целях, можно доставлять субъекту нуклеиновую кислоту (обычно ДНК), которая кодирует требуемое моноклональное антитело (или его активный фрагмент), производное от В-клеток или культивируемых плазматических клеток, причем нуклеиновая кислота может экспрессироваться в организме субъекта *in situ* для обеспечения желаемого терапевтического эффекта. Соответствующая генная терапия и векторы доставки нуклеиновых кислот известны в данной области.

Фармацевтические композиции могут включать антимикробное средство, особенно если они упакованы в формате многократных доз. Фармацевтические композиции могут включать детергент, например, твин (полисорбат), например, твин 80. Концентрация детергентов обычно низкая, например, менее 0,01%. Композиции также могут включать соли натрия (например, хлорид натрия) для придания тоничности. Например, обычная концентрация NaCl равна  $10 \pm 2$  мг/мл.

Кроме того, фармацевтические композиции могут содержать сахарный спирт (например, маннит) или дисахарид (например, сахарозу или трегалозу), например, в количестве примерно 15-30 мг/мл (например, 25 мг/мл), особенно если они должны быть лиофилизированы или если они включают материал, который был восстановлен из лиофилизованного материала. Показатель рН композиции для лиофилизации может быть доведен до величины от 5 до 8, или от 5,5 до 7, или примерно 6,1 до лиофилизации.

Композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или более иммунорегуляторных агентов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения один или более иммунорегуляторных агентов включают адъювант.

Медицинские процедуры, наборы и применение.

Медицинские процедуры.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают применение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для (i) предупреждения и/или лечения инфекции вируса Зика; или для (ii) диагностики инфекции вируса Зика. Таким образом, применение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с настоящим изобретением (и особенно его предпочтительными вариантами осуществления, согласно описанному выше), или (множества) молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирующих антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению является предпочтительным для (i) предупреждения и/или лечения инфекции вируса Зика, согласно описанному выше; или для (ii) диагностики инфекции вируса Зика согласно описанному выше.

Методы диагностики могут включать контактирование антитела или фрагмента антитела с образцом. Такие образцы могут быть выделены от субъекта, например, из взятого образца ткани, например, из носовых ходов, синусовых пазух, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, ушей, глаз, плаценты, желудочно-кишечного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, мозга, кожи или крови, предпочтительно плазмы или сыворотки. Методы диагностики также могут включать обнаружение комплекса антиген/антитело, в частности, после контакта антитела или фрагмента антитела с образцом. Такая стадия обнаружения обычно выполняется на стенде, то есть без какого-либо контакта с телом человека или животного. Примеры методов детектирования хорошо известны специалистам в данной области и включают, например, метод ELISA (иммуноферментный анализ).

Профилактика инфекции, вызываемой вирусом Зика, относится, в частности, к профилактическим мерам, когда у субъекта не было обнаружено инфекции вируса Зика (либо диагноз не был поставлен, либо результаты диагностики были отрицательными), и/или у субъекта не проявляются симптомы вирусной инфекции Зика. Соответственно, профилактика инфекции вируса Зика включает в себя "профилактику после контакта (ППК)", то есть профилактическую обработку после возможного инфицирования вирусом Зика, например, после укуса комара в зоне поражения вирусом Зика. Профилактика заражения вирусом Зика особенно полезна для субъектов высокой степени риска, например, для беременных и/или субъектов, находящиеся в районах, пораженных вирусом Зика (например, субъектов, проживающих в районах, пораженных вирусом Зика, или путешествующих в районы, пораженные вирусом Зика).

В терапевтических установках, напротив, субъект обычно является зараженным вирусом Зика, у него диагностирована инфекция вируса Зика и/или проявляются симптомы инфицирования вирусом Зика. Следует отметить, что термины "лечение" и "терапия"/"терапевтические" инфекции ZIKV включают (полное) излечение, а также ослабление инфекции ZIKV.

Соответственно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, клетка по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно применяются для лечения инфекции вируса Зика у субъектов, у которых диагностирована инфекция вируса Зика или у субъектов с симптомами инфицирования вирусом Зика.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению применяются для предупреждения и/или лечения инфекции вируса Зика у бессимптомных субъектов. У таких субъектов может быть диагностирована или не диагностирована инфекция вируса Зика.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему

изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтическую композиция по настоящему изобретению применяют для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, у беременных, в частности, для предупреждения врожденной инфекции. Например, это может быть выполнено так же, как для профилактики врожденной инфекции HCMV согласно описанию в публикации Ni-go G. с соавт, N Engl J Med 353, 2005, 1350-1362.

Без отсылки к какой-либо теории, сделано заключение, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению может проходить через плаценту при взаимодействии с FcRn, например, если вводится беременной, например, путем (внутривенной) инъекции или каким-либо другим способом введения согласно описанию настоящего изобретения. Важно, что взаимодействие вариантов антител "LALA", согласно описанию настоящего изобретения, с FcRn не подвергается опасности. Предполагают, что FcRn уже экспрессируется в первом триместре в плаценте.

В другом варианте антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или (множество) молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также может быть введено в экстраамниотическое пространство.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению применимы для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, множество нуклеиновых кислот, множество векторов, клетки или фармацевтическую композицию вводят в течение семи дней после (возможной) инфекции вирусом Зика, вплоть до пяти дней после (возможной) инфекции вирусом Зика, более предпочтительно вплоть до четырех дней после (возможной) инфекции вирусом Зика, еще более предпочтительно вплоть до трех дней после (возможной) инфекции вирусом Зика, и наиболее предпочтительно в течение одного-двух дней после (возможной) инфекции вирусом Зика. Такая схема лечения может быть полезна как в терапевтических, так и в профилактических целях, в частности, в профилактике после контакта (ППК).

При ППК обычно первое введение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению осуществляют как можно скорее после возможной инфекции ZIKV, например, после укуса комаром в зоне поражения ZIKV. Соответственно, при ППК первое введение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению осуществляют обычно не позднее одного или более дней после (возможной) инфекции ZIKV, как описано выше.

Также предпочтительно, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтическую композиция по настоящему изобретению применяют для предупреждения и/или лечения инфекции вируса Зика, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, множество нуклеиновых кислот, множество векторов, клетки или фармацевтическую композицию вводят за три месяца до (возможного) инфицирования вирусом Зика, предпочтительно за месяц до (возможного) инфицирования вирусом Зика, более предпочтительно за две недели до (возможного) инфицирования вирусом Зика, еще более предпочтительно за неделю до (возможного) инфицирования вирусом Зика, и наиболее предпочтительно за день до (возможного) инфицирования вирусом Зика. Такая схема лечения, в частности, относится к профилактическим мерам.

В общем - и, в частности, при ППК - после первого введения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, может последовать одно или более последующих введений, предпочтительно одной дозы один или два раза в день в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 дня.

Также предпочтительно, если после первого введения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, может последовать одно или более последую-

ших введений, предпочтительно одной дозы один или два раза в неделю в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 недели.

Также предпочтительно, если после первого введения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, может последовать одно или более последующих введений, предпочтительно одной дозы каждые две или четыре недели в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 недели. Также предпочтительно, если после первого введения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, может последовать одно или более последующих введений, предпочтительно одной дозы каждые два или четыре месяца в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 месяца. Также предпочтительно, если после первого введения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, может последовать одно или более последующих введений, предпочтительно одной дозы один или два раза в год в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, клетку по настоящему изобретению или фармацевтическую композиция по настоящему изобретению вводят в (разовой) дозе от 0,005 до 100, предпочтительно в (разовой) дозе от 0,0075 до 50, более предпочтительно в (разовой) дозе от 0,01 до 10, еще более предпочтительно в (разовой) дозе от 0,05 до 5, и особенно предпочтительно в (разовой) дозе от 0,1 до 1 мг/кг массы тела.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, клетка по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть введены каким-либо путем, например, пероральным, внутривенным, внутримышечным, внутриартериальным, интрамедуллярным, внутривентрикулярным, интратекальным, интравентрикулярным, трансдермальным, чрескожным, местным, интраназальным, энтеральным, подъязычным, интравагинальным или ректальным. Внутривенное введение, или подкожное введение, или внутримышечное введение являются предпочтительными, и внутривенное введение или подкожное введение являются более предпочтительными.

Беременным антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или молекула (множество молекул) нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также могут быть введены интра- или экстраамниотическим путем, например, инъекцией.

Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает способ предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, причем этот способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Предпочтительные варианты осуществления такого способа соответствуют предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения, касающимся медицинского применения, согласно описанному выше (и ниже, касательно комбинированной терапии). Например, предпочтительным субъектом в данном способе является субъект, у которого диагностировано инфицирование вирусом Зика. Другими предпочтительными субъектами в данном способе являются беременные женщины.

Комбинированная терапия.

Введение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в методы и применения по настоящему изобретению может быть выполнено отдельно или в комбинации с сопутствующими агентами (также называемым в настоящем изобретении "дополнительным активным компонентом"), который, в частности, применим для предупреждения и/или лечения инфекции ZIKV.

Настоящее изобретение охватывает введение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента,

по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, причем введение осуществляют субъекту до, одновременно или после других схем лечения или лечения сопутствующими агентами, полезными для лечения и/или предупреждения инфекции ZIKV. Указанное антитело, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или фармацевтическая композиция, которые вводят одновременно с указанными сопутствующими агентами, можно вводить в одной и той же или разных композициях и одинаковыми или разными путями введения.

Указанные другие схемы лечения или сопутствующие агенты могут быть, например, ингибитором контрольной точки.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором контрольной точки для (медицинского) использования, согласно описанному в настоящем изобретении.

Предпочтительные ингибиторы контрольных точек направлены на блокирование PD-1/PD-L1 и/или CTLA4 и, таким образом, включают анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела и анти-CTLA4 антитела. Таким образом, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать один или более дополнительных активных компонентов.

Также предпочтительно, если нейтрализующее ZIKV антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, согласно описанию настоящего изобретения, объединено с ZIKV NS1-связывающим антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, в качестве дополнительного активного компонента (совместно применяемого агента). Таким образом, патогенная роль NS1 может блокироваться в дополнение к нейтрализации ZIKV. Соответственно, ZIKV NS1-связывающее антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, например, описанный в патенте PCT/EP2017/067581, включенным в настоящее изобретение в виде ссылки, является предпочтительным активным компонентом (сопутствующим агентом).

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, или клетки по настоящему изобретению могут быть в одной фармацевтической композиции в качестве дополнительного активного компонента (сопутствующего агента), или, предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, или клетки по настоящему изобретению содержатся в первой фармацевтической композиции, а дополнительный активный компонент (сопутствующий агент) содержится во второй фармацевтической композиции, отличающейся от первой фармацевтической композиции. Соответственно, если применяют более одного дополнительного активного компонента (сопутствующего агента), каждый дополнительный активный компонент (сопутствующий агент) предпочтительно включен в другую фармацевтическую композицию. Такие разные фармацевтические композиции могут быть введены комбинированно/одновременно, или раздельно в разное время, или в разной локализации (например, для разных частей организма).

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению и аддитивный активный компонент (сопутствующий агент) обеспечивают аддитивный терапевтический эффект, или, предпочтительно, синергетический терапевтический эффект. Понятие "синергия" применяют для описания комбинированного эффекта двух или более активных агентов, совместное действие которых превышает сумму отдельных эффектов каждого соответствующего активного агента. Таким образом, когда комбинированное действие двух или более агентов приводит к "синергетическому ингибированию" активности или процесса, подразумевают, что ингибирование активности или процесса больше, чем сумма ингибирующих эффектов каждого соответствующего активного агента. Понятие "синергетический терапевтический эффект" относится к терапевтическому эффекту, наблюдаемому при комбинировании двух или более терапевтических средств, причем терапевтический эффект (оцененный по какому-либо числу параметров) выше, чем сумма индивидуальных терапевтических эффектов, наблюдаемых при соответствующих отдельных терапиях.

Дополнительные применения и наборы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают применение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для мониторинга качества вакцины против вируса Зика путем проверки того, что антиген указанной вакцины содержит

определенный эпитоп в правильной конформации. Предпочтительные антигены, входящие в состав такой вакцины против Зика, подлежащей проверке, включают белок оболочки ZIKV или какую-либо другую молекулу/комплекс, содержащие или состоящие из (i) домена III белка E ZIKV (EDIII), согласно описанному выше, или (ii) четвертичного эпитопа ZIKV, согласно описанному выше.

Более того, настоящее изобретение также предусматривает применение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (in vitro) для диагностики инфекции вируса Зика.

Кроме того, предусматривают применение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, множества молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множества векторов по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для определения, является ли взятый образец крови (например, цельной крови, сыворотки и/или плазмы) инфицированным вирусом Зика.

Выше было описано, что способы диагностики могут включать контактирование антитела или фрагмента антитела с образцом. Такие образцы могут быть получены от субъекта, например, из выделенного образца ткани, взятого, например, из носовых ходов, пазух носа, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, ушей, глаз, плаценты, желудочно-кишечного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, мозга, кожи или крови, сыворотки или плазмы. Методы диагностики могут также включать обнаружение комплекса антиген/антитело, в частности, после контакта антитела или фрагмента антитела с образцом. Такая стадия обнаружения обычно выполняется на стенде, то есть без какого-либо контакта с телом человека или животного. Примеры методов обнаружения хорошо известны специалистам в данной области и включают, например, метод ELISA (иммуферментный анализ).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения также предусматривают набор частей, содержащий, по меньшей мере, одно антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению, по меньшей мере, одну нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, множество нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, по меньшей мере, один вектор по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, по меньшей мере, одну клетку по настоящему изобретению, и/или по меньшей мере, одну фармацевтическую композицию по настоящему изобретению. Кроме того, набор может включать средства введения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению, молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, множество молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, множество векторов по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, например, шприц или флакон, вкладыш и/или сопутствующий агент, предназначенные для введения согласно описанному выше.

#### Описание фигур

Фиг. 1. Реактивность (методом ELISA) и нейтрализующая активность ZIKV и DENV1 антителами, полученными от четырех иммунных доноров ZIKV (ZKA, ZKB, ZKC и ZKD) к E белку ZIKV и DENV1-4, а также к EDIII-домену E белка ZIKV; NNB - нейтрализующие, не связывающиеся с E белком антитела (neutralizing, non-E-protein binding antibodies).

Фиг. 2. Связывание антител ZKA190, ZKA78 и ZKA64 с E белками ZIKV и DENV1 с ZIKV EDIII по данным анализа методом ELISA.

Фиг. 3. Связывание антител ZKA185 и ZKA190 с ZIKV E, DENV1 VLP и ZIKV EDIII белками по данным анализа методом ELISA.

Фиг. 4. В примере 3 показывают нейтрализующую активность антител ZKA190, ZKA64, ZKA64-LALA, ZKA230 и ZKA78 против ZIKV (штамм H/PF/2013) и DENV1 на клетках Vero по данным жидкостной цитометрии (% инфицированных клеток).

Фиг. 5. В примере 3 показывают нейтрализующую активность антител ZKA190, ZKA64, ZKA185, ZKA230 и ZKA78 против ZIKV (штамм H/PF/2013) на клетках Vero, измеренную считыванием жизнеспособности клеток (wst-1, фирма Roche).

Фиг. 6. В примере 4 показывают усиливающую инфицирующую активность (ADE, антителозависимое усиление) антител ZKA190, ZKA64, ZKA64-LALA, ZKA185, ZKA230 и ZKA78 к ZIKV (штамм H/PF/2013) на непермиссивных клетках K562 по данным жидкостной цитометрии (% инфицированных клеток).

Фиг. 7. В примере 4 показывают, что четыре ZIKV-иммунные плазмы и одна DENV-иммунная плазма проявляют сходную способность усиливать ZIKV-инфекцию клеток K562 (верхняя панель). Этот эффект ADE был полностью блокируется во всех пяти иммунных плазмах с помощью EDIII-специфического антитела ZKA64-LALA (нижняя панель).

Фиг. 8. Аминокислотное выравнивание области EDIII 39 штаммов ZIKV из азиатской линии от 2013

года (включая прототипный штамм MR766 африканской линии, выделенный в 1947 году).

Фиг. 9. В примере 3 показывают нейтрализующую активность антител ZKA190 и ZKA190-LALA против трех штаммов ZIKV (H/PF/2013, MR766 и MRS\_OPY\_Martinique\_PaRi\_2015) на клетках Vero по данным жидкостной цитометрии (% инфицированных клеток).

Фиг. 10. В примере 5 показывают нейтрализацию mAb ZKA190 и C8, исследованных против панели из четырех штаммов ZIKV, которую определяли по проценту инфицированных клеток Vero в присутствии возрастающих количеств mAb (А). Также показаны значения  $IC_{50}$  (Б) и статистика (В). Данные представляют, по меньшей мере, два независимых эксперимента.

Фиг. 11. В примере 6 показывают нейтрализацию и усиление инфекции ZIKV антителом ZKA190. (А) Нейтрализация заражения штаммов ZIKV PRVABC59 hNPC моноклональными антителами (mAb) ZKA190, ZKA190-LALA и контрольным mAb, установленная с помощью анализа бляшек на клетках Vero (левая панель) и непрямой иммуофлюоресценцией инфицированных hNPC с использованием меченных флуорофором антител против Е белка (правая панель). (Б) ADE инфекции ZIKV в непермиссивных клетках K562 ZKA190 и ZKA190-LALA. (В) ADE индуцируется в клетках K562, когда ZIKV предварительно инкубируют с серийными разведениями сыворотки плазмы от разных ZIKV-позитивных пациентов (левая панель). При добавлении ZKA190 LALA в комплексы ZIKV-сыворотка, ингибируется ADE (правая панель). (Г) ADE индуцируется в клетках K562, когда ZIKV предварительно инкубируют с серийными разведениями rгM перекрестно-реактивного mAb (DV62), полученного от DENV-иммунного донора. ZKA190-LALA ингибирует ADE ZIKV при образовании комплекса с rгM-реактивным антителом DV62. (Д) Влияние на ADE, вызванное усилением пика разведением плазмы DENV2 (левая панель) или анти-rгM DV62 mAb (правая панель) последовательными разведениями указанных mAb.

Фиг. 12. В примере 7 показывают идентификацию эпитопа ZKA190 и анализ его сохранения в штаммах ZIKV.

(А) Наложение спектров  $[^{15}N, ^1H]$ -HSQC  $^{15}N$ -меченного ZIKV EDIII в отсутствие (черный цвет) или в присутствии (красный цвет) немеченого Fab ZKA190. Различия определяют остатки EDIII, на которые влияет связывание антитела.

(Б) ЯМР-картирование эпитопа Fab ZKA190 в комплексе с ZKV EDIII. Возмущение химического сдвига (chemical shift perturbation - CSP, Y-ось) наносится на график против номера остатка EDIII. Остатки, на которые влияет связывание антител, выделены красным.

(В) Остатки в петле FG, идентифицированные путем ЯМР-картирования эпитопа, частично скрытые Е белка в молекулах А, но в значительной степени экспонированные в молекулах Б и В. EDIII белка Е окрашен в синий цвет. Остатки, идентифицированные путем ЯМР-картирования эпитопа, окрашены в пурпурный цвет, за исключением тех, которые в петле FG окрашены в зеленый цвет. Смежные белки Е показаны в виде серой поверхности.

(Г) Уровень сохранения аминокислотного остатка в эпитопе ZKA190, рассчитанный путем анализа последовательностей из 217 штаммов ZIKV, обнаруженных в базах данных ZIKV Resources (NCBI) по состоянию на 24 ноября 2016 г.

(Д) Представление открытой книги, показывающее взаимодополняемость заряда между эпитопом и паратопом по результату докинга. Границы эпитопа и паратопа обведены зеленым. Границы между тяжелыми и легкими цепями Fab и соответствующем им области узнавания на EDIII показаны желтыми пунктирными линиями.

Фиг. 13. В примере 7 показывают эпитоп ZKA190, идентифицированный с помощью ЯМР и докинга. (А) Схематичное представление 12 структур ЯМР с самой низкой энергией ZIKV EDIII, с остатками, на которые влияет связывание ZKA190, в красном цвете. Гибкость в N-конце конструкции очевидна. (Б) Модель комплекса ZKA190: EDIII, полученная вычисленным докингом и молекулярным моделированием, и подтвержденная результатами ЯМР. ЯМР-идентифицированный эпитоп на EDIII (серый) выделен красным. Тяжелая и легкая цепь ZKA190 окрашены в темный и светло-зеленый цвета, соответственно. Остатки EDIII, которые влияют или не связываются с антителом в результате мутирования, выделены оранжевым и синим цветом, соответственно. (В) ЯМР-идентифицированный эпитоп ZKA190 (красный) доступен на поверхности вируса (белый).

Фиг. 14. В примерах 7 и 10 показывают связывание wt или мутировавшего EDIII с ZKA190 IgG. Показаны данные SPR и кинетика связывания. Мутанты EDIII, которые влияют (выделены красным цветом) или не влияют на связывание, отмечены.

Фиг. 15. В примере 8 показаны результаты экспериментов по конфокальной микроскопии. ZIKV, инкубированный с Fab ZKA190 или полным IgG, взятыми в концентрации, которая в 10000 раз превышает  $IC_{50}$ , добавляют к клеткам Vero. Комплекс ZIKV:антитело обнаруживают внутри клеток (зеленый цвет); комплекс локализован вместе с эндосомами (наложение красного и желтого). Эндосомы и кислотные органеллы отмечены красителем LysoTracker красным; конъюгированный с ZKA190 краситель Alexa-488 зеленого цвета. Ядра окрашены DAPI (синий цвет).

Фиг. 16. В примере 9 показана профилактическая и терапевтическая эффективность ZKA190. (А) ZKA190 эффективно защищает от инфицирования ZIKV при профилактическом введении мышам (A129 в (А) и AG129 в (Б)), которых заражают летальной дозой вируса ZIKV штамм MP17451. В экспериментах

в группах было по 4-8 мышей. Представлены кривые выживаемости Каплана-Мейера (А).

Значимость определяют с использованием теста логарифмического ряда Мантеля-Кокса. Панель А, сверху слева: ZKA190 в количестве 5, 1 и 0,2 мг/кг против Cтr mAb,  $P=0,0031$ ; ZKA190 в количестве 0,04 мг/кг против контрольного mAb,  $P=0,0116$ ; ZKA190-LALA в количестве 5, 1, 0,2 и 0,04 мг/кг против контрольного mAb,  $P=0,0031$ . Панель А, сверху справа: показатель заболеваемости мышей, наблюдаемых в течение 14-15 дней (используют два различных метода оценки; см. (Dowall S.D. с соавт., PLoS Negl Trop Dis 10, 2016, e0004658-13). Панель А, панели внизу: масса тела мышей. Панели Б: ZKA190 или ZKA190-LALA вводят в дозе 15 мг/кг в различные моменты времени после заражения ZIKV. Панель Б, сверху слева: показана кривая выживаемости Каплана-Мейера. В экспериментах используют по 5 мышей в группе. Значимость определяют с использованием теста логарифмического ряда Мантеля-Кокса. ZKA190 и ZKA190-LALA дают в 1, 2, 3 или 4 день против контроля,  $P=0,0016$ . Панель Б, сверху справа: Показатель заболеваемости мышей контролируют в течение 14 дней в соответствии с Dowall с соавт., 2016. Мышей подвергают мониторингу в течение 14 дней, оценивая потерю массы тела (панель Б, нижние панели). Контрольным является антитело MPE8, специфичным для Е белка RSV (Corti D. с соавт., Nature 501, 2013, 439-443).

Фиг. 17. В примере 9 показана профилактическая эффективность анти-ZIKV EDIII-специфического mAb ZKA190 против штаммов ZIKV MP1741. (А) Показана вирусная нагрузка, измеренная как БОЕ/мл на 5 день в крови всех животных. (Б) Вирусную нагрузку измеряют в виде геномных копий/мл с помощью qPCR на 5-й день в крови всех животных и в крови и определенных тканях, когда животных отбирают в конце исследования или когда достигают гуманных конечных точек. (В) Мышей подвергают мониторингу в течение 14-дневного периода для определения снижения массы тела. (Г) Концентрация IgG человека в сыворотке крови в 5-й день в образцах крови. Значимость определяют по сравнению с обработкой контрольным антителом с помощью непараметрического непарного U-критерия Манна-Уитни. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

Фиг. 18. В примере 9 показана терапевтическая эффективность анти-ZIKV EDIII-специфического mAb ZKA190. (А) Вирусные нагрузки измеряют как БОЕ на 5 день в крови всех животных. (Б) Вирусные нагрузки измеряют в виде копий генома с помощью qPCR на 5-й день в крови всех животных и в определенных тканях, когда животных отбирают в конце исследования или когда достигают гуманных конечных точек. Значимость определяют сравнением с контрольной обработкой антителами с помощью непараметрического непарного U-критерия Манна-Уитни. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ . (В) Концентрация IgG человека в сыворотке крови на 5-е сутки.

Фиг. 19. В примерах 11 и 12 описано встраивание ZKA190 в биспецифическое mAb FIT-1 и его характеристика *in vitro*. (А) Моноклональные антитела (mAb) ZKA185 и ZKA230 тестируют на нейтрализацию четырех штаммов ZIKV, которую определяют по проценту инфицированных клеток Vero в присутствии увеличивающихся количеств mAb. Данные представляют, по меньшей мере, два независимых эксперимента. (Б) Связывание ZKA185, ZKA230 IgG и Fab с рекомбинантными антигенами VLP, Е и DIII ZIKV оценивают методом ELISA. (В) ZKA190, ZKA185 и ZKA230 протестируют на способность нейтрализовывать H/PF/2013 (вес) и MARM 1-4. (Г) Поверхностное представление двух димеров белка Е, связанных ZKA190 (зеленый); эпитоп, производный от ZKA190 NMR, имеет красную окраску; положения, мутированные в MARM, обозначены желтым (E370), синим (T335), оранжевым (D67) и пурпурным (K84). (Д) Модель FIT-1. Природные линкеры между внутренним и внешним Fab обеспечивают гибкое перемещение Fab в антителе FIT-1. Варибельные области ZKA185 и ZKA190 выделены синим и зеленым цветом, соответственно. (Е) Связывание FIT-1 IgG и Fab с рекомбинантными антигенами VLP, Е и DIII ZIKV оценивают методом ELISA. (Ж) mAb ZKA190, ZKA185 и FIT-1 тестируют на способность нейтрализовать четыре штамма (значения IC50, Ж) и четырех MARM (3) ZIKV. (И) Нейтрализация штамма ZIKV H/PF/2013 с помощью ZKA185, ZKA230 и FIT-1 IgG и Fab, определенных в (А). (К) Эксперименты по конфокальной микроскопии, показанные на фиг. 3. (Л) Эффект на ADE, индуцированный пиковым усилением разведения анти-rтM DV62 mAb или DENV2 плазмы путем серийных разведений FIT-1 IgG и Fab.

Фиг. 20. Терапевтическая эффективность FIT-1. FIT-1 очень эффективен против инфекции ZIKV при терапевтическом введении мышам (A129) в различные моменты времени, которым вводят смертельную дозу штамма ZIKV MP17451. В экспериментах используют по 5-6 мышей на группу. (А) Кривые выживания Каплана-Мейера. Значимость определяют с использованием критерия логарифмического ранга Мантеля-Кокса. FIT-1 в дозах 15, 5 и 1 мг/кг вводят в 1-й день, во 2-й день в зависимости от контрольного mAb,  $P=0,0012$ ; ZKA190 в дозах 15 и 5 мг/кг в 3-й день в зависимости от контрольного mAb,  $P=0,0012$ ; ZKA190 в дозе 1 мг/кг дано на 3-й день в зависимости от контрольного mAb,  $P=0,0170$ . (Б) Оценка заболеваемости мышей, наблюдаемых в течение 21 дня (Dowall с соавт., 2016). (В) Вирусные нагрузки измеряют как БОЕ на 5 день в крови всех животных. (Г) Мышей контролируют в течение 21-дневного периода на предмет потери массы тела. Контрольным mAb на панели А является MPE8 mAb (F белок, специфичный для RSV (Corti D. с соавт., Nature 501, 2013, 439-443). (Д) Нагрузку вируса измеряют методом qPCR и выражают в виде количества копий генома в 5-й день в крови всех животных и в крови и определенных тканях, когда животных отбирают в конце исследования или когда достигают гу-

манных конечных точек. Значимость определяют путем сравнения с контрольной обработкой антителами с помощью непараметрического непарного U-критерия Манна-Уитни. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Фиг. 21. В примере 14 показывают, что самки мышей AG129, получавшие FIT-1 после заражения малазийским ZIKV, защищены от смертности по сравнению с мышами, получавшими плацебо.

Фиг. 22. В примере 14 показывают внутриутробное ограничение роста (IUGR) у мышат, рожденных от самок, получавших FIT-1 и зараженных ZIKV.

Фиг. 23. В примере 14 показывают средний вес мышат на дату рождения, рожденных от самок, получавших FIT-1 и инфицированных ZIKV.

Фиг. 24. В примере 14 показывают вес плацент, собранных на 11 сутки после инфицирования от самок, получавших FIT-1.

Фиг. 25. В примере 14 показывают количественное определение вирусной РНК у (А) плода, (Б) плаценты, (В) материнской селезенки и (Г) материнского мозга (\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , по сравнению с лечением MPE8).

Фиг. 26. В примере 15 показывают выживаемость самцов мышей AG129, инфицированных ZIKV и получавших FIT-1 через 24 или 72 ч после заражения вирусом (\* $P < 0,05$  по сравнению с обработкой отрицательным контролем MPE8).

Фиг. 27. В примере 15 показывают среднее процентное изменение веса мышей AG129, получавших FIT-1, в разное время после заражения ZIKV.

Фиг. 28. В примере 15 показывают оценку болезни А) семенников или Б) придатков самцов мышей AG129, получавших FIT-1 через 24 или 72 ч после заражения ZIKV. Лечение реакционноспособными Аб приводит к снижению заболеваемости семенников и придатков.

Фиг. 29. В примере 16 показывают нагрузку вируса в сыворотке крови в трех протестированных группах. Горизонтальная линия показывает LLOQ 860 GC/мл.

### Примеры

Возможные варианты осуществления настоящего изобретения представлены ниже в примерах. Эти примеры представлены только в качестве иллюстрации и для помощи специалистам в осуществлении настоящего изобретения. Эти примеры никоим образом не предназначены для ограничения рамок охвата настоящего изобретения.

Пример 1. Выделение ZIKV-специфичных антител и выработка моноклональных антител.

IgG+ В-клетки памяти выделяют из криоконсервированных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) четырех инфицированных ZIKV доноров (ZKA, ZKB, ZKC и ZKD) с использованием микрогранул CD22 (фирма Miltenyi Biotec) с последующим истощением клеток, несущих IgM, IgD и IgA, путем сортировки клеток. В-клетки памяти от ZIKV-инфицированных доноров затем immortalizуют EBV (вирус Эпштейна-Барра) и CpG (CpG-олигодезоксинуклеотид 2006) в нескольких повторяющихся лунках, согласно описанному ранее (Traggiai E. с соавт., Nat. Med. 10, 2004, 871- 875) и затем культуральные супернатанты тестируют при первичном скрининге с использованием параллельно 384-луночного анализа микро-нейтрализации и анализа связывания (ELISA) для тестирования их связывания с белком NS1 вируса ZIKV или белком E вируса ZIKV. Результаты анализа связывания (связывания с белком E вируса ZIKV) показаны на фиг. 1.

В-клетки памяти от ZIKV-инфицированных доноров затем immortalizуют EBV (вирус Эпштейна-Барра) и CpG (CpG-олигодезоксинуклеотид 2006) в нескольких повторяющихся лунках, согласно описанному ранее (Traggiai E. с соавт., Nat. Med. 10, 2004, 871-875) и затем культуральные супернатанты тестируют при первичном скрининге с использованием параллельно 384-луночного анализа микро-нейтрализации и анализа связывания (ELISA) для тестирования их связывания с белком NS1 вируса ZIKV или белком E вируса ZIKV. Результаты анализа связывания (связывания с белком E вируса ZIKV) показаны на фиг. 1.

Анализы нейтрализации проводят на клетках Vero. В 384-луночной планшете ZIKV N/PF/2013 при уровне множественности инфекции 0,35 (multiplicity of infection - MOI), инкубируют с супернатантами в течение 1 ч при 37°C (5% CO<sub>2</sub>) перед добавлением к предварительно высеванным 5000 клеток Vero. Их инкубируют в течение еще 5 дней, после чего супернатант удаляют и добавляют реагент WST-1 (фирма Roche). Положительные культуры были собраны и размножены. Из положительных культур последовательности VH и VL извлекают с помощью RT-PCR. Антитела клонируют в векторах экспрессии IgG1 и Ig-каппа или лямбда-Ig человека (любезно предоставлены Michel Nussenzweig, Университет Рокфеллера, Нью-Йорк, США), по существу, согласно описанию (Tiller T. с соавт., J Immunol Methods 329, 2008, 112-124). Моноклональные антитела получают из EBV-immortalizированных В-клеток, или путем временной трансфекции клеток 293 Freestyle (фирма Invitrogen). Супернатанты из В-клеток или трансфицированных клеток собирали и IgG подвергали аффинной очистке с помощью хроматографии на белке А или белке G (фирма GE Healthcare) и обессоливали против ФСБ.

Фиг. 1 предусматривает обзор по отдельным нейтрализующим ZIKV антителам (см. табл. 1 и 2 для аминокислотных последовательностей их CDR и варибельных областей тяжелых/легких цепей). В последних двух столбцах фиг. 1 представлена активность, направленная на нейтрализацию (IC<sub>50</sub>) ZIKV и DENV1 (при тестировании). Другие столбцы представляют связывающую активность (EC<sub>50</sub>) антител с E

белком ZIKV (ZIKV E), E белком DENV1 (DENV1 E), E белком DENV2 (DENV2), E белком DENV3 E (DENV3), E белком DENV4 (DENV4)), вирусоподобной частицей DENV1 (VLP DENV1), вирусоподобными частицами DENV2 (VLP DENV2), вирусоподобными частицами DENV3 (VLP DENV3), вирусоподобными частицами DENV4 (VLP DENV4) и EDIII-доменом E белка ZIKV (DIII ZKA).

Пример 2. Описание антител ZKA190, ZKA185, ZKA230, ZKA64 и ZKA78.

В примере 1 большое количество ZIKV-нейтрализующих антител идентифицируют и характеризуют по их специфичности к ZIKV, в частности к E белку ZIKV и EDIII ZIKV, а также по их перекрестной реактивности по отношению к DENV. Антитела ZKA190 (SEQ ID NO: 1-18), ZKA185 (SEQ ID NO: 19-36), ZKA230 (SEQ ID NO: 37-54), ZKA64 (SEQ ID NO: 73-90) и ZKA 78 (SEQ ID NO: 55-72), описанные в примере 1, затем отбирают и дополнительно тестируют против E белка ZIKV ("ZIKV"), EDIII ZIKV ("DIII"), а также против белка E вируса денге (DENV, серотип номер 1) методом ELISA. Для этого используют стандартный иммуноферментный анализ (ELISA). Вкратце, планшеты для ELISA покрывают E белком ZIKV в концентрации 1 или 3 мкг/мл, блокируют 10% ФСТ в ФСБ, инкубируют с сыворотками или антителами человека и промывают. Связанные антитела выявляют путем инкубирования с АР-конъюгированным козьим антителом против IgG человека (goat anti-human IgG; фирма Southern Biotech). Затем планшеты промывают, добавляют субстрат (p-NPP, фирма Sigma) и планшеты считывали при 405 нм. Относительную аффинность связывания моноклонального антитела определяют путем измерения концентрации антитела ( $EC_{50}$ ), необходимой для достижения 50% максимального связывания при насыщении.

Результаты представлены на фиг. 3 и 4. Следует отметить, что ZKA64 и ZKA190 связывают с E ZIKV и EDIII ZIKV ("DIII") с низкими значениями  $EC_{50}$ , что указывает на то, что ZKA64 и ZKA190 связываются с доменом III E белка ZIKV (EDIII). ZKA78 связывается с E белком ZIKV, но не с EDIII ZIKV, что указывает на то, что ZKA78 связывается с E ZIKV, но не нацеливается на область EDIII. Несмотря на значительную нейтрализующую активность ZIKV (см. фиг. 1), антитела ZKA185 и ZKA230 не обнаруживают какого-либо выявляемого связывания с E ZIKV и EDIII ZIKV (фиг. 3). Соответственно, ZKA185 и ZKA230 называют "нейтрализующими-не-связывающими E" (neutralizing-non-E-binding - NNB) антителами. Предполагают, что эти NNB-антитела распознают четвертичные эпитопы, которые представлены на инфекционных вирионах ZIKV, но не на растворимых белках.

Более того, ни один из ZKA190, ZKA185, ZKA230 и ZKA64 не показывает какого-либо детектируемого связывания с E белками DENV (фиг. 1, серотипы DENV1-4 и фиг. 3 и 4), что указывает на то, что ZKA190, ZKA185, ZKA230 и ZKA64 специфичны для ZIKV и перекрестно не реагирует на вирус денге. ZKA78, напротив, связывается с белками E DENV (фиг. 1 и 3), но не с ZIKV EDIII (см. фиг. 2), что указывает на то, что ZKA78 является перекрестно-реактивным антителом, связывающимся с ZIKV, и с DENV.

Чтобы дополнительно подтвердить эти результаты, антитела ZKA190, ZKA64 и ZKA78, связывающие E белок ZIKV, дополнительно тестируют против E белка вируса денге (DENV, серотипы № 1-4). ZKA64 и ZKA190 не связываются с E белком DENV1-4, тем самым подтверждая, что ZKA64 и ZKA190 специфичны для ZIKV. ZKA78, напротив, связан с E белком DENV1-4 E, подтверждая, что ZKA78 является перекрестно-реактивным антителом, связывающимся с E белком как ZIKV, так и DENV (см. фиг. 1).

Пример 3. Выделенные антитела активно нейтрализуют инфекцию ZIKV.

Определяют способность антител ZKA190, ZKA185, ZKA230, ZKA64 и ZKA78 нейтрализовать инфекции ZIKV и DENV1 *in vitro*.

Нейтрализацию антителами инфекций, вызванных DENV и ZIKV, измеряют с использованием метода микро-нейтрализации на основе проточной цитометрии. Различные разведения антител смешивают с ZIKV (MOI 0,35) или с ослабленным DENV1 (все с MOI 0,04) в течение 1 ч при 37° и добавляют к 5000 клеткам Vero/лунку в 96-луночных планшетах с плоским дном. Через четыре дня для ZIKV и пяти дней для DENV клетки фиксируют 2% формальдегидом, насыщают сапонином в 1% ФСБ 0,5% и окрашивают mAb 4G2 мыши. Клетки инкубируют с козьим антителом против IgG мыши, конъюгированным с Alexa Fluor488 (фирма Jackson Immuno-Research, 115485164), и анализируют методом жидкостной цитометрии. В других случаях данные по нейтрализации ZIKV также определяют путем измерения жизнеспособности клеток с использованием реагента WST-1 (фирма Roche).

Титр нейтрализации (50% ингибирующая концентрация [ $IC_{50}$ ]) выражают как концентрацию антител, которая снижает инфекцию на 50% по сравнению с контрольными лунками, содержащими только клетки.

Результаты представлены на фиг. 4, 5 и 9. EDIII-специфические mAb ZKA64 и ZKA190, а также NNB mAb ZKA230, являются высоко активными при нейтрализации ZIKV (штамм H/PF/2013), с величиной  $IC_{50}$  93, 9 и 10 нг/мл, соответственно (фиг. 4, верхняя панель). Напротив, кросс-реакционноспособные антитела ZKA78 только частично нейтрализуют инфекционность ZIKV и инфекционность перекрестно нейтрализуемых DENV1 (фиг. 4, нижние панели). Аналогичные данные получают путем измерения ZIKV-индуцированного цитопатического эффекта, измеренного с помощью реагента WST-1 (фиг. 5). В этом втором анализе NNB антитело ZKA185 также включают в панель тестируемых антител, и оно показало величину  $IC_{50}$ , сходную с наиболее сильнодействующими антителами ZKA190

(EDIII-специфичные) и ZKA230 (NNB).

Важно отметить, что ультра-сильные антитела ZKA64 и ZKA190 в дополнение к их способности нейтрализовать штамм ZIKV H/PH/2013 (настоящий пример) также связаны с белком E и EDIII, полученными из штаммов ZIKV MR766 и SPH2015, соответственно (фиг. 1 и 2). Также было подтверждено, что ZKA190 и ZKA190-LALA эффективно нейтрализуют два дополнительных штамма ZIKV (MR766 и MRS\_OPY\_Martinique\_PaRi\_2015) (фиг. 9). Взятые вместе, результаты показывают, что ультра-сильные антитела ZKA64 и ZKA190 перекрестно реагируют с несколькими штаммами ZIKV, принадлежащими к различным генотипам и имеющими разное происхождение (восточноафриканский и азиатский из Уганды, Французской Полинезии, Мартиники и Бразилии).

Пример 4. Мутация "LALA" подавляет антитело-зависимое усиление инфекции ZIKV сывороточными антителами.

Нейтрализующие антитела также тестируют на способность усиливать инфекцию ZIKV в непермиссивных клетках K562 (антителозависимое усиление; antibody-dependent enhancement, ADE). ADE измеряют методом на основе потока с использованием клеток K562. Антитела и ZIKV H/PF/2013 (MOI 0,175) смешивают в течение 1 ч при 37°C и добавляют к 5000 клеток K562/лунку. Через четыре дня клетки фиксируют, пропитывают и окрашивают m4G2. Количество инфицированных клеток определяют жидкостной цитометрией.

Результаты представлены на фиг. 6. Все антитела усиливают инфекцию ZIKV в непермиссивных клетках K562 в широком диапазоне концентраций, включая те, которые полностью нейтрализовали инфекцию ZIKV на клетках Vero (фиг. 6). Следует отметить, что хотя EDIII-специфические антитела ZKA64 и ZKA190 полностью нейтрализуют ZIKV-инфекции клеток K562 в концентрации выше 1 мкг/мл, NNB-антитело ZKA230 такого результата не вызывает, что может быть связано с различными механизмами нейтрализации свободных вирусов по сравнению с Fc-гамма-рецептор-интернализированных вирусов. Напротив, перекрестно-реактивное ZKA78, которое только частично нейтрализует инфекционность ZIKV, эффективно усиливает ZIKV-инфекцию клеток K562. Эти результаты показывают, что перекрестно-реактивные антитела, вызванные инфекцией ZIKV или DENV, могут опосредовать гетерологичное антителозависимое усиление (ADE).

Ввиду этого было исследовано, может ли ADE также индуцироваться иммунной сывороткой и может ли оно блокироваться нейтрализующими антителами, такими как "вариант LALA". Чтобы получить вариант LALA, каждую из тяжелых цепей мутируют в аминокислотах 4 и 5 домена CH2 путем замены аланином природного лейцина, используя сайт-направленный мутагенез. Выше было описано, что варианты LALA (антител IgG1 человека) не связываются с Fc-гамма-рецепторами и комплементом.

Для изучения эффекта антитела ZKA64-LALA в ZIKV ADE, применяют анализ ингибирования ADE. Поскольку ADE вируса ZIKV наблюдают при использовании ZIKV- или DENV-иммунной плазмы, ZIKV (MOI 0,175) смешивают с плазмой от первичных ZIKV- или DENV-инфицированных доноров в течение 30 мин при 37°C. Антитело ZKA64-LALA добавляют в концентрации 50 мкг/мл, смешивают с 5000 клеток K562/лунку и инкубируют в течение трех дней. Затем клетки окрашивают 4G2 и анализируют жидкостной цитометрией.

Результаты представлены на фиг. 7. В гомологичном окружении четыре образца ZIKV-иммунной плазмы, взятые у выздоравливающих пациентов, и одна DENV-иммунная плазма показывают сходную способность усиливать ZIKV-инфицирование клеток K562 (фиг. 7, верхняя панель), и этот эффект ADE полностью блокирует EDIII-специфическое ZKA64-LALA антитело (фиг. 7, нижняя панель).

Следует отметить, что ADE-эффект ZIKV- и DENV-иммунной плазмы полностью блокирует EDIII-специфическое антитело ZKA64-LALA. Способность ADE блокировать единственное EDIII-специфическое антитело LALA может быть связано не только с его способностью превосходить антитела, усиливающие сыворотку, но также и нейтрализовать вирус после интернализации в эндосомы.

Эти результаты показывают, что сильнодействующие нейтрализующие антитела, например, ZKA190, ZKA230, ZKA185 или ZKA64, разработанные в форме "LALA", обладают сильным потенциалом для использования в профилактических или терапевтических условиях для предотвращения врожденной инфекции ZIKV, например, у беременных женщин и/или у людей, живущих в зонах повышенного риска. Использование формы LALA позволяет избежать риска развития ADE ZIKV и, как показано выше, может также блокировать ADE уже существующих перекрестно-реактивных антител, например, у пациентов, уже имеющих иммунитет к DENV.

Пример 5. ZKA190 нейтрализует ZIKV сильнее, чем антитело известного антитело из предшествующего уровня техники EDE1 mAb C8.

Для сравнения выделенных нейтрализующих антител с высоко нейтрализующими анти-ZIKV-антителами предшествующего уровня техники эффективность нейтрализации ZKA190 сравнивают с показателями высоко нейтрализующего mAb EDE1 C8 предшествующего уровня техники (Barba-Spaeth G. с соавт., Nature, 536 (7614), 2016, 48-53). Нейтрализацию обоих антител тестируют на панели из четырех различных штаммов (H/PF/2013; MR766, MRS-OPY и PV10552).

Вкратце, нейтрализацию инфекции ZIKV с помощью mAb измеряют, используя анализ микро-нейтрализации на основе жидкостной цитометрии. Различные разведения mAb смешивают с ZIKV (MOI

0,35), инкубируют в течение 1 ч при 37° и добавляют к 5000 клеток Vero/лунку в 96-луночных планшетах с плоским дном. Через четыре дня для ZIKV клетки фиксируют 2% формальдегидом, насыщают в ФСБ, содержащем 1% фетальной сыворотки теленка (фирма Nuclone) и 0,5% сапонина, и окрашивают мышинным mAb 4G2. Клетки инкубируют с козым антителом против IgG мыши (goat anti-mouse IgG), конъюгированным с Alexa Fluor488 (фирма Jackson Immuno-Research, номер в каталоге 115485164), и анализируют жидкостной цитометрией. Титр нейтрализации (50% ингибирующую концентрацию [IC<sub>50</sub>]) выражают как концентрацию антител, которая снижает инфекцию на 50% по сравнению с контрольными лунками, в которые вносят только вирус.

Результаты представлены на фиг. 10. ZKA190 mAb сильно нейтрализуют африканские, азиатские и американские штаммы с величиной IC<sub>50</sub>, в диапазоне от 0,6 до 8 нг/мл. Для сравнения, известное в предшествующем уровне техники антитело C8 примерно в 24 раза менее активно.

Пример 6. Дополнительное описание антитела ZKA190.

Активность антитела ZKA190 дополнительно исследуют *in vitro* и *in vivo*. С этой целью mAb синтезировали в формате IgG1 дикого типа (wt) и в формате IgG1 Fc-LALA. Вкратце, последовательности VH и VL клонируют в векторы человека для экспрессии Igγ1, Igκ и Igλ, (любезно предоставлены Michel Nussenzweig, Университет Рокфеллера, Нью-Йорк, Нью-Йорк, США), по существу, в соответствии с публикацией (Tiller T. с соавт., J Immunol Methods, 329, 2008, 112-124). Рекомбинантные mAb получают путем временной трансфекции клеток EXPI293 (фирма Invitrogen), очищают с помощью хроматографии на белке А (фирма GE Healthcare) и обессоливают против ФСБ. Чтобы получить вариант LALA, каждую из тяжелых цепей мутируют в аминокислотах 4 и 5 домена CH2 путем замены аланином природного лейцина с использованием сайт-направленного мутагенеза. Как описано выше, варианты LALA (антител IgG1 человека) не связываются с Fc-гамма-рецепторами и комплементом.

Как показано на фиг. 10А и описано в примере 5, ZKA190 тестируют на панели из четырех штаммов ZIKV. ZKA190 mAb мощно нейтрализуют африканские, азиатские и американские штаммы с IC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,004 до 0,05 нМ (фиг. 10А; 0,6-8 нг/мл).

Поскольку было показано, что ZIKV инфицирует нейрональные клетки-предшественники у человека (human neural progenitor cell - hNPC), что приводит к повышенной токсичности клеток, нарушению регуляции клеточного цикла и снижению роста клеток, ZKA190 и ZKA190-LALA тестируют на hNPC. С этой целью взрослые мужские фибробласты, полученные из Movement Disorders Bio-Bank (Отделение нейрогенетики Неврологического института "Carlo Besta", Милан), перепрограммируют с использованием набора CytoTune-iPS 2.0 Sendai (фирма Life Technologies). Клетки hiPSC поддерживают в условиях без фидера в mTeSR1 (фирма Stem Cell Technologies). Для создания эмбрионидных телец (EB) диссоциированные hiPSC высевают в планшеты с низкой адгезией в mTeSR1 с добавлением N2 (0,5x) (фирма ThermoFisher Scientific), Noggin человека (0,5 мг/мл, фирма R & D System), SB431542 (5 мкМ, фирма Sigma), Y27632 (10 мкМ, фирма Miltenyi Biotec) и пенициллин/стрептомицин (1%, фирма Sigma) (согласно описанию Marchetto M.C.N. с соавт., Cell, 143, 2010, 527-539). Для получения розеток EB высевают через 10 дней на покрытые матригелем чашки (1: 100, фактор роста матригеля уменьшен, фирма Corning) в DMEM/F12 (фирма Sigma) с N2 (1: 100), не являющимися незаменимыми аминокислотами (1%, фирма ThermoFisher Scientific) и смесью пенициллин/стрептомицин. Через 10 дней клетки пассируют с Accutase (фирма Sigma) и высевают в колбы с матригелем в среду NPC, содержащую DMEM/F12, N2 (0,25%), B27 (0,5%, фирма ThermoFisher Scientific), пенициллин/стрептомицин и FGF2 (20 нг/мл, фирма ThermoFisher Scientific). hNPC (3×10<sup>4</sup>) высевают на покровные стекла в 24-луночные планшеты за 3 дня до заражения штаммом PRVABC59. Исходный материал вируса инкубируют с mAb за 1 ч до добавления к hNPC для получения MOI 0,5. После 4 ч адсорбции вируса культуральный супернатант удаляют и повторно добавляют свежую среду, содержащую mAb. Супернатант собирают через 96 ч после заражения для измерения титров вируса с помощью анализа бляшек на клетках Vero. Клетки фиксируют в 4% растворе параформальдегида (PFA, фирма Sigma) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, фирма Euroclone) в течение 30 мин для непрямой иммунофлюоресценции. Фиксированные клетки насыщают в течение 30 мин в блокирующем растворе, содержащем 0,2% Triton X-100 (фирма Sigma) и 10% сыворотки осла (фирма Sigma), и инкубируют в течение ночи при 4° с первичными антителами в блокирующем растворе. Следующее антитело используют для обнаружения анти-оболочки (1: 200, фирма Millipore, MAB10216). Затем клетки промывают ФСБ и инкубируют в течение 1 ч с вторичными антителами Hoeschst и против Alexa Fluor-488 мыши (anti-mouse Alexa Fluor-488) (1:1000 в блокирующем растворе, фирма ThermoFisher Scientific). После промывки ФСБ клетки снова промывают и подвергают мониторингу. Результаты показаны на фиг. 11А. Оба антитела, и ZKA190, и ZKA190-LALA, полностью устраняют инфекцию и подавляют репликацию ZIKV в hNPC.

Затем способность ZKA190 и ZKA190-LALA вызывать ADE тестируют на линии клеток K562, что описано в Примере 4. Вкратце, ADE измеряют анализом на основе потока с использованием клеток K562. Вкратце, ZKA190, ZKA190 и ZIKV N/PF/2013 (MOI 0,175) смешивают в течение 1 ч при 37° и добавляют к 5000 клеток K562/лунку. Через четыре дня клетки фиксируют, насыщают и окрашивают mAb m4G2. Количество инфицированных клеток определяют проточной цитометрией. Для ZKA190-LALA,

ZIKV (MOI 0,175) смешивают с плазмой от первичных ZIKV-инфицированных доноров в течение 30 мин при 37°C. ZKA190-LALA добавляют в концентрации 50 мкг/мл, смешивают с 5000 клеток K562/лунку и инкубируют в течение трех дней. Затем клетки окрашивают 4G2 и анализируют проточной цитометрией. Результаты показаны на фиг. 11Б. ZKA190 поддерживает ADE от 0,0001 до 1 нМ; как и ожидалось, ZKA190-LALA не проявляет активности ADE. Была также протестирована способность ZKA190-LALA ингибировать ADE, индуцированную плазмой от четырех ZIKV-иммунных доноров в клетках K562. Результаты показаны на фиг. 11В. Было обнаружено, что ZKA190-LALA полностью ингибирует ADE, индуцированную антителами плазмы (фиг. 11В).

Антитела против ргМ (anti-ргМ) образуют часть преобладающих антител, вызываемых во время иммунного ответа человека против флавивирусов, и, как было показано, усиливают вирусную инфекцию *in vitro* (Dejnirattisai W. с соавт., 2010). Перекрестно реагирующие антитела усиливают вирусную инфекцию денге у людей (Science 328, 745-748). Клетки K562 предварительно инкубируют с серийными разведениями ргМ перекрестно-реактивного антитела DV62 (Beltramello M. с соавт., Cell Host Microbe 8, 2010, 271-283), полученного от иммунного донора DENV. Результаты показаны на фиг. 11Д. DV62 перекрестно реагирует с белком ргМ ZIKV и вызывает ADE в широком диапазоне концентраций (фиг. 11Г). ZKA190-LALA может полностью блокировать анти-ргМ DV62 mAb-индуцированную ADE незрелых или частично незрелых частиц ZIKV (фиг. 11Г).

В итоге, была протестирована способность различных концентраций FAB ZKA190, ZKA190-LALA и ZKA190 вызывать или блокировать ADE ZIKV в присутствии повышающих концентраций человеческой плазмы против DENV2 или DV62. Результаты показаны на рисунке 11Е. ZKA190 в низких концентрациях увеличивает ргМ DV62-опосредованную ADE инфекции ZIKV, что согласуется с его способностью стимулировать проникновение как незрелых, так и зрелых вирионов, в то время как при концентрациях выше 1,3 нМ (т.е. 200 нг/мл) ZKA190 блокирует ADE, индуцированную как плазмой DENV, так и mAb DV62. ZKA190-LALA, а также его Fab фрагмент снижает ADE в концентрациях выше 0,06 нМ, что указывает на ингибирование в обоих случаях вирусной инфекции на стадии после прикрепления, например, стадии слияния.

Пример 7. ZKA190 связывается с консервативной и высокоактивной областью EDIII.

Для определения эпитопа ZKA190 на остаточном уровне используют разрешающую ЯМР-спектроскопию, описанную в публикациях Bardelli M. с соавт., J. Mol. Recognit. 28, 2015, 393-400; Simonelli L. С соавт., J Mol Biol 396, 2010, 1491-1507; Simonelli L. с соавт, PLoS ONE 8, 2013, e55561.

Вкратце, спектры записывают на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 700 МГц при 300 К. Для отведения резонансов в магистрале используют эксперименты с тройным резонансом (HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CABC, HNCACB, в то время как боковые цепи аннотируют с использованием экспериментов HCCN-TOCSY и HBA(CO)NH. Все эксперименты ЯМР обрабатывают с использованием Topspin 2.1 (фирма Bruker Biospin) и анализируют с помощью CARA. Перекрестные пики NOESY автоматически назначают с помощью макроса CYANA "noeassign" на основе проводимых вручную химических сдвигов. Ограничения на расстояниях используют для расчета структуры в CYANA с использованием стандартного протокола имитированного отжига, получают из спектров NOESY с разрешением 70 мс при  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$ . Динамику магистрале ZIKV ED III получают из измерений релаксации  $^{15}\text{N}$ , записанных на спектрометрах 600 и 700 МГц. Протон-детектированные версии CPMG (R2), инверсии-восстановления (R1) и используют  $^{15}\text{N}\{1\text{H}\}$ -устойчивого NOE. Настройки задержки для серий T2 находятся в диапазоне от 0 до 0,25 с и для серии T1 от 0,02 до 2 с. В эксперименте  $^{15}\text{N}\{1\text{H}\}$ -NOE используют задержка релаксации 5 с. Скорости релаксации R1 и R2 производны от подгонки методом наименьших квадратов соответствующих экспоненциальных функций применительно к полученным данным с использованием заранее написанных сценариев. Данные релаксации анализируют безмодельным подходом с использованием программного пакета DYNAMICS. Программу ROTDIF используют для расчета общего времени корреляции по данным релаксации (8,5 нс). Картирование эпитопов ЯМР проводят согласно описанию (Bardelli с соавт., 2015; Simonelli с соавт., 2010; 2013). Вкратце, наложение спектров  $^{15}\text{NHSQC}$  меченого EDIII, свободного или связанного с Fab ZKA190, позволило идентифицировать остатки EDIII, сигнал ЯМР от которых изменялся при образовании комплекса, указывая на то, что на них влияло связывание ZKA190. Изменения были выявлены путем ручной проверки и с помощью возмущения химического сдвига (CSP),  $\text{CSP} = ((\Delta\delta_{\text{H}})^2 + (\Delta\delta_{\text{N}}/10)^2)^{1/2}$ . Образцы ЯМР обычно представляют 800 мкМ EDIII-меченого [ $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] в 20 мМ фосфате натрия, 50 мМ NaCl, pH 6,0. Пердейтерированные (номинально 70%) образцы  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  EDIII используют для картирования ЯМР-эпитопа с соотношением EDIII:ZKA190 Fab 1: 1,1; концентрация EDIII обычно составляет 0,4 мМ.

Поскольку сигнал ЯМР сильно зависит от локальной химической среды, изменения при образовании комплекса выявляют остатки антигена, на которые влияет связывание антител, либо непосредственно, либо через аллостерические эффекты. Сравнивая спектры ЯМР свободного и связанного EDIII (фиг. 12А), остатки, затронутые ZKA190, были сопоставляют с LR EDIII, в частности с петлями BC, DE и FG, а также с частью петли EDI-EDIII (фиг. 13А). Эти остатки почти идентичны среди 217 известных штаммов ZIKV, за исключением замен по положениям V341I и E393D в изоляте Uganda 1947 (фиг. 12Г). Эти мутации также присутствуют в штамме MR766, который был эффективно нейтрализован ZKA190 (фиг.

10А). Анализ эпитопа ZKA190 на несложной структуре ZIKV показывает, что эпитоп является высоко доступным, за исключением петли FG в 5-кратной вершине (фиг. 13Б и 12В, молекула А).

Рассчитанный докинг с последующим моделированием молекулярной динамики при направлении и подтверждении полученной от ЯМР информации об эпитопах, а также мутагенез EDIII, показывают, что ZKA190 связывается через область контакта, характеризующийся формой и комплементарностью заряда (фиг. 13Б и 12Д). Докинг указывает на отсутствие прямых контактов между ZKA190 и петлей FG на EDIII, подтверждая, что изменения в ЯМР сигналах при связывании антител происходят из-за аллостерических эффектов. Это мнение подтверждается тем фактом, что мутации остатков петли FG в рекомбинантном EDIII, но не в других эпитопных областях, не влияют на аффинность связывания ZKA190 для EDIII (фиг. 13Б и 14).

Пример 8. Механизмы нейтрализации ZKA190.

Способность ZKA190 эффективно нейтрализовать вирус может включать ингибирование, прикрепление клеток, либо слияния мембран. Еще один механизм может включать инактивацию вируса путем перекрестного сшивания вирусных частиц.

Fab ZKA190 может нейтрализовать ZIKV, хотя и менее эффективно, чем соответствующий IgG. Связываясь с линкером EDI-EDIII, ZKA190 (как Fab, так и IgG) может ингибировать поворот DIII на ~70 градусов, необходимый для слияния вируса с мембраной клетки-хозяина (Bressanelli S. с соавт., *Embo J* 23, 2004, 728-738; Modis Y. с соавт., *Nature* 427, 2004, 313-319). В другом варианте, ZKA190 может предотвращать прикрепление ZIKV к клеткам-мишеням.

Способность ZKA190 ингибировать слияние мембран подтверждают анализом конфокальной микроскопии. Для этого клетки Vero высевают в количестве 7500 клеток/лунку на покровные стекла диаметром 12 мм в 24-луночные планшеты и инкубируют в течение ночи. Клетки инфицируют ZIKV H/PF/2013 (MOI 100) в присутствии или в отсутствие нейтрализующих концентраций mAb, конъюгированных с Alexa-488 (0,7 мкМ), при 37°C в течение 3 ч, промывают ФСБ и фиксируют 2% параформальдегид в ФСБ в течение 30 мин при комнатной температуре. Эндосому с кислой средой идентифицируют с помощью красителя LysoTracker red (фирма Invitrogen) путем добавления красителя (50 нМ) к клеткам в течение последних 30 мин инкубации перед фиксацией. За фиксацией следуют обильные промывания в ФСБ и 50 мМ глицине и, наконец, покровные стекла оказываются подготовленными для микроскопического анализа с использованием постоянно монтируемой среды Vectashield для флуоресценции с DAPI (фирма Vector Laboratories). Образцы анализируют с помощью конфокальной микроскопии с использованием микроскопа Leica TCS SP5 с объективом 63 ×/1,4 Н.А. Анализ и обработку изображений проводят с помощью программного обеспечения FIJI.

Результаты представлены на фиг. 15. Анализ конфокальной микроскопии показывает, что ZKA190 (Fab или IgG) может проникать в клетки Vero только в комплексе с ZIKV, при нейтрализующих концентрациях, превышающих IC<sub>50</sub> в 10000 раз (фиг. 15).

Пример 9. Описание *in vivo* EDIII-специфического mAb ZKA190.

ZKA190 и ZKA190-LALA тестируют на мышах A129, зараженных смертельной дозой штамма ZIKV MP1751 (африканское происхождение), для оценки их профилактических и терапевтических свойств.

Для проверки их профилактической активности ZKA190 и ZKA190-LALA вводят за один день до заражения вирусом.

Самкам мышей A129 (IFN-альфа/бета-рецептор -/-) и мышам 129Sv/Ev дикого типа в возрасте 5-8 недель вводят mAb (ZKA190, ZKA190-LALA и контрольное антитело MPE8 (Corti D.C соавт., *Nature* 501, 2013, 439-443), разведенные в ФСБ в различных дозах внутрибрюшинным путем в объеме 500 мкл. Моноклональные антитела (mAb) вводят за 1 день до, или через 1, 2, 3 или 4 дня после заражения вирусом. Животных заражают подкожно 10<sup>2</sup> БОЕ ZIKV (штамм MP1751) и наблюдают в течение 14 дней. Вес и температуру контролируют ежедневно, а клинические наблюдения регистрируют по меньшей мере два раза в день. Через 5 после заражения 50 мкл крови берут у каждого животного в пробирки RNAprotect фирма (Qiagen, Великобритания) и замораживают при -80°C. В конце исследования (14 дней после заражения) или когда животные достигают гуманных конечных точек, проводят вскрытия и берут образцы крови, срезы мозга, селезенки, печени, почек и яичников для вирусологического анализа.

Образцы ткани от мышей A129 взвешивали и гомогенизировали в ФСБ, используя керамические шарики и автоматический гомогенизатор (фирма Precellys, Великобритания), используя шесть 5-секундных циклов при 6500 об/мин с 30-секундным промежутком. Двести мкл гомогената ткани или раствора крови переносят в 600 мкл буфера RLT (фирма Qiagen, Великобритания) для экстракции РНК с использованием набора для экстракции RNeasy Mini (фирма Qiagen, Великобритания); образцы пропускают через гомогенизатор QIAshredder (Qiagen, Великобритания) в качестве начального этапа. Для выявления вирусной РНК у подопытных животных используют специфичный для ZIKV анализ ПЦР реального времени (RT-PCR).

Последовательности праймеров и зондов были взяты и адаптированы из работы (Quick с соавт., *Nat Protoc*, 12, 2017, 1261-1276) с оптимизацией и валидацией для обеспечения оптимального мастермикса и циклических условий. RT-PCR проводят с использованием одностадийного набора qRT-ПЦР Superscript

III Platinum (фирма Life Technologies, Великобритания). Конечный мастермикс (15 мкл) состоит из 10 мкл 2х реакционной смеси, 1,2 мкл воды для ПЦР, 0,2 мкл 50 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мкл каждого праймера (ZIKV 1086 и ZIKV 1162с, оба при рабочей концентрации 18 мкМ) 0,8 мкл зонда (ZIKV 1107-FAM при 25 мкМ рабочей концентрации) и 0,8 мкл ферментной смеси SSIII. Пять мкл матричной РНК добавляют в мастермикс, получая конечный реакционный объем 20 мкл. Используемые условия проведения циклических реакций: 50° в течение 10 мин, 95° в течение 2 мин, затем 45 циклов при 95° в течение 10 с и 60° в течение 40 с, плюс конечная стадия охлаждения 40° в течение 30 с. Количественный анализ с использованием флуоресценции проводят в конце каждой стадии 60°. Реакции проводят и анализируют на платформе 7500 Fast (фирма Life Technologies, Великобритания) с использованием программного обеспечения 7500 версии 2.0.6. Количественное определение вирусной нагрузки в образцах проводят с использованием серийных разведений олигонуклеотида РНК с установленной концентрацией (фирма Integrated DNA Technologies). Олигонуклеотид, содержащий 77 оснований РНК ZIKV, на которые нацелен анализ, основан на информации GenBank AY632535.2, и был синтезирован в количестве 250 нмоль с очисткой ВЭЖХ.

Результаты представлены на фиг. 16, 17 и 18. Было показано, что ZKA190 и ZKA190-LALA защищают мышей от смерти и заболеваемости в концентрациях 5, 1 или 0,2 мг/кг (фиг. 16А, Б). ZKA190-LALA и, в меньшей степени, ZKA190, замедляют заболеваемость и смертность по сравнению с контрольной группой при 0,04 мг/кг. Титры вируса в крови и органах были значительно снижены по сравнению с контрольными животными, которых лечили антителами, еще при наличии уровней сывороточных антител ниже 1 мкг/мл (фиг. 17А-Г).

Чтобы оценить терапевтический потенциал ZKA190, в настоящем исследовании вводят ZKA190 и ZKA190-LALA в разные моменты времени после инфицирования ZIKV. При дозе 15 мг/кг выживаемость достигает 80-100%, а заболеваемость значительно снижается, когда лечение проводят через четыре дня после заражения (фиг. 16А, Б). Лечение ZKA190 и ZKA190-LALA во все моменты времени после заражения приводит к значительному снижению титров вируса по сравнению с животными, получавшими контрольное антитело, с явной тенденцией к большему снижению при более раннем начале лечения (фиг. 18А-16В). Следует отметить, что ZKA190-LALA проявляет существенно заниженную противовирусную активность в образце крови на 5-й день по сравнению с ZKA190, когда mAb давали через четыре дня после заражения, что может быть связано с нарушением способности варианта LALA способствовать быстрому клиренсу из вирионов с покрытием.

Из 16 обработанных мышей был выделен один антитело-избегающий мутант *in vivo* (устойчивый к моноклональным антителам мутант 1; Monoclonal Antibody Resistant Mutant 1 - MARM1), содержащий аминокислотную замену в DIII (T335R, в центре эпитопа), тогда как вирусы от других обработанных мышей не обладают какими-либо E-мутациями. Интродукция мутации T335R в рекомбинантный DIII показало, что он отменяет связывание ZKA190, что было определено с помощью SPR (фиг. 14; см. экспериментальные методы примера 7).

Пример 10. Отбор *in vivo* ускользящих мутантов ZIKV.

Использование антитело-терапевтических средств может привести к отбору антитело-избегающих мутантов. Чтобы оценить способность ZKA190 отбирать устойчивые мутанты (MARM) *in vitro*, ZIKV (H/PF/2013) пассируют в присутствии суб-нейтрализующих концентраций ZKA190.

Вкратце, две тысячи TCID<sub>50</sub> H/PF/2013 ZIKV в 500 мкл инкубируют с 250 мкл, содержащими различные концентрации mAb (8 различных концентраций, начиная с конечной концентрации 200 мкг/мл и выполняя серийные разведения 1:4). Смесь инкубируют в течение 45 мин при 37°, после чего добавляют 250 мкл суспензии клеток Vero (3,2×10<sup>6</sup> клеток) и инкубируют в 24-луночном планшете в течение трех-четырех дней при 37°, чтобы обеспечить размножение вируса. После каждого этапа отбора берут 500 мкл супернатантов из трех вариантов: самая низкая концентрация mAb, при которой наблюдают полная защита монослоя, одна концентрация, при которой наблюдают частичный эффект CPE на клеточный монослой, и одна концентрация, при которой 100% клеточного монослоя было разрушено ZIKV CPE. Пробирку центрифугируют в течение 5 мин при 1000×g, отбирают аликвоту и хранят при -80°. Половину объема снова предварительно смешивают с различными концентрациями mAb, чтобы повторить процесс отбора и размножения. Оставшийся супернатант используют для анализов микро-нейтрализации и последующего секвенирования вируса.

Для идентификации антитело-избегающих мутантов отобранного вируса MARM проводят экстракцию геномной РНК с последующей одностадийной ПЦР для амплификации и секвенирования ампликона E белка ZIKV. Супернатант клеток (140 мкл) в результате селекции MARM используют для экстракции РНК с помощью мини-набора QIAamp Viral RNA (фирма Qiagen). Синтез кДНК и амплификацию ПЦР проводили вместе, используя Superscript III One-Step RT-PCR с платиновой меткой (Platinum Taq, фирма Invitrogen). Для одной реакции используют 25 мкл реакционной смеси, 8 мкл стерильной воды, 2 мМ каждого праймера, 1 мкл РНКазы (фирма Life Technologies), 2 мкл Superscript III RT/Platinum TaqMix и 12 мкл РНК, что в итоге составляет конечный объем реакции 50 мкл. Для N-концевой части E белка пара праймеров Zika-E-F1 5'-TGCAAACGCGGTCGCAAACCTGGTTG-3' (SEQ ID NO: 266) и ZIKV-E-R1 5'-

CGTGCCAAGGTAATGGAATGTCGTG-3' (SEQ ID NO: 267) и для С-концевой части пары праймеров ZIKV-Ef1530 5'-AGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGA-3' (SEQ ID NO: 268) и ZIKV-E-R2769 5'-TTACAGATCCCACAACGACCGTCAG-3' (SEQ ID NO: 269) используют. Условия циклирования: 54° в течение 40 мин, 94° в течение 2 мин, затем 45 циклов при 94° в течение 45 с, 50° в течение 45 с и 68° в течение 1,5 мин с конечной стадией элонгации при 68° в течение 5 мин и заключительный этап охлаждения при 4°. Продукты ПЦР анализируют и экстрагируют из 1,5% агарозного геля и дополнительно очищают с помощью набора для очистки ДНК и гелевой полосы GFX (фирма GE Healthcare). Для реакции секвенирования 8 мкл очищенного продукта ПЦР смешивают с 2 мкМ праймера в конечном объеме 10 мкл и отправляют для секвенирования (фирма Microsynth). Е белка N-концевые продукты секвенируют с ZIKV-E-F2 5'-ACTTGGTCATGATACTGCTGATTGC-3' (SEQ ID NO: 270) и ZIKV-E-R2 5'-TCGGTTCACAATCAAGTCCTAGGCT-3' (SEQ ID NO: 271), С-концевые PCR с ZIKV-E-f2058 5'-GCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCA-3' (SEQ ID NO: 272) и ZIKV-E-r2248 5'-AAGACTGCCATTCTCTTGGCACSTC-3' (SEQ ID NO: 273). Последовательности собирают и анализируют с помощью программного обеспечения CLC Main Workbench (фирма CLC Bio, версия 5).

Устойчивый мутант MARM2 был выделен после трех раундов отбора, и его Е белок проявил мутацию E370K в DHL Мутация отменяет нейтрализацию с помощью ZKA190, хотя антитело может связываться с мутантным DIII (фиг. 14). Мутации в MARMS *in vivo* (T335R) и *in vitro* (E370K) расположены на ВС и DE петлях DIII, соответственно, и согласуются с эпитопом, идентифицированным ЯМР.

Пример 11. Разработка биспецифических антител по настоящему изобретению.

Вирусные антитело-избегающие мутанты могут значительно снизить эффективность терапевтических антител. Чтобы преодолеть эту проблему, авторы настоящего изобретения выдвинули гипотезу, что вероятность выхода вируса будет значительно уменьшена при объединении двух высоко нейтрализующих антител. В связи с этим был получен ряд биспецифических антител, сочетающих ZKA190 с другими мощно нейтрализующими mAb, направленными на разные сайты на Е белке. Таким образом, задача была сфокусирована на двух mAb, ZKA185 и ZKA230, которые являются высоко нейтрализующими и не конкурируют с ZKA190.

Во-первых, их способность к перекрестной нейтрализации четырех штаммов ZIKV была проанализирована, согласно описанному выше. ZKA185 и, в меньшей степени, ZKA230, сильно нейтрализуют африканские, азиатские и американские штаммы с IC50 в диапазоне от 0,02 до 0,62 нМ (фиг. 19А). ZKA185 связывается с высокой аффинностью с рекомбинантным белком ZIKV Е и с вирусоподобными частицами Zika (VLP), но не с выделенным DIII (фиг. 19Б). Наоборот, ZKA230 связывается с VLP ZIKV, но не с рекомбинантным Е или DIII, отсюда предположение, что оно распознает четвертичный эпитоп, отображаемый только на вирусной поверхности (фиг. 19Б). Было показано с помощью ELISA, что IgKA и Fab ZKA185 связываются с антигенами Е и VLP с аналогичным высоким сродством.

Чтобы идентифицировать эпитопы ZKA185 и ZKA230, а также их склонность к образованию антитело-избегающих мутантов, MARM против ZKA185 (MARM3) и ZKA230 (MARM4) выделяют пассированием вируса в присутствии суб-нейтрализующих концентраций антител, как описано выше. MARM3 содержит замещения в K84E и D67H, которые оба расположены в DII (фиг. 19Г). MARM4 показал смесь различных аминокислотных замен в положении 84 (К на G, Е или R), подтвержденную в экспериментах с множественным секвенированием. Кроме того, MARM с 1 по 4 были протестированы против ZKA190, ZKA185 и ZKA230. ZKA190 нейтрализует MARM ZKA185 и ZKA230, а также родительский вирус (фиг. 19В). ZKA185 нейтрализует как ZKA190, так и ZKA230 MARM. ZKA230 нейтрализует только ZKA190 MARM2 и не нейтрализует ни ZKA190 MARM1, ни ZKA185 MARM3.

Чтобы получить представление о разработке MARM, способных к выходу из-под давления нескольких антител, ZKA190 MARM2 (E370K) серийно пассировали в присутствии ZKA185 или ZKA230. Таким образом, было обнаружено, что двойные MARM возникают после 3-4 пассажей. ZKA230 содержит дополнительную мутацию K84E, в то время как ZKA185 выбран для мутации D76G. Эти данные указывают на то, что ZIKV может избежать нейтрализации несколькими антителами, нацеленными на разные сайты, когда отбор проводится поэтапно, и подтвердили высокую пластичность Е белка ZIKV.

Таким образом, ZKA185 было выбрано для использования вместе с ZKA190 для разработки биспецифического антитела, поскольку он сильно перекрестно нейтрализует штаммы ZIKV, связывается с альтернативным сайтом и не конкурирует с ZKA190. Биспецифическое антитело было получено в четырехвалентном симметричном формате, называемом Fabs-in-tandem-Ig (FIT-Ig). FIT-Ig подробно описаны, например, в WO 2015/103072 A1 и в работе Gong S. с соавт., MAbs 2017.

FIT-Ig может быть получен с использованием трех полипептидов. Полипептид 1 обычно содержит легкую цепь внешнего Fab, слитого, без линкеров, с N-концевой областью внутренней тяжелой цепи Fab. Полипептид 2 обычно содержит вариабельные области тяжелой цепи и области CH1 внешнего Fab, а полипептид 3 обычно содержит легкую цепь внутреннего Fab. Соответственно, антитело формата FIT-Ig обычно содержит "внутренний Fab" и "внешний Fab". Два типа FIT-Ig были получены с Fab ZKA190 либо во внешнем, либо во внутреннем положении. Вкратце, три гена, кодирующих FIT-Ig, были оптимизированы по кодонам, синтезированы фирмой Genscript и клонированы следующим образом: i) VL внешнего Fab, за которым следует полная константная область (лямбда или каппа), сливают с VH из внутренне-

го и клонируют в вектор экспрессии Igy1 (модифицированный для кодирования мутации LALA). Полученный полипептид 1 образован VL и CL внешнего Fab, VH внутреннего Fab слит с доменами IgG1 CH1-шарнир-CH2-CH3; ii) ген VH внешнего Fab (кодирующий полипептид 2, образованный VH и CH1 внешнего Fab) клонируют в вектор экспрессии Fab (вектор экспрессии Igy1, в который введен стоп-кодон после кодона, кодирующего цистеин CH1) остаток 220); iii) ген VL внутреннего Fab клонируют в векторы экспрессии Iгк или Iгλ (кодирующие полипептид 3, образованный VL и CL внутреннего Fab). Рекомбинантные mAb FIT-Ig получают путем временной трансфекции клеток EXP1293 (фирма Invitrogen) с использованием мольного соотношения 1:3:3 трех конструкций, описанных выше (как описано в WO 2015/103072 A1), очищенных хроматографией на белке А (GE Healthcare) и обессоленные против ФСБ. Белки анализируют с помощью SDS-PAGE в восстановленных и невосстановленных условиях, а их концентрации определяют с помощью BCA (фирма Pierce, Rockford, США). В невосстановленных условиях FIT-Ig движется как одна большая полоса массой приблизительно 250 кДа. В восстанавливающих условиях каждый из белков FIT-Ig дает две полосы, одна с большей молекулярной массой полоса представляет собой полипептид 1 приблизительно из 75 кДа, а вторая, с меньшей массой, соответствует обоим полипептидам 2 и 3, перекрывающимся приблизительно при 25 кДа. Для дальнейшего изучения физических свойств FIT-Ig в растворе для анализа каждого белка используют эксклюзионную хроматографию (size exclusion chromatography - SEC). Очищенный FIT-Ig в ФСБ наносили на колонку Superdex 200 Increase 5/150 GL. Все белки определяли с использованием УФ-детекции при 280 и 214 нм. Белки FIT-Ig демонстрируют один основной пик, свидетельствуя о физической гомогенности в виде мономерных белков.

Пример 12. Описание *in vitro* антитела по настоящему изобретению (FIT-1).

Биспецифическое антитело FIT-Ig (в настоящем изобретении обозначаемое как FIT-1) с ZKA190 во внешнем и ZKA185 во внутренних положениях Fab (фиг. 19Д) было отобрано и дополнительно охарактеризовано. ELISA показывает, что FIT-1 связывает DIII, E и VLP (фиг. 19Е). FIT-1 сохраняет высокую нейтрализующую активность в отношении штаммов ZIKV, причем значения IC50 в значительной степени сходны со значениями родительских антител ZKA190 и ZKA185 (фиг. 19Ж). FIT-1 был получен с использованием основного антитела IgG1 в формате LALA, таким образом исключая любую возможность вызывать ADE. Некоторые данные свидетельствуют о том, что оба фрагмента ZKA190 и ZKA185 в формате FIT-1 являются активными. Во-первых, FIT-1 связывается с E белком с более высокой аффинностью, чем у родительских антител ZKA190 и ZKA185 (значения KD: ZKA185 1,8 нМ, ZKA190 9,3 нМ и FIT-1 KD <1 пМ из-за более низкой скорости диссоциации, предположительно благодаря эффектам avidности). Во-вторых, FIT-1 эффективно нейтрализует все MARM ZKA190, ZKA185 и ZKA230 (фиг. 19Н) в отличие от отдельных mAb. Нейтрализующая активность Fab-фрагмента FIT-1 (каждый из которых содержит один ZKA190 и один ZKA185) была снижена только примерно в 6 раз (фиг. 19И, правая панель).

Затем была проверена способность FIT-1 отбирать MARM (описано выше). Тем не менее, несмотря на восемь раундов серийных пассажей, MARM не были изолированы. Напротив, MARM появлялись после 3-4 пассажей, когда использовались отдельные mAb. Эти результаты свидетельствуют о том, что использование FIT-1 в качестве терапевтического средства более безопасно, поскольку вероятность одновременных мутаций как в DIII, так и в DII меньше.

Исследования конфокальной микроскопии с использованием клеток Vero также показали, что FIT-1, как ZKA190, вероятно, ингибируют вирусную инфекцию на этапе после прикрепления, вероятно, на этапе слияние (фиг. 19К).

Наконец, FIT-1, а также его фрагмент Fab блокируют ADE плазмы человека против DENV2 или DV62 в концентрациях выше 0,1 нМ и 10 нМ, соответственно (фиг. 19К), демонстрируя, что FIT-1 не вызывает ADE и может блокировать ADE моноцитарных клеток путем плохо нейтрализующих перекрестно-реактивных антител.

Пример 13. Терапевтический потенциал FIT-1 *in vivo*.

Для оценки терапевтического потенциала FIT-1, три разные дозы (15, 5 и 1 мг/кг) вводят в три разные временные точки самкам мышей A129 после инфицирования ZIKV. Вкратце, самок мышей A129 распределяют по 10 разным группам (контрольная и три группы с разными дозировками с тремя разными временными точками введения для каждой дозы). Всех животных заражали подкожно 10<sup>7</sup> БОЕ ZIKV (штамм MP1751) и наблюдают в течение 14 дней. Мышам из девяти групп лечения биспецифическое антитело FIT-1, разведенное в ФСБ, в дозах 15, 5 или 1 мг/кг вводят внутрибрюшинно в объеме 500 мкл в день 1, день 2 или день 3 после заражения вирусом ZIKV. Вес и температуру всех животных контролируют ежедневно, клинические наблюдения регистрируют, по меньшей мере, два раза в день. На 5 день после заражения отбирают 50 мкл крови от каждого животного в пробирку RNeasy Protect (фирма Qiagen, Великобритания) и замораживают при -80°C. В конце исследования (через 14 дней после заражения) или когда животные достигают конечных точек человека, проводят вскрытия и собирают кровь, участки мозга и яичника для вирусологического анализа.

Результаты представлены на фиг. 20. Данные показывают, что при дозе 15 мг/кг выживаемость со-

ставляет 100% без признаков заболеваемости, когда лечение проводилось через три дня после заражения (фиг. 20А); титры вируса обнуляются, а также не было обнаружено escape мутантов, что указывает на высокую эффективность *in vivo*. Введение 5 мг/кг приводит к выживаемости 70-100%, также не обнаруживают escape мутантов на 5 день после заражения. Наименьшая испытанная доза (т.е. 1 мг/кг) защищает, если ее вводят в 1 или 2 день, но на день 3 после заражения.

Пример 14. Воздействие FIT-1 на заболевание на модели врожденной инфекции у мышей AG129.

Эффект лечения FIT-1 зараженных беременных самок, оразившийся на мышатах, рожденных от инфицированных и обработанных матерей, был оценен на мышинной модели врожденной инфекции ZIKV, от которых получают живое потомство после врожденного воздействия ZIKV. В этой модели используют мышей AG129 с дефицитом рецепторов IFN, что приводит к репликации вируса в плаценте, передаче вируса плоду и потенциальным долгосрочным последствиям, например, к внутриутробным ограничениям роста и нарушениям слуха.

Проверяют влияние лечения FIT-1 на различные параметры в контексте внутриутробной инфекции. С этой целью мышей заражают ZIKV через 7 дней после полового акта (ДППА) и обрабатывают FIT-1 через 1 или 3 дня после заражения вирусом (см. пример 13). Различные результаты заболевания, такие как титр вируса у плода и плаценты и ограничение внутриутробного роста, оценивают для определения эффекта лечения FIT-1.

Материалы и методы.

Животные. Используют 42 самок мышей AG129. Животных случайным образом распределяют по экспериментальным группам, и каждое животное помечают ушными бирками. Гормональное лечение используют для стимулирования периода течки. Самки были индивидуально помещают вместе с самцами и исследуют на предмет влажной пробки через 0,5 дня после полового акта (ДППА).

Вирус. Используют вирус Зика штамм Malaysia (P6-740). Требуемую дозу заражения вводят подкожно в количестве 0,1 мл.

Тест-агент. FIT-1 вводят в дозе 45 мг/кг. Неспецифическое контрольное антитело MPE8-LALA Ctr IgG1 применяют в качестве изотипического контроля в лечении плацебо.

Количественная оценка вируса. Титр вируса в различных тканях определяют количественно методом полимеразной цепной реакции реального времени (RT-PCR). Тотальную РНК экстрагируют из образцов ткани с использованием TRIzol (фирма ThermoFisher Scientific, номер в каталоге 15596018). Объем 2 мкл препарата РНК используют для амплификации. Серийные разведения синтетической РНК, охватывающие область амплификации, используют для получения положительного контроля; неразбавленная синтетическая РНК ZIKV содержит  $10^{8,0}$  копий/мкл. Образцы подвергают 40 циклам по 15 с при 95° и 60 с при 60°, после одного начального цикла длительностью 30 мин при 50° и 10 мин при 95°. Образцы неизвестного количества определяют количественно путем экстраполяции значений  $C(t)$  с использованием кривой, полученной из серийных разведений синтетической РНК ZIKV.

Построение эксперимента. Беременных самок подвергают заражению через 7 дней после полового акта (ДППА) и обрабатывают FIT-1 через 24 или 72 ч после заражения вирусом. Двух самок из каждой группы вскрывают через 11 дней после заражения вирусом. Плаценту, ткани плода, ткани головного мозга и ткани селезенки собирают для определения титра вируса методом QRT-PCR. По две самки в каждой группе рожают. Регистрируют затылочно-лобный диаметр головы (occipito-frontal diameter - OF) и длину от головы до конца туловища (crown rump length - CRL) цифровым штангенциркулем; внутриутробный рост мышат определяют по формуле:  $CRL \times OF$ . Вес щенков и самок измеряют в различное время.

Статистический анализ. Данные по выживаемости анализируют методом Wilcoxon log-rank survival analysis (Prism 5, фирма GraphPad Software, Inc).

Результаты и обсуждение.

Лечение FIT-1 оценивают на мышинной модели с врожденной инфекцией и заболеванием, связанным с инфекцией ZIKV. Лечение с помощью FIT-1 является защитным для беременных женщин, причем подавляющее большинство обработанных самок защищают от смерти, независимо от того, когда проводят лечение (фиг. 21). Самки, получавшие неспецифическое отрицательное контрольное антитело, имеют уровень смертности, сходный с тем, который наблюдали в предыдущих исследованиях.

Наблюдают тенденцию к улучшению результатов определения среднего размера мышат. Средний размер мышат от самок, обработанных FIT-1, выше, чем у мышат от самок контрольной группы с обработкой MPE8, и был близок показателям ложно инфицированных животных (фиг. 22). Это различие менее выражено в отношении веса плода, и по этому показателю во всех группах получены близкие средние значения (фиг. 23). Отмечают тенденцию к увеличению веса плаценты у самок, обработанных FIT-1 (фиг. 24).

Титр вируса в разных тканях показан на фиг. 25. Наблюдалось значительное снижение вирусной РНК у плода и плаценты у самок, обработанных FIT-1 (соответственно, фиг. 25А и Б). Снижение было особенно очевидным в тканях плаценты с приблизительно  $5\text{-log}_{10}$  снижением уровней РНК ZIKV. У самок, получавших FIT-1, в материнской селезенке и мозге также значительно понижена вирусная РНК (на несколько  $\log_{10}$ ) по сравнению с самками, получавшими MPE8 (соответственно, фиг. 25В и Г).

Обсуждение.

В целом, эти данные подтверждают защитную роль FIT-1 в профилактике или лечении заболеваний у плодов, врожденно подверженных воздействию ZIKV. Наблюдают тенденцию к улучшению параметров размера плода и плаценты со значительным снижением титра вируса в различных тканях матери и плода.

Пример 15. Влияние FIT-1 на заболевание на примере модели инфекции семенников у мышей AG129.

Передача половым путем и постоянное заражение мужского репродуктивного тракта были зарегистрированы у мужчин, инфицированных вирусом Зика (D'Ortenzio E. с соавт., *N Engl J Med* 2016; 374, 2016, 2195-2198). У мышиного мышей AG129 тяжелое заболевание обычно наблюдают примерно через 2 недели после заражения вирусом, включая значительную репликацию вируса в семенниках мышей (Jullander J.G. с соавт., *Antiviral Res* 137, 2016, 14-22). Ключевые сайты репликации вируса в репродуктивном тракте самцов мышей AG129 включают эпидидимис и семенники, а также различные сопутствующие половые железы.

В настоящем исследовании влияние FIT-1 на самцов мышей, инфицированных ZIKV, оценивают на модели инфекции семенников. С этой целью самцов мышей AG129 инфицируют ZIKV и оценивают патологию в мужском репродуктивном тракте после заражения ZIKV и лечения FIT-1.

Материалы и методы.

Животные. Используют самцов мышей AG129. Животных случайным образом распределяют по экспериментальным группам и каждое животное помечают ушными бирками.

Вирус. Используют вирус Зика штамм Puerto Rican (PRVABC-59). Дозу для заражения  $10^2$  CCID<sub>50</sub> вводят подкожной инъекцией в паховую складку в количестве 0,1 мл. Эта доза заражения обычно летальна у мышей AG129, не прошедших лечения, смерть наступает примерно через 2 недели после заражения.

Тест-агент. FIT-1 вводят в дозе 15 мг/кг. Неспецифическое контрольное антитело MPE8-LALA Ctr IgG1 применяют в качестве изотипического контроля (плацебо) в лечении.

Гистопатология. Ткани собирают и инкубируют в течение 24 ч в нейтральном забуференном формалине. После соответствующей фиксации все собранные ткани обрезают и хранят в 70% этаноле до проведения обычной обработки, заливки в парафин и резки. Все ткани анализирует независимым слепым методом патологоанатом ветеринарной службы и выдает подробный сертификат. Система оценки была разработана для оценки степени тяжести воспаления в репродуктивных путях.

Построение эксперимента. Мышей заражают ZIKV и подвергают мониторингу в течение 28 дней после заражения вирусом на предмет выживания и изменения веса. Лечение 15 мг/кг FIT-1 проводят через 24 или 72 ч после заражения вирусом. Однократное лечение проводят внутрибрюшинным введением 0,1 мл. Контрольное антитело MPE8-LALA Ctr IgG1, соответствующее изотипу, вводят согласно описанному выше, через 24 ч после заражения вирусом. Для контроля токсичности в исследование включают группу мышей с имитацией заражения вирусом, которых обрабатывали FIT-1, а также просто контрольную группу без какого-либо воздействия. Индивидуальные веса самок мышей определяют в точке 0 и через день на протяжении 7-21 суток после ДППА. Мышей ежедневно наблюдают на наличие признаков заболевания, включая конъюнктивит, сгорбленность, слабость конечностей или паралич, и регистрируют начальные признаки заболевания. Группу из 3 животных вскрывают на 6 сутки ДППА и образцы ткани собирают для гистопатологического анализа.

Статистический анализ. Данные по выживаемости анализируют методом Wilcoxon log-rank survival analysis (Prism 5, фирма GraphPad Software, Inc).

Результаты и обсуждение.

Вирус Зика (ZIKV) может сохраняться в мужских репродуктивных тканях в течение длительных периодов, до шести месяцев, что является очевидной мишенью противовирусного лечения. Чтобы определить эффективность биспецифического антитела против ZIKV для профилактики или уменьшения патологии мужского репродуктивного пути, группы мышей обрабатывали через 24 или 72 ч после заражения пуэрториканским изолятом вируса ZIKV. Выживание, изменение веса и гистопатологию определяют для оценки эффективности лечения mAb. В качестве плацебо-терапии используют mAb контрольного изотипа MPE8-LALA Ctr IgG1.

Значительное ( $P < 0,05$ ) улучшение выживаемости наблюдают по сравнению с лечением плацебо mAb (фиг. 26). Полную выживаемость наблюдают у мышей, обработанных через 24 ч после заражения FIT-1, хотя среди мышей, обработанных через 72 ч после инокуляции вирусом, появилось одно животное, которое погибло от вирусной инфекции. Это единственное животное было умерщвлено через 24 дня после заражения вирусом, что было намного позже, чем у животных, получавших плацебо (фиг. 26). Поскольку заражение мышей AG129 вирусом ZIKV приводит к летальности, которая намного более серьезная, чем при обычной естественной инфекции этим вирусом, высокие уровни защиты, которые наблюдают при применении FIT-1, являются очень многообещающими.

Изменение среднего веса у мышей, обработанных FIT-1, было сходным с таковым у мышей с ложно инфицированными контрольными обработками, в то время как средний вес мышей, обработанных MPE8, быстро снижался после 7 ДППА, что дополнительно демонстрирует мощную защиту мышей от заболе-

вания (фиг. 27).

Поскольку основная цель настоящего исследования заключается в том, чтобы оценить влияние лечения на мужской репродуктивный путь, а в предыдущих исследованиях семенники и придатки были наиболее сильно поражены после инфекции, особое внимание было уделено гистопатологии этих тканей. Никакого проявления заболевания не наблюдают в семенниках или придатках мышей, получавших FIT-1, за исключением одного животного в 24-часовой лечебной группе (фиг. 28), что дополнительно демонстрирует эффективность лечения FIT-1. FIT-1 также защищает мышей от заболевания, когда лечение начинают через 72 ч после заражения вирусом, поскольку ни у одной из мышей, которых лечили в это время, не наблюдалось заболевания семенников или придатков (фиг. 28). У большинства мышей в группе, получавшей плацебо, было воспаление семенников (2/3) и придатков (3/3) (фиг. 28), хотя тяжесть заболевания в этом исследовании была довольно легкой.

Заключение.

Лечение с применением FIT-1 было эффективным в плане снижения всех оцениваемых параметров заболевания. Терапевтическое лечение до 72 ч после заражения вирусом было очень эффективным.

Пример 16. Профилактическая и терапевтическая эффективность FIT-1 у макак-резус, зараженных ZIKV.

В этом исследовании оценивают профилактическую и терапевтическую эффективность биоспецифического антитела, нацеленного на вирус Зика (ZIKV), у индийских макак-резус (IRM), зараженных штаммом ZIKV PRVABC59. Шестнадцать (16) IRM рандомизируют на три лечебные группы. Одна группа получает FIT-1 за один день до заражения (5 мг/кг), а вторая получает лечение через один день после заражения (15 мг/кг). Третья группа получает контроль изотипа (FIT-3, 5 мг/кг) за день до заражения. В день 0 всех IRM заражают  $1 \times 10^5$  БОЕ штамма ZIKV PRVABC59, введенного путем подкожной инъекции. Сыворотку, мочу и слюну собирают в заранее определенные моменты времени и определяют нагрузку ZIKV, измеренную методом количественной RT-PCR.

Методы.

До начала исследования (дня 0) шестнадцать (16) IRM рандомизируют по соответствующим группам в соответствии с полом/весом с использованием программного обеспечения Provantis. В дни -1 или 1 животные получают либо FIT-1, либо FIT-3 контрольного изотипа, путем внутривенного введения в дозе, указанной в табл. 4 ниже. В день 0 всех макак анестезируют и заражают 0,5 мл штамма ZIKV дикого типа PRVABC59 с целевой контрольной дозой  $1,0 \times 10^5$  БОЕ на животное путем подкожной инъекции. Образцы крови, мочи и слюны собирают в заранее установленные моменты времени, указанные в табл. 5, для оценки вирусной нагрузки методом RT-qPCR.

Таблица 4

#### Разделение животных по группам

Группа	Лечение	Сутки лечения	Способ лечения, доза	Стимуляция антигеном <sup>1</sup>
1 (3 самца/ 3 самки)	FIT-1	Сутки -1	Внутривенное введение, 5 мг/кг	
2 (3 самца/3 самки)	FIT-1	Сутки +1	Внутривенное введение, 15 мг/кг	
3 (2 самца/2 самки)	FIT-3	Сутки -1	Внутривенное введение, 5 мг/кг	

<sup>1</sup>Подкожная стимуляция антигеном в 0 сутки в виде 0,5 мл ZIKV дикого типа.

Таблица 5

#### Ключевые активности

Сутки лечения	-1	0	1	5	10	15	20	25	30
Лечение	√		√						
Стимуляция антигеном ZIKV (подкожное введение)		√							
Число наблюдений в сутки	Всех животных наблюдают два раза в сутки								
Масса тела						√	√	√	√
Температура тела						√	√	√	√
Взятие крови на анализ <sup>1</sup>						√	√	√	√
Взятие проб мочи/слюны на анализ		√		√	√	√			
Нагрузка вируса: РВ-кПЦР						√	√	√	√
Объем крови (мл)			2			2	2	2	20
Эвтаназия									√

<sup>1</sup>В нулевые и 1 сутки кровь на анализ берут до стимуляции антигеном и до лечения.

В дни исследования -1 (группы 1 и 3) и 1 (группа 2) анестезированным животным вводят либо FIT-1 (исходная концентрация: 3,67 мг/мл), либо FIT-3 (исходная концентрация: 3,79 мг/мл) посредством внутривенной инъекции в правую подкожную или головную вену.

ZIKV, штамм PRVABC59; Human/2015/Puerto Rico (американский изолят) используют в этом исследовании. Приготовление инокулята вируса проводят в кабинете биологической безопасности класса II

в условиях BSL-2. Исходный материал вируса оттаивают на водяной бане при  $37 \pm 1^\circ$ , встряхивают и разбавляют VP-SFM, получая инокулят с соответствующей концентрацией  $2 \times 10^5$  БОЕ/мл. Каждый шприц заполняют 0,5 мл инокулята вируса и хранят на льду до тех пор, пока не доставляют в помещение для животных для введения. В день исследования 0 всех животных анестезируют, в месте инъекции делают надрез, протирают спиртом и наносят несмываемую метку. Животных инокулируют подкожно на передней поверхности левого предплечья 0,5 мл изолята ZIKV в дозе, указанной в табл. 4.

Всех макак наблюдают два раза в день на протяжении всего периода карантина и исследуют на наличие признаков заболеваемости или смерти. Животных наблюдают два раза в день (с интервалом не менее 8 ч) на чувствительность и клинические проявления, включая сыпь, эритему, конъюнктивит, выделения из глаз и отеки. Для всех животных кровь собирают во время, указанное в табл. 5, для тестирования вирусной нагрузки *in vitro* методом RT-qPCR. На 30-й день во время терминального кровотечения берут кровь, не более 20 мл от одного животного. У всех животных собирают мочу во время, указанное в табл. 5, для тестирования *in vitro* с помощью метода RT-qPCR мониторинга выделения вируса. Животных содержат в отдельных помещениях в течение периодов сбора мочи на протяжении исследования. Мочу собирают непосредственно из поддонов клеток, после сбора помещают на тающий лед, разделяют на аликвоты и хранят при  $-70^\circ\text{C}$  или ниже до готовности к проведению анализа. Слюну собирают у анестезированных животных непосредственно в пробирки (примерно до 0,5 мл). Образцы хранят после сбора на тающем льду и хранят при  $-70^\circ\text{C}$  или ниже до готовности к проведению анализа.

Вирусные нагрузки измеряют с использованием метода RT-qPCR для обнаружения геномов ZIKV в образцах сыворотки, мочи и слюны, собранных в моменты времени, указанные в табл. 5. Образцы, выделенные от зараженных вирусом животных, тестируют с использованием праймеров и зондов, предназначенных для обнаружения ZIKV штамма PRVABC59. Опубликовано описание методов ПЦР, включая последовательности праймеров и зондов (Goebel с соавт., J. Virol. 2016). Вирусную РНК выделяют из биологических жидкостей с использованием мини-набора QIAmp Viral RNA (фирма Qiagen, 52906). Вирусную РНК элюируют стерильной водой, не содержащей РНКазу и ДНКазу, и хранят при  $-70^\circ$  или ниже. Нижний предел количественного определения (LLOQ) этого анализа был определен как 10 копий на реакцию.

Аликвоту инокулята инфицирующего вируса подвергают обратному титрованию с помощью стандартного анализа бляшек на клетках Vero для подтверждения фактически доставленной дозы. Десятикратные серийные разведения инокулята для контрольного заражения используют для инфицирования слившихся монослоев клеток Vero в 6-луночных планшетах, которые высевали накануне. Планшеты инкубируют при  $37^\circ$  и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 1 ч перед добавлением верхнего слоя среды, содержащей 0,5% агарозы. Планшеты инкубируют в течение 3 дней до образования выраженных бляшек, после чего их фиксируют, окрашивают кристаллическим фиолетовым и подсчитывают.

#### Результаты.

Макак подвергали мониторингу два раза в день на предмет заболеваемости и смертности протяжении всего исследования. Все животные дожили до установленного срока. Массу тела и температуру у всех животных измеряли в моменты времени, указанные в табл. 5. В ходе исследования не наблюдали существенного снижения массы тела. У всех животных температура тела поддерживалась в нормальном диапазоне на протяжении всего исследования. Клинические наблюдения заключались только в умеренном покраснении в месте заражения у нескольких животных.

Вирусные нагрузки измеряли с использованием метода RT-qPCR (количественной полимеразной цепной реакции реального времени) для обнаружения геномов ZIKV в образцах сыворотки, мочи и слюны, собранных в моменты времени, указанные в табл. 5. Вирусная нагрузка в сыворотке представлена на фиг. 29.

Животные в группе 3, получавшие контроль изотипа, обладали выявляемой вирусной нагрузкой в сыворотке на следующий день после заражения. Вирусная нагрузка у трех из четырех животных достигла пика выше  $1 \times 10^5$  копий генома/мл (кг/мл) либо на 2-й, либо на 3-й день. Пик средней вирусной нагрузки в сыворотке достиг максимума в этой группе на 3-й день и составлял  $1,15 \times 10^5$  кг/мл. Вирусные нагрузки снизились ниже LLOQ анализа (860 кг/мл) к 4-му дню у одного животного и к 5-му дню у остальных трех.

Животные в группе 2, получавшие 15 мг/кг FIT-1 на следующий день после заражения, имели среднюю вирусную нагрузку  $3,99 \times 10^3$  GC/мл до лечения. На 2-й день средняя вирусная нагрузка в сыворотке снизилась до 96,5 кг/мл. Хотя низкие уровни вирусной РНК спорадически фиксировали после 1-го дня, ни в одной из точек контроля после лечения не было обнаружено вирусных нагрузок у животных во 2-й группе на уровне или ниже LLOQ по данным анализа RT-qPCR.

Предварительная обработка 5 мг/кг FIT-1 снизила средние вирусные нагрузки в сыворотке в первый день более чем в 50 раз по сравнению с животными в группе 3. Ни в одной из временных точек контроля после заражения вирусные нагрузки не были обнаружены на уровне или выше LLOQ, а ко второму дню вирусная РНК не была обнаружена в сыворотке ни у одного из животных из группы 1.

Только спорадические, низкие уровни РНК ZIKV были обнаружены в моче или слюне каких-либо

животных. Ни в одной временной точке вирусные нагрузки не были обнаружены на уровне или выше LLOQ в моче или слюне какого-либо животного.

Аликвоту инокулята вируса, использовавшуюся для заражения, подвергали обратному титрованию стандартным методом подсчета бляшек на клетках Vero для подтверждения фактически введенной дозы. Метод бляшек показал титр  $1,7 \times 10^5$  бляшкообразующих единиц/мл (БОЕ/мл).

Заключение и выводы.

В этом исследовании оценивают профилактическую и терапевтическую эффективность FIT-1 на макаках IRM, зараженных ZIKV. На протяжении всего исследования смертности не было, и клинические наблюдения ограничивались умеренным покраснением в месте заражения у нескольких животных. Вирусная нагрузка, определенная методом RT-qPCR в сыворотке, собранной после заражения, является первичной конечной точкой исследования. Вирусная РНК четко обнаруживается в сыворотке всех животных, получавших контроль изотипа, с вирусными нагрузками, достигающими пика во 2 или 3 день и поддерживающимися на уровнях выше LLOQ, равных 860 GC/мл, до 4 или 5 дней. Средняя пиковая нагрузка составляет  $1,15 \times 10^5$  GC/мл на 3-й день. Напротив, профилактическое лечение 5 мг/кг FIT-1 эффективно снижает пиковые вирусные нагрузки и время до вирусного клиренса в IRM, зараженных ZIKV. Низкие уровни вирусной РНК обнаруживают у всех шести животных из этой группы в первый день, но ко второму дню вирусную РНК не обнаруживают ни у одного из животных. Ни в одной точке не обнаруживают РНК ZIKV выше LLOQ 860 GC/мл в сыворотке крови какого-либо животного из этой группы. Аналогично, терапевтическое лечение 15 мг/кг FIT-1 на следующий день после заражения уменьшает как пиковые вирусные нагрузки, так и время до выведения вируса из сыворотки по сравнению с животными, получавшими контроль изотипа. У макак в группе 2 средняя пиковая вирусная нагрузка составляет  $3,99 \times 10^3$  GC/мл в 1-й день, но после лечения в 1-й день средняя вирусная нагрузка в сыворотке этой группы снижается до 96,5 ГЦ/мл ко 2-му дню. В этой группе не было животных, у которых вирусные нагрузки превышают LLOQ 860 GC/мл на протяжении оставшегося периода наблюдения.

Таблица последовательностей и их номеров SEQ ID

ZKA190	SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
CDRH1	1	<b>GFTFSKYG</b>
CDRH2	2	<b>ISYEGSNK</b>
CDRH3	3	<b>AKSGTQYYDTTGYEYRGLEYFGY</b>
CDRL1	4	<b>QSVSSSY</b>
CDRL2	5	<b>DAS</b>
CDRL2 long	6	<b>LIYDASSRA</b>
CDRL3	7	<b>QQYGRSRWT</b>
VH	8	<b>QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGTQYYDTTGYEYRGLEYFGYWGQGTLLVTVSS</b>
VL	9	<b>EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKRGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSDTFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGRSRWTFGQGTQVEIK</b>
ZKA190	SEQ ID NO	Последовательности нуклеиновых кислот
CDRH1	10	<b>ggattcaccttcagtaaatatggc</b>
CDRH2	11	<b>atatcatatgaggggaagtaataaa</b>
CDRH3	12	<b>gcgaaatcggggaccacaataactatgatactactggttatgagataggggtttggaatactttggctac</b>
CDRL1	13	<b>cagagtgttagtagcagttac</b>
CDRL2	14	<b>gatgcatcc</b>
CDRL2 long	15	<b>ctcatctatgatgcatccagcagggcc</b>
CDRL3	16	<b>cagcagtatggttaggtcaaggtggaca</b>
VH	17	<b>caggtgcagctggtggagctctggggaggcgtggtccagcctgggaggtcctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaaatatggcatgcaactgggtccgcccaggtccaggcaagggctggagtgggtggcagttatatcatatgaggggaagtaataaattatgcagactccgtgaaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaaacagcctgagagctgaggacacggcagtgatattactgtgcgaaatcggggaccacaatactatgatactactggttatgagataggggtttggaatactttggctactggggccagggaacctggtcaaccgtctcctcag</b>
VL	18	<b>gaaattggttgacgcagctctccaggcaacctgtctttgtctccagggaaagagccacctctcctgcagggccagtcagagtgttagtagcagttacttagcctggtaaccagcagaacagctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccagcagggccaactggcatccagacaggttcagtgccaagtgggtctgggacagacttcaactctaccatcagcagactggagcctgagatttgcagtgatattactgtcagcagtatggttaggtcaaggtggacattcggccaagggaccaaggtggaatcaaac</b>

ZKA185	SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
CDRH1	19	<b>GYSFTSYW</b>
CDRH2	20	<b>FDFSDSQT</b>
CDRH3	21	<b>ARRYCSSSSCYVDN</b>
CDRL1	22	<b>ALPNKF</b>
CDRL2	23	<b>EDN</b>
CDRL2 long	24	VIYEDNKRKRP
CDRL3	25	<b>YSTDSSSNPLGV</b>
VH	26	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSG <b>GYSFTSYW</b> ITWVVRQMPGKGLEWMAK <b>FDFSDSQT</b> NYSPSFQGHVTISVDKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYC <b>ARRYCSSSSCYVDN</b> WGQGLVITIFS
VL	27	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDA <b>ALPNKF</b> AYWYRQKSGQAPVLVIY <b>EDNKR</b> PSGIPERFSGSSSGTMTLTI SGAQVEADYHCY <b>YSTDSSSNPLGV</b> FGGGTKLTVL
ZKA185	SEQ ID NO.	Последовательности нуклеиновых кислот
CDRH1	28	<b>ggata tagt tttaccagttactgg</b>
CDRH2	29	<b>tttgatcctagtgactctcaaac</b>
CDRH3	30	<b>gcgagaagata ttgtagtagtagt tttatgtggacaat</b>
CDRL1	31	<b>gcat tggcaaaataaatt</b>
CDRL2	32	<b>gaggacaac</b>
CDRL2 long	33	gtcatctat <b>gaggacaac</b> aaacgaccc
CDRL3	34	<b>tactcaacagacagcagttctaatccctgggagta</b>
VH	35	Gaagtgcagctggtgcagtcggagcagaggtgaaaaagc Ccggggagtctctgaggatctcctgtaagggttct <b>ggata</b> <b>Tagt tttaccagttactgg</b> atcaactgggtgcgccagatg Cccgggaaaggcctggagtgatggcgaag <b>tttgatccta</b> <b>Gtgactctcaaac</b> caactacagccctcctccaaggcca Cgtcaccatctcagttgacaagtccatcagcactgcctac Ttgagtgaggcagcctgaaggcctcggaacaccccatgt attactgt <b>gcgagaagata ttgtagtagtagt tttat</b> <b>gtggacaat</b> ttggggccagggaacccctggtcacctcttc tcag
VL	36	Tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtgctc Ccaggacaaacggccaggatcacctgctctggagat <b>gca</b> <b>Ttgcaaaataaatt</b> tgctattggtaccggcagaagtca Ggccaggccctgttctggtcatctat <b>gaggacaac</b> aaa Cgaccctccggatccctgagagatctctggtccagc Tcagggacaatggccaacttgactatcagtggggccag Gtgaggatgaagctgactaacactgt <b>tactcaacagac</b> <b>Agcagttctaatccctgggagta</b> ttcggcgaggggacc aagctgacgctcctag
ZKA230	SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
CDRH1	37	<b>GGISSDY</b>
CDRH2	38	<b>IYYSGST</b>
CDRH3	39	<b>ARRRKYDSLWGSFAFDI</b>
CDRL1	40	<b>SSNIGGNY</b>
CDRL2	41	<b>IND</b>
CDRL2 long	42	LICINDHRP
CDRL3	43	<b>ATWDDSLGGLV</b>
VH	44	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSG <b>GGISSDY</b> WSWIRQPPGKG LEWIGYI <b>YYSGST</b> NYNPSLKSRTISVDTSKNHFSLKLNSVTAA DTAVVY <b>CARRRKYDSLWGSFAFDI</b> WGQGMVTVSS
VL	45	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS <b>SSNIGGNY</b> VYVYQQLPGTA PKLLICINDHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLQSEADY C <b>ATWDDSLGGLV</b> FGGGTKLTVL
ZKA230	SEQ ID NO	Последовательности нуклеиновых кислот
CDRH1	46	<b>ggtggctccatcagtagtgactac</b>
CDRH2	47	<b>atctattacagtgaggacacc</b>
CDRH3	48	<b>gcgaggaggaggaagtagattccctttggggagttttgctttgat</b> <b>ac</b>
CDRL1	49	<b>agctccaacatcgaggtaattat</b>

CDRL2	50	<b>attaatgat</b>
CDRL2 long	51	ctcatctgt <b>attaatgat</b> caccggccc
CDRL3	52	<b>gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta</b>
VH	53	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggcctggggaagccttcggagac cctgtccctcacctgcgcagctctct <b>ggggctccatcagtagtgactact</b> ggagctggatccggcagccccagggaagggaactggagtgattgggtat <b>atctattacagtgaggagcacc</b> aactacaacccctccctcaagagtcgagt caccatcagtagacacgtccaagaaccactctccctgaagctgaact ctgtgaccgctgcggacacggcctgtattactgt <b>gcgaggaggaggaag</b> <b>atgatccctttggggagttttgcttttgata</b> tcggggccaagggaac aatggtcaccgtctcttcag
VL	54	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagag ggtcaccatctcttgttctggaagc <b>agctccaacatcggaggtaatta</b> tg tatactggtaaccagcagctcccaggaaaggcccccaactcctcatctgt <b>attaatgat</b> caccggccctcaggggctccctgaccgatctctggctccaa gtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccagtcggagtg aggctgattactgt <b>gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta</b> ttcggcggagggaaccaagctgaccgtcctag
ZKA78	SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности
CDRH1	55	<b>GFTFSNYA</b>
CDRH2	56	<b>IGRNGDSI</b>
CDRH3	57	<b>VKDLAIPESYRIEADY</b>
CDRL1	58	<b>QSVLYRSNNKNY</b>
CDRL2	59	<b>WAS</b>
CDRL2 long	60	<b>LIYWASTRE</b>
CDRL3	61	<b>QQYSSPRT</b>
VH	62	EVQLAESGGGLVQPGGSLTFLSCSGS <b>GFTFSNYA</b> MVWARQAPKGLYVSG <b>IGRNGDSI</b> YYTDSVKGRFTISRDNKSMVYLQMSLRTEDTAVYYC <b>VKDL</b> <b>AIPESYRIEADY</b> WQGQTLVIVSA
VL	63	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSS <b>QSVLYRSNNKNY</b> LSWYQQKPGQPP KLLIY <b>WAST</b> RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITISPLQAEDVAVYYC <b>QQYSS</b> <b>PRT</b> FQGQTKVEIK
ZKA78	SEQ ID NO	Последовательности нуклеиновых кислот
CDRH1	64	<b>ggcttcacttttagtaactatgca</b>
CDRH2	65	<b>atogggcgcaacggggactctatc</b>
CDRH3	66	<b>gtgaagaatctggccatccccagctcctacagaattgaagctgattat</b>
CDRL1	67	<b>cagtcogtgcgtgaccgctctaaacaagaattac</b>
CDRL2	68	<b>tgggcttca</b>
CDRL2 long	69	ctgatctat <b>tgggcttca</b> acccgggaa
CDRL3	70	<b>cagcagtaactattctagtcctcgaact</b>
VH	71	gaggtgcagctggcagaatcaggcggggactgggtccagcctggcggca gcctgacactgtcttgcaagtgatc <b>aggcttcacttttagtaactatgc</b> <b>aatgggtgtgggcaaggcaggtcctgggaagggaactggagtagtctct</b> <b>ggcatcgggcgcaacggggactctat</b> ctactatactgatagtgtgaagg gccggttaccatcagcagagacaatagcaaatccatgggtgactgca gatgagctccctgcgaacggaagacacagcagtgtaactatt <b>gcgtgaaa</b> <b>gatctggcca</b> tccccagctcctacagaattgaagctgattatggggac agggcacccctggctcatcgtgagcgccg
VL	72	gacatcgtgatgacacagctctccagatagtcggcagtcagctctggggg agagggccactattaactgcaagagctcc <b>agtcctgtgctgtaacgctc</b> <b>taacaacaagaattac</b> ctgtcttggtatcagcagaagccccgacagccc cctaaaactgctgatctat <b>tgggcttca</b> acccgggaaagcggcgtcccag acagattctcaggcagcgggtccggaacagactcaccctgacaattag ccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactattgt <b>cagcagtaactat</b> <b>ctagtcctcgaact</b> ttcggccaggggaccaagtggaatcaaac

ZKA64	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	73	<b>GYTFTGYH</b>
CDRH2	74	<b>INPNSGGT</b>
CDRH3	75	<b>ARMSSSIWGFDPH</b>
CDRL1	76	<b>QSVLIN</b>
CDRL2	77	<b>GAS</b>
CDRL2 long	78	LIYGASSRA
CDRL3	79	<b>QQYNDWPPIT</b>
VH	80	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKAS <b>GYTFTGYH</b> LDWVRQARGQGLEWMGR <b>INPNSGGT</b> NYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMQLSRLRSDDSAVYYC <b>ARMSSSIWGFDPH</b> WGQGLTIVTVSS
VL	81	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS <b>QSVLIN</b> LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGI PARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC <b>QQYNDWPPIT</b> FGQGTREIK
ZKA64	SEQ ID NO	Последовательность нуклеиновой кислоты
CDRH1	82	<b>ggctacaccttcacagggtatcac</b>
CDRH2	83	<b>attaaccctaattctggcgggacc</b>
CDRH3	84	<b>gctcggatgagctcctctatttggggttcgatcat</b>
CDRL1	85	<b>cagtctgtgctgattaac</b>
CDRL2	86	<b>ggagcatcc</b>
CDRL2 long	87	ctgatctat <b>ggagcatcc</b> ccagggct
CDRL3	88	<b>cagcagtaacaatgattggccccctataca</b>
VH	89	caggtgcagctggtccagagcggagcagaggtgaagaaccggcgccctc agtgaaggtcagctgcaaagctcc <b>ggctacaccttcacagggtatcac</b> atcgactgggtgagcaggaagaggacaggactggaatggatgggacgg <b>attaaccctaattctggcgggacc</b> aactacgccagaagtttcaggggcgg agtgactatgaccagagacaccagcatctccacagcttatatgcagctgt cccggctgagatctgacgatagtgccgtctactattgt <b>gctcggatgagc</b> <b>tctctatttggggttcgatcat</b> tggggcagggaaactggtgactgt cagttcag
VL	90	gagatcgtgatgactcagtcctccagccaccctgtcagtcagccaggaga acgggcaaccctgtcttgacagcctcc <b>cagctctgtgctgattaac</b> ctgg ctgtgtaccagcagaagccaggccaggcaaccgactgctgatctat <b>gga gcatcc</b> ccagggtaccggcattcctgcacgcttcagtgatcaggaag cggaaacagagttaccctgacaatctctagtctgcagtcogaagacttcg ctgtctactattgt <b>cagcagtaacaatgattggccccctataca</b> attggc caggggactagactggagatcaagc
Константная область	SEQ ID NO	Последовательности
IgG1 CH1-CH2-CH3 aa	91	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTSLGTQTYICNVNHPKPSNT KVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYTK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNYTKQK SLSLSEPGK
IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA aa	92	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTSLGTQTYICNVNHPKPSNT KVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPE <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDITLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYTK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNYTKQK SLSLSEPGK
IgG CK aa	93	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
IgG CL aa	94	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWKSRRSYSQVTHE GSTVEKTVAPTECS
IgG1 CH1-CH2-CH3 nucl	95	gcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcacccctctcca agagcacctctgggggcacacggccctgggctgctcctggctcaagga ctactccccgaacctgtgacggctctcgtggaactcagggcctctg accagcggcgtgcacacctccccggctgtctcactcagtcctcaggac tctactccctcagcagcgtggtgacgctgcccctccagcagcttggg caccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaacac aaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaaactca caatgcccacogtgcacagcactgaaactcctgggggacgctcagtc ctctcttcccccaaaaaccccaaggacacctcatgatctccggg acccctgaggtcaactgctggtggtggacgtgagccacgaAgaCct gtaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataa tgccaagacaaaagccggggaggagcagtaacaacagcagctaccgt gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaaccaggactggctgaaatggca aggagtaacagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccat cgagaaaaacatctccaaagccaaagggcagccccgagaaaccaag gtgtacaccctgccccatccccgggagagatgaccaagaaccagg tcagctgacactgcctggctcaaaggtctctatcccaggaacatcgc

		<p>cgTggagTgggagagcaatgggCagccggagaaCaactacaagacc          acgcctcccgTgctggactccgacggctccttcttccctatagca          agctcacccgTggacaagagcagTggcagcagggaaagcttctc          atgctccgTgatgcatgaggctctgcaacaacctacaacgcagaag          agcctctccctgtccccgggtaaa</p>
IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA nucl	96	<p>gcgTcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctcca          agagcacctctgggggcacagcggccctgggTgcctggTcaagga          ctactccccgaacctgtgacggTctcgTggaaactcagggccctg          accagcggcgtgcaacacctccccggctgtcctacagTcctcaggac          tctaactccctcagcagcgtggTgacggTgcctccagcagctTggg          caccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc          aaggtggacaagagagTtgagcccaaatctTgtgacaaaactcaca          catgccccacgtgccccagcacctgaaGCCGCGgggggacccgTcagT          ctctcctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccgg          accctgaggtcacatgctgTggTggTggacgtgagccacgaagacc          ctgaggtcaagTtcaactggTcagTggacggcgtggagTgcataa          TgccaagacaaaagccgTgggagagcagTacaacagcagTaccgT          TggTcagcgtcctcaccgtcctgcaaccaggactggctgaatggca          aggagTacaagTgcaaggtctccaaCaagccctcccagccccat          cgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccggagaaaccaag          TgtTacaacctgccccatccccgggagagatgaccaagaaccagg          TcagcctgacctgctggTcaaaggcttctaTccccagcagacatcgc          cgtggagTgggagagcaatgggCagccggagaaCaactacaagacc          acgcctcccgTgctggactccgacggctccttcttccctatagca          agctcacccgTggacaagagcagTggcagcagggaaagctcttctc          atgctccgTgatgcatgaggctctgcaacaacctacaacgcagaag          agcctctccctgtccccgggtaaa</p>
IgG CK nucl	97	<p>cgTacGgTggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg          agcagTtgaatctggaaactgcctctgtTgtgTgcctgctgaataa          ctctatccccagagagggcaaaagTacagTggaagTggataacgcc          ctccaatcgggtactccagagagTgtcacagagcagggacagca          aggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaac          agactacgagaaacaCaagTctaCgctgCgaagTcacccatcag          ggctgagctcgcctgTcaaaaagagcttcaaacaggggagagTgt          ggtcagcccaaggtgccccctcggtcactctgttccccgccccct          ctgaggagcttcaagccaaCaagggccacactggTgtgtctcataag          TgacttctacccgggagccgtgacagTggctTgaaaagcagatagc          agccccgtcaagcgggagTggagaccaccaacccctccaaCaaaa          gcaacaacaagTacgccccagcagctatctgagcctgacgcctga          gcagTggaagTcccacagaagctacagctgcccaggtcacgcagTgaa          gggagcacccgTggagaagacagTggccccctacagaatgttca</p>
IgG CL nucl	98	<p>ggTcagcccaaggtgccccctcggtcactctgttccccgccccct          ctgaggagcttcaagccaaCaagggccacactggTgtgtctcataag          TgacttctacccgggagccgtgacagTggctTgaaaagcagatagc          agccccgtcaagcgggagTggagaccaccaacccctccaaCaaaa          gcaacaacaagTacgccccagcagctatctgagcctgacgcctga          gcagTggaagTcccacagaagctacagctgcccaggtcacgcagTgaa          gggagcacccgTggagaagacagTggccccctacagaatgttca</p>
ZKA3	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	99	<b>GFIFSNYA</b>
CDRH2	100	<b>IGGKGDSI</b>
CDRH3	101	<b>VKDLAVLES DRLEVDQ</b>
VH	102	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCSGS <b>GFIFSNY</b> AMVWARQAPGKGLVVS <b>IGGKGDSI</b> YHIDSVKGRFTISRDNKRTVYLVQMSRLRTEDTAVYYC <b>VK</b> <b>DLAVLES DRLEVDQ</b> WGQGLTVIVSA
ZKA4	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	103	<b>GFTFSSYV</b>
CDRH2	104	<b>TSYDGSNK</b>
CDRH3	105	<b>ARGVPYWSGESYS GAY FDF</b>
VH	106	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <b>GFTFSSYV</b> MHWVRQAPGKLEWVT <b>VTSYDGSNK</b> YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLVQMSLRGEDTAIYYC <b>AR</b> <b>GPVPYWSGESYS GAY FDF</b> WGQGLTVIVSS

ZKA5	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	107	<b>GFTFSNY</b>
CDRH2	108	<b>MSSSETIK</b>
CDRH3	109	<b>ARSGIETVAGSIDYYGMDV</b>
VH	110	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAGS <b>GFTFSNY</b> MTWIRQAPGKGLELVS YMS <b>SSETIK</b> YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDTARYY <b>CAR</b> <b>S</b> GIETVAGSIDYYGMDVWGHGTPVTVSS
ZKA6	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	111	<b>DFTVSNYA</b>
CDRH2	112	<b>VSYDGSNK</b>
CDRH3	113	<b>ATGVTMFQGAQTNAEYLHY</b>
VH	114	QVHLVESGGGVVQPGRSRLRSCAS <b>DFTVSNYA</b> MHWVRQAPGKGLEWVA V <b>VS</b> YDGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYY <b>CAT</b> <b>G</b> VTMFQGAQTNAEYLHYWGQGLVTVSS
ZKA7	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	115	<b>GFTFSRYG</b>
CDRH2	116	<b>VSGDGSST</b>
CDRH3	117	<b>VKDFWSGDQSLSEDF</b>
VH	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS <b>GFTFSRYG</b> MVWARQAPGKGLEYS G <b>V</b> S <b>G</b> DGSSTYYANSVKGRFTISRDNKNTLYLHMSRLRDEDTAMYY <b>CVK</b> <b>D</b> FWSGDQSLSEDFWGGALVTVSS
ZKA8	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	119	<b>GFTFSAHA</b>
CDRH2	120	<b>ISRNEYDT</b>
CDRH3	121	<b>VKDFGTSPQTD</b>
VH	122	DERLVESGGGLVQPGGSLRLVCSAS <b>GFTFSAHA</b> MHWVRQFPKGLEYVS T <b>I</b> SRNEYDTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMRRLRPEDTALYY <b>CVK</b> <b>D</b> FGTSPQTDWGGTLVAVSS
ZKA76	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	123	<b>GFTFSTYF</b>
CDRH2	124	<b>ISSTGSYK</b>
CDRH3	125	<b>ARPFHSEYTYGLDAFDI</b>
VH	126	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <b>GFTFSTYF</b> MHWVRQAPGKGLEWVA S <b>I</b> S <b>T</b> G <b>S</b> YK <b>F</b> YADSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNSLRAEDTAVFY <b>CAR</b> <b>P</b> FHSEYTYGLDAFDI <b>W</b> GQGTMLTVSS
ZKA117	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	127	<b>GGSIIRRTNSY</b>
CDRH2	128	<b>ISYSGST</b>
CDRH3	129	<b>ARLNDGSTVTTSSYFDY</b>
VH	130	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG <b>GGSIIRRTNSY</b> WGWIQTGKGLQW I <b>G</b> S <b>I</b> S <b>S</b> G <b>S</b> T <b>F</b> YNPSLKSRTISLDTSKDHFSLELSSVTAADTAIYY <b>CA</b> <b>R</b> LNDGSTVTTSSYFDYWGQGLVTVSS
ZKB27	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	131	<b>GYSFTSSW</b>
CDRH2	132	<b>IDPSDSYT</b>
CDRH3	133	<b>ARHDYSVSENGMDV</b>
VH	134	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKAS <b>GYSFTSSW</b> INWVRQMPGKLEWVG R <b>I</b> D <b>P</b> S <b>D</b> S <b>Y</b> T <b>T</b> YNPSFQGHVTISVDKSI <b>G</b> TAYLQWNSLRASDTAMYY <b>CAR</b> <b>H</b> D <b>Y</b> S <b>V</b> S <b>E</b> N <b>G</b> M <b>D</b> V <b>W</b> GQGT <b>V</b> T <b>V</b> S <b>S</b>
ZKB29	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность

CDRH1	135	<b>GFTFSSYT</b>
CDRH2	136	<b>ISYDGSHK</b>
CDRH3	137	<b>ARRSYSISCFDY</b>
VH	138	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <b>GFTFSSYTMHWRQAPGKGLEWVA</b> <b>VISYDGSHK</b> FYADSVKGRFTISRDNKDTLYLQMNSLRAEDTALYY <b>CAR</b> <b>RSYSISCFDY</b> WGQGLTIVSS
ZKB34	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	139	<b>GFTFSSRG</b>
CDRH2	140	<b>VSYDGSNK</b>
CDRH3	141	<b>AKDLTMVRGVHYYYYVMDV</b>
VH	142	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <b>GFTFSSRSGMHWRQAPGKGLEWVA</b> <b>VVSYDGSNK</b> YYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYY <b>CAK</b> <b>DLTMVRGVHYYYYVMDV</b> WGQGLTIVTSS
ZKB39	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	143	<b>GYTFDDYY</b>
CDRH2	144	<b>INPHRGGT</b>
CDRH3	145	<b>VRDQYCDGGNCYGIHQPHYGMDV</b>
VH	146	QVQLVQSGAEVKKPGASLVKSCKAS <b>GYTFDDYY</b> IHWVRQAPGQGLEWLG <b>RINPHRGGT</b> NYAQKFQGRVIMTLDMSISTTYMELRRITSDDAAVYY <b>CVR</b> <b>DQYCDGGNCYGIHQPHYGMDV</b> WGQGLTIVTSS
ZKB46	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	147	<b>GYSFTSYW</b>
CDRH2	148	<b>IDPDSYIT</b>
CDRH3	149	<b>ARREYSSSSGQEDWDFP</b>
VH	150	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSG <b>YYSFTSYW</b> ISWVRQMPGKGLEWVG <b>RIDPDSYIT</b> NYSPSFQGHVITISADKSIATAYLQWSSLKASDTAMYY <b>CAR</b> <b>REYSSSSGQEDWDFP</b> WGQGLTIVTSS
ZKB53	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	151	<b>GFTFSSYA</b>
CDRH2	152	<b>ISYDGSNR</b>
CDRH3	153	<b>ARHVEQLPSSGYFQH</b>
VH	154	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <b>GFTFSSYAMHWRQTPGKGLEWVT</b> <b>VISYDGSNRY</b> YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDVAVYY <b>CAR</b> <b>HVEQLPSSGYFQH</b> WGQGLTIVTSS
ZKC26	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	155	<b>GFI FSDFY</b>
CDRH2	156	<b>IGHDGSYI</b>
CDRH3	157	<b>ARAHGGFRH</b>
VH	158	QVQVVEGGGLVKPGGSLRLSCAAS <b>GFI FSDFY</b> MSWVRQAPGKGLEWVA <b>YIGHDGSYI</b> LYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYY <b>CAR</b> <b>AHGGFRH</b> WGQGLTIVAVSP
ZKD5	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	159	<b>GFTFTSYG</b>
CDRH2	160	<b>ISYDGSNK</b>
CDRH3	161	<b>ARDRDHYDLWNAITFDY</b>
VH	162	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <b>GFTFTSYGMHWRQTPGKGLDWVA</b> <b>VISYDGSNK</b> YYADSVKGRFTISRDNKDTLYLQMNSLRAADTALYY <b>CAR</b> <b>DRDHYDLWNAITFDY</b> WGQGLTIVTSS
ZKD7	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	163	<b>GFTFSSYA</b>

CDRH2	164	<b>ISYDVSDK</b>
CDRH3	165	<b>AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH</b>
VH	166	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAAS <b>GFTFSNYA</b> MHWVRQAPGKGLEWVA VISYDVSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLR AEDTAAYYCAG GPLGVVVIKPSNAEHFHHWGQGLTVTVSS
ZKD8	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	167	<b>GFTFINYA</b>
CDRH2	168	<b>ISYDGSNK</b>
CDRH3	169	<b>ATDADAYGDSGANFHY</b>
VH	170	EVQLVESGGGVVQPGKSLRRLSCAAS <b>GFTFINYA</b> IHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKFYTD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRADDTAVYYC <b>AT</b> DADAYGDSGANFHYWGQGLTVTVSS
ZKD15	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	171	<b>DASISSGGFS</b>
CDRH2	172	<b>IYSSGDT</b>
CDRH3	173	<b>ARAHTPTSKFYYYAMDV</b>
VH	174	QLQLQESGSGLVKPSQTL SLTCTVSD <b>SASISSGGFS</b> WSWIRQPLGKGLEW LGYIYSSGDTFYNP SLQGRVTMSVDIFRSQFSLKLT SVTAADTAMYYC <b>CA</b> RAHTPTSKFYYYAMDVWGQGLTVTVSS
ZKD16	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	175	<b>GFTFSDHF</b>
CDRH2	176	<b>SRNKPN SYTT</b>
CDRH3	177	<b>AKVGGCYGGDCHVENDY</b>
VH	178	EVQLVESGGDLVQPGGSLRRLSCVAS <b>GFTFSDHF</b> MWVRQAPGKGLEWVG RSRNKPN SYTTEYAASVKGRFISRDDSKKALYLQMN SLQTEDTAVYYC AKVGGCYGGDCHVENDYWGQGLTVTVSS
ZKD17	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	179	<b>GFIFSDYA</b>
CDRH2	180	<b>ISYDGSSR</b>
CDRH3	181	<b>ARGYC SSGTCFSTNAEYFHP</b>
VH	182	QVQMVESGGGVVQPGTSLRRLSCATS <b>GFIFSDYA</b> MHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSSRLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMHSLRAGDTAVYYC <b>CAR</b> GYC SSGTCFSTNAEYFHPWGQGLTATISS
ZKD20	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	183	<b>GFTFSDHF</b>
CDRH2	184	<b>SRNKPN SYTT</b>
CDRH3	185	<b>ARVGGCNGGDCHVENDY</b>
VH	186	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCVAS <b>GFTFSDHF</b> MWVRQAPGKGLEWVG RSRNKPN SYTTEYAASVKGRFISRDDSKNSLYLQMN SLQTEDTAVYYC ARVGGCNGGDCHVENDYWGQGLTVTVSS
ZKA134	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	187	<b>GGTFSAYA</b>
CDRH2	188	<b>IIPFFGTA</b>
CDRH3	189	<b>ARSDIVSTTRGYHHYGMDV</b>
VH	190	QVHLVQSGAEVKKPGSSVNVSCKAS <b>GGTFSAYA</b> ISWVRQAPGQGLEWVG GIIPFFGTAYYAQKFKGRVTADKSTSTVYMEMTSLRSED TAVYYC <b>CAR</b> SDIVSTTRGYHHYGMDVWGQGLTVTVSS
ZKA246	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	191	<b>GYTFSDY</b>

CDRH2	192	<b>INPYSGGT</b>
CDRH3	193	<b>ARGFTMISDREFDP</b>
VH	194	<b>QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCKASGYTFSDYYMHWVRQAPGGGLEWMGRINPYSGGTNYAQKFHGRVTVTRDTSISTVYMELRGLRSDDTAVYYCARGFTMISDREFDPWGQGTLVTVSS</b>
ZKA256	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	195	<b>GFTFSTYW</b>
CDRH2	196	<b>IKQDGSSEK</b>
CDRH3	197	<b>ARDPGYDDFWSGSYSGSFDI</b>
VH	198	<b>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYWMTWVVRQAPGKGLEWVANIKQDGSSEKYYVDSVKGRFTISRDNTKNSLYLQVNSLRAEDTAIYYCARDPGYDDFWSGSYSGSFDIWGQGTMTVTVSS</b>
ZKB42	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	199	<b>GFTFNNTYG</b>
CDRH2	200	<b>ISYDGNKK</b>
CDRH3	201	<b>VKYGERINGYSDPPDH</b>
VH	202	<b>QVQVVEGGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNTYGMHWVRQAPGKGLEWVALISYDGNKKYYADSVKGRFISRDNSKNTLYLQMNRLRSGDTAVYHCVKYGERINGYSDPPDHWGQGTMTVTVSS</b>
ZKB85	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	203	<b>GYTFTTYA</b>
CDRH2	204	<b>INTNTGNP</b>
CDRH3	205	<b>ARVIVPYAFDI</b>
VH	206	<b>QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCKASGYTFTTYAMNWVRQAPGGGPEWVGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVLSLDTSVSTAFLQISSLKAEDTAVYYCARVIVPYAFDIWGQGTMTVTVSS</b>
ZKB47	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	207	<b>GYTFTNY</b>
CDRH2	208	<b>INPSGGPT</b>
CDRH3	209	<b>ARDQYGGYARYGMDV</b>
VH	210	<b>QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCQASGYTFTNYMHWVRQAPGGGLEWMGIINPSGGPTSYAQKFQGRVTMTTDTSTSTVYMELSLRSIEDTAVYYCARDQYGGYARYGMDVWGQGTMTVTVSS</b>
ZKC6	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	211	<b>GYTFTGY</b>
CDRH2	212	<b>INPNSGGT</b>
CDRH3	213	<b>ARVSDWGFADFI</b>
VH	214	<b>QVQLVQSGTEVKKRPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGGGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSGLRSDDTAVYYCARVSDWGFADFIWGQGTMTVTVSS</b>
ZKA160	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	215	<b>GGSTITSYS</b>
CDRH2	216	<b>IFYSGST</b>
CDRH3	217	<b>ARDQTMPVWVGMDV</b>
VH	218	<b>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSTITSYSWSWIRQPPGKLEWIGYIFYSGSTDYNPSLKSRTISVDTSKQDFSLRLRSVTAADTAVYYCARDQTMPVWVGMDVWGQGTMTVTVSS</b>
ZKA172	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	219	<b>GYIFTRYW</b>
CDRH2	220	<b>IDPSDSYT</b>
CDRH3	221	<b>ARQETAREDGMAV</b>

VH	222	EVQLVQSGAEVKKPKGKSLRISCKGSGYIFTRYWISWVRQMPGKGLEWGMGRIDPSDSYTNYSPSFQGHVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQETAREDGMAVWGQGT TVTVSS
ZKA174	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	223	GGSMNSYYH
CDRH2	224	IYYSGST
CDRH3	225	ARNPVFNPLTLTHDAFDI
VH	226	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSMNSYYHWGWI RQPPGKLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARNPVFNPLTLTHDAFDI WGQGTMTVSS
ZKA189	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	227	GTFSSYA
CDRH2	228	ISGSGDNT
CDRH3	229	AKWPYDFWGSSESYFDP
VH	230	GVQLLESGGALVQPGKSLRLSCAASGTFSSYALTWVRQAPGKGLQWVSAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWPYDFWGSSESYFDPWGQGLVTVSS
ZKA195	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	231	GYNFPSYW
CDRH2	232	IDPSDSYT
CDRH3	233	ARADCRSTSCYLVE
VH	234	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKDSSGYNFPSYWIHWVRQMPGKLEWGMGTIDPSDSYTNYSPSFQGHVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARADCRSTSCYLVEGQGT LVTVSS
ZKA215	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	235	GYTFTSYW
CDRH2	236	IDPSDSHT
CDRH3	237	ARHALPNYFDS
VH	238	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWISWVRQMPGKLEWGMGRIDPSDSHTDYSPSFQGHVTISADKSI SAAAYLQWSSLKASDTAMYYCARHALPNYFDSWGQGLVTVSS
ZKA218	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	239	GPFSSYW
CDRH2	240	INSDGRNT
CDRH3	241	ARGGYDYSSGCFDY
VH	242	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSDGRNTNYADSVKGRFTISRDN AENTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARGGYDYSSGCFDYWGQGLVTVSS
ZKB75	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	243	GFTFSNYA
CDRH2	244	ISGTGGST
CDRH3	245	AKDSASRGGYCSGGVCYLNPQHHDY
VH	246	EVQVLESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKLEWVSTISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSASRGGYCSGGVCYLNPQHHDYWGQGLVTVSS
ZKB83	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	247	GYSFTNYW
CDRH2	248	IDPSDSYT
CDRH3	249	ARLRGSLYCSGGRCYSVPGETPNWFDP
VH	250	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTNYWITWVRQMPGKLEWGMGRIDPSDSYTNYSPSFQGHVTISADWSINTAYLQWSSLKASDTAKYYCARLRGSLYCSGGRCYSVPGETPNWFDPWGQGLVTVSS
ZKC3	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	251	GGSITSYY
CDRH2	252	IYYSGST
CDRH3	253	ARVGGAPYYYYGMDV
VH	254	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSITSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVGGAPYYYYGMDVWGQGT TVTVSS
ZKC18	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	255	GFTFGDYA
CDRH2	256	IRSKAYGGTT
CDRH3	257	SRDHTGTTYAFDI
VH	258	EVQLVESGGGLVQPGRS LRLSCTASGFTFGDYAMSWFRQAPGKLEWVGFIRSKAYGGTTEYAA SVKGRFTISRDDS KSIAYLQMN SLKTEDTAVYYCSRDHTGTTYAFDIWGQGTMTVSSQ
ZKD1	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
CDRH1	259	GTFSSYG
CDRH2	260	IWYDGSNK
CDRH3	261	ARRRRGYGDYVGYYYGMDV
VH	262	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRRRGYGDYVGYYYGMDVWGQGT TVTVSS

Обозначение	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
ZIKV EDIII генерическая	263	TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEVQYXGXDGPCCKXPXQMAVDXQTLTLPV GRLITANPVIETEXTENSKMMLELDPFPGDSYIVIGXGKKITHHWHR S
ZIKV H/PF/2013 EDIII	264	TAAFTFTKI PAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQTLTLPV GRLITANPVIETEXTENSKMMLELDPFPGDSYIVIGVGEKKITHHWHR S
ZIKV EDIII генерическая	265	X <sub>1</sub> GX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> YSLCTAAFTFTKX <sub>1</sub> PAEX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> HGTVTVEVX <sub>7</sub> QYX <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> DG PCKX <sub>10</sub> PX <sub>11</sub> QMAVDX <sub>12</sub> QTLTPVGRITANPVIETEX <sub>13</sub> TX <sub>14</sub> NSKM MLELDPFPGDSYIVIGX <sub>15</sub> GX <sub>16</sub> X <sub>17</sub> KITHHWHRSG где X1 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно K, A или E, X2 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно V, F или L, X3 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно S или F, X4 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно I или V, X5 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно T или V, X6 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно L или D, X7 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно V или G, X8 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно A или G, X9 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, за исключением R, предпочтительно T или A, X10 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно V или I, X11 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно A или V, X12 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно M или T, X13 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно S или G, X14 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно E или K, X15 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно V или I, X16 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно E, A, K или D, X17 может быть какой-либо (природной) аминокислотой, предпочтительно E, A или K, более предпочтительно K или A
Zika-E-F1 праймер	266	TGCAAACGGGTCGCAAACCTGGTTG
ZIKV-E-R1 праймер	267	CGTGCCAAGGTAATGGAATGTCGTG
ZIKV-Ef1530 праймер	268	AGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGA
ZIKV-E-R2769 праймер	269	TTACAGATCCCACAACGACCGTCAG
ZIKV-E-F2	270	ACTTGGTCATGATACTGCTGATTGC
ZIKV-E-R2	271	TCGGTTCACAATCAAGTCTAGGCT
ZIKV-E-f2058	272	GCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCA
ZIKV-E-r2248	273	AAGACTGCCATTCTCTTGGCACCTC

\*Последовательности, выделенные жирным шрифтом, представляют собой области CDR (нуклеотидные или аминокислотные (aa)), а подчеркнутые остатки являются мутантными остатками по сравнению с последовательностью "зародышевой линии".

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ХУМАБС БИОМЕД СА

<120> МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ЭПИТОПОВ ВИРУСА ЗИКА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> HB01P034W01

<160> 273

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKA190 CDRH1

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr Gly  
1 5

<210> 2  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA190 CDRH2

<400> 2

Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Asn Lys  
1 5

<210> 3  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA190 CDRH3

<400> 3

Ala Lys Ser Gly Thr Gln Tyr Tyr Asp Thr Thr Gly Tyr Glu Tyr Arg  
1 5 10 15

Gly Leu Glu Tyr Phe Gly Tyr  
20

<210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA190 CDRL1

<400> 4

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr  
1 5

<210> 5

<400> 5  
000

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA190 CDRL2 long

<400> 6

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala  
1 5

043940

<210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA190 CDRL3

<400> 7

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Arg Trp Thr  
 1 5

<210> 8  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA190 VH

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ser Gly Thr Gln Tyr Tyr Asp Thr Thr Gly Tyr Glu Tyr Arg  
 100 105 110

Gly Leu Glu Tyr Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 115 120 125

Ser Ser  
 130

<210> 9  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA190 VL

<400> 9

043940

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Arg  
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 10  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA190 CDRH1

<400> 10  
 ggattcacct tcagtaaata tggc 24

<210> 11  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA190 CDRH2

<400> 11  
 atatcatatg aggaagtaa taaa 24

<210> 12  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA190 CDRH3

<400> 12  
 gcgaaatcgg ggaccaata ctatgatact actggttatg agtatagggg tttggaatac 60

tttggtctac 69

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA190 CDRL1  
  
 <400> 13  
 cagagtgtta gtagcagtta c 21  
  
 <210> 14  
  
 <400> 14  
 000  
  
 <210> 15  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA190 CDRL2 long  
  
 <400> 15  
 ctcatctatg atgcatccag cagggcc 27  
  
 <210> 16  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA190 CDRL3  
  
 <400> 16  
 cagcagtatg gtaggtcaag gtggaca 27  
  
 <210> 17  
 <211> 391  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA190 VH  
  
 <400> 17  
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aaatatggca tgcaactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg agggaagtaa taaatattat 180  
 gcagactcgc tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggcagtgt attactgtgc gaaatcgggg 300  
 acccaatact atgatactac tggttatgag tataggggtt tggaaactt tggctactgg 360  
 ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca g 391  
  
 <210> 18  
 <211> 325  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA190 VL  
  
 <400> 18

043940

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcagttact tagcctggta ccagcagaaa 120  
 cgtggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatocca 180  
 gacagttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta ggtcaagggtg gacattcggc 300  
 caagggacca agtggaat caaac 325

<210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA185 CDRH1

<400> 19

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp  
 1 5

<210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA185 CDRH2

<400> 20

Phe Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA185 CDRH3

<400> 21

Ala Arg Arg Tyr Cys Ser Ser Ser Ser Cys Tyr Val Asp Asn  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA185 CDRL1

<400> 22

Ala Leu Pro Asn Lys Phe  
 1 5

<210> 23

<400> 23  
000

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA185 CDRL2 long

<400> 24

Val Ile Tyr Glu Asp Asn Lys Arg Pro  
1 5

<210> 25  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA185 CDRL3

<400> 25

Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Ser Asn Pro Leu Gly Val  
1 5 10

<210> 26  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA185 VH

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Ala Lys Phe Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Tyr Cys Ser Ser Ser Ser Cys Tyr Val Asp Asn Trp Gly  
100 105 110

043940

Gln Gly Thr Leu Val Thr Ile Phe Ser  
115 120

<210> 27  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA185 VL  
<400> 27

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Asn Lys Phe Ala  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Ser Asn Pro  
85 90 95

Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 28  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA185 CDRH1  
<400> 28  
ggatatagtt ttaccagtta ctgg

24

<210> 29  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA185 CDRH2  
<400> 29  
tttgatccta gtgactctca aacc

24

<210> 30  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA185 CDRH3  
  
 <400> 30  
 gcgagaagat attgtagtag tagtagttgt tatgtggaca at 42  
  
 <210> 31  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA185 CDRL1  
  
 <400> 31  
 gcattgccaa ataaattt 18  
  
 <210> 32  
  
 <400> 32  
 000  
  
 <210> 33  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA185 CDRL2 long  
  
 <400> 33  
 gtcacatctatg aggacaacaa acgaccc 27  
  
 <210> 34  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA185 CDRL3  
  
 <400> 34  
 tactcaacag acagcagttc taatcccctg ggagta 36  
  
 <210> 35  
 <211> 364  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA185 VH  
  
 <400> 35  
 gaagtgcagc tgggtgcagtc cggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaggatc 60  
 tcctgtaagg gttctggata tagttttacc agttactgga tcacctgggt gcgccagatg 120  
 cccgggaaag gcctggagtg gatggcgaag tttgatccta gtgactctca acccaactac 180  
 agcccgtcct tccaaggcca cgtcaccatc tcagttgaca agtccatcag cactgcctac 240  
 ttgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgcatgt attactgtgc gagaagatat 300  
 tgtagtagta gtagttgtta tgtggacaat tggggccagg gaaccctggt caccatcttc 360

tcag

364

<210> 36  
 <211> 328  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA185 VL

<400> 36  
 tcctatgagc tgacacagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60  
 acctgctctg gagatgcatt gccaaataaa tttgcttatt ggtaccggca gaagtcaggc 120  
 caggcccctg ttctggtcat ctatgaggac aacaaacgac cctccgggat cctgagaga 180  
 ttctctgggt ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag 240  
 gatgaagctg actaccactg ttactcaaca gacagcagtt ctaatcccct gggagtattc 300  
 ggcgaggagg ccaagctgac cgtcctag 328

<210> 37  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA230 CDRH1

<400> 37

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp Tyr  
 1 5

<210> 38  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA230 CDRH2

<400> 38

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 39  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA230 CDRH3

<400> 39

Ala Arg Arg Arg Lys Tyr Asp Ser Leu Trp Gly Ser Phe Ala Phe Asp  
 1 5 10 15

Ile

<210> 40  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA230 CDRL1

<400> 40

Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Tyr  
 1 5

<210> 41

<400> 41  
 000

<210> 42  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA230 CDRL2 long

<400> 42

Leu Ile Cys Ile Asn Asp His Arg Pro  
 1 5

<210> 43  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA230 CDRL3

<400> 43

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Gly Gly Leu Val  
 1 5 10

<210> 44  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA230 VH

<400> 44

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp  
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

043940

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Arg Arg Lys Tyr Asp Ser Leu Trp Gly Ser Phe Ala Phe Asp Ile  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 45  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA230 VL

<400> 45

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn  
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Cys Ile Asn Asp His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Gly Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 46  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA230 CDRH1

<400> 46

ggtggctcca tca gtagtga ctac

<210> 47  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA230 CDRH2  
  
 <400> 47  
 atctattaca gtgggagcac c 21

<210> 48  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA230 CDRH3  
  
 <400> 48  
 gcgaggagga ggaagtatga ttcctttgg gggagttttg cttttgatat c 51

<210> 49  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA230 CDRL1  
  
 <400> 49  
 agtccaaca tcggaggtaa ttat 24

<210> 50  
  
 <400> 50  
 000

<210> 51  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA230 CDRL2 long  
  
 <400> 51  
 ctcactgta ttaatgatca ccggccc 27

<210> 52  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA230 CDRL3  
  
 <400> 52  
 gcaacatggg atgacagcct ggtggcctt gta 33

<210> 53  
 <211> 370  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

043940

<220>  
<223> ZKA230 VH  
  
<400> 53  
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaggc ctggtgaagc ctcggagac cctgtccctc 60  
acctgcgcag tctctggtgg ctccatcagt agtgactact ggagctggat ccggcagccc 120  
ccaggaaggg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180  
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca cttctccctg 240  
aagctgaact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag gaggaggaag 300  
tatgattccc tttgggggag ttttgctttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc 360  
gtctcttcag 370

<210> 54  
<211> 331  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA230 VL  
  
<400> 54  
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggtaattatg tatactggta ccagcagctc 120  
ccaggaacgg ccccaaaact cctcatctgt attaatgatc accggccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagcctggg tggccttgta 300  
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g 331

<210> 55  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA78 CDRH1  
  
<400> 55  
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
1 5

<210> 56  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA78 CDRH2  
  
<400> 56  
Ile Gly Arg Asn Gly Asp Ser Ile  
1 5

<210> 57

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRH3

<400> 57

Val Lys Asp Leu Ala Ile Pro Glu Ser Tyr Arg Ile Glu Ala Asp Tyr  
 1                   5                   10                   15

<210> 58  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRL1

<400> 58

Gln Ser Val Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Lys Asn Tyr  
 1                   5                   10

<210> 59

<400> 59  
 000

<210> 60  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRL2 long

<400> 60

Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu  
 1                   5

<210> 61  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRL3

<400> 61

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Arg Thr  
 1                   5

<210> 62  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 VH

<400> 62

043940

Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ser Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

Ala Met Val Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Gly Arg Asn Gly Asp Ser Ile Tyr Tyr Thr Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Val Lys Asp Leu Ala Ile Pro Glu Ser Tyr Arg Ile Glu Ala Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ala  
115 120

<210> 63  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA78 VL

<400> 63

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Arg  
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Pro Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

## Lys

<210> 64  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRH1

<400> 64  
 ggcttcactt ttagtaacta tgca 24

<210> 65  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRH2

<400> 65  
 atcgggcgca acggggactc tatc 24

<210> 66  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRH3

<400> 66  
 gtgaaagatc tggccatccc cgagtcctac agaattgaag ctgattat 48

<210> 67  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRL1

<400> 67  
 cagtcctgctc tgtaccgctc taacaacaag aattac 36

<210> 68

<400> 68  
 000

<210> 69  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDRL2 long

<400> 69  
 ctgatctatt gggcttcaac ccgggaa 27

<210> 70

043940

<211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 CDR3

<400> 70  
 cagcagtact attctagtcc tcgaact 27

<210> 71  
 <211> 370  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 VH

<400> 71  
 gaggtgcagc tggcagaatc aggcggggga ctggtccagc ctggcggcag cctgacactg 60  
 tcttgcagtg gatcaggcct cacttttagt aactatgcaa tgggtgtgggc aaggcaggct 120  
 cctgggaagg gactggagta tgtctctggc atcggggcga acggggactc tatctactat 180  
 actgatagtg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca atagcaaatc catggtgtac 240  
 ctgcagatga gctccctgcg aaccgaagac acagcagtgt actattgctg gaaagatctg 300  
 gccatccccg agtcctacag aattgaagct gattattggg gacagggcac cctggtcatc 360  
 gtgagcgccg 370

<210> 72  
 <211> 340  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA78 VL

<400> 72  
 gacatcgtga tgacacagtc tccagatagt ctggcagtca gtctggggga gagggccact 60  
 attaactgca agagctocca gtccgtgctg taccgctcta acaacaagaa ttacctgtct 120  
 tggtatcagc agaagcccgg acagcccct aaactgctga tctattgggc ttcaaccocgg 180  
 gaaagcggcg tcccagacag attctcaggc agcgggtccg gaacagactt cacctgaca 240  
 attagcccc tgaggcaga ggacgtggct gtctactatt gtcagcagta ctattctagt 300  
 cctcgaactt tcggccaggg gaccaaggtg gaaatcaaac 340

<210> 73  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA64 CDRH1

<400> 73  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr His  
 1 5

<210> 74  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRH2

<400> 74

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
1 5

<210> 75  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRH3

<400> 75

Ala Arg Met Ser Ser Ser Ile Trp Gly Phe Asp His  
1 5 10

<210> 76  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRL1

<400> 76

Gln Ser Val Leu Ile Asn  
1 5

<210> 77

<400> 77  
000

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRL2 long

<400> 78

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala  
1 5

<210> 79  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRL3

043940

<400> 79

Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 80

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKA64 VH

<400> 80

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30

His Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Met Ser Ser Ser Ile Trp Gly Phe Asp His Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKA64 VL

<400> 81

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu Ile Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

043940

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Pro  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 82  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRH1

<400> 82  
ggctacacct tcacagggta tcac 24

<210> 83  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRH2

<400> 83  
attaacccta attctggcgg gacc 24

<210> 84  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRH3

<400> 84  
gctcggatga gctcctctat ttggggcttc gatcat 36

<210> 85  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA64 CDRL1

<400> 85  
cagtctgtgc tgattaac 18

<210> 86

<400> 86  
000

<210> 87

043940

<211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA64 CDRL2 long  
  
 <400> 87  
 ctgatctatg gagcatcctc cagggt 27  
  
 <210> 88  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA64 CDRL3  
  
 <400> 88  
 cagcagtaca atgattggcc ccctatcaca 30  
  
 <210> 89  
 <211> 358  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA64 VH  
  
 <400> 89  
 cagggtgcagc tgggccagag cggagcagag gtgaagaaac ccggcgctc agtgaaggtc 60  
 agctgcaaag cttccggcta caccttcaca gggatcaca tcgactgggt gaggcaggca 120  
 agaggacagg gactggaatg gatgggacgg attaacccta attctggcgg gaccaactac 180  
 gccagaagt ttcagggccg agtgactatg accagagaca ccagcatctc cacagcttat 240  
 atgcagctgt cccggctgag atctgacgat agtgccgtct actattgtgc tcggatgagc 300  
 tcctctatth ggggcttcga tcattggggg caggaacac tggtgactgt cagttcag 358  
  
 <210> 90  
 <211> 325  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> ZKA64 VL  
  
 <400> 90  
 gagatcgtga tgactcagtc tccagccacc ctgtcagtc gcccaggaga acgggcaacc 60  
 ctgtcttgca gagcctcca gtctgtgctg attaacctgg cttggtacca gcagaagcca 120  
 ggccaggcac cccgactgct gatctatgga gcaccccca gggctaccgg cattcctgca 180  
 cgcttcagtg gatcaggaag cggaacagag tttaccctga caatctctag tctgcagtcc 240  
 gaagacttcg ctgtctacta ttgtcagcag tacaatgatt ggccccctat cacatttggc 300  
 caggggacta gactggagat caagc 325  
  
 <210> 91  
 <211> 330  
 <212> PRT

## 043940

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IgG1 CH1-CH2-CH3 aa

&lt;400&gt; 91

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

043940

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 92  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA aa

<400> 92

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

043940

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 93  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> IgG CK aa

<400> 93

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

043940

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 94  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> IgG CL aa

<400> 94

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

<210> 95  
<211> 990  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> IgG1 CH1-CH2-CH3 nucl

<400> 95  
gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaacctgt gacggtctcg 120  
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgctc acagtctctca 180  
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccagacc 240  
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300

043940

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360  
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 720  
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960  
 cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990

<210> 96  
 <211> 990  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA nucl

<400> 96  
 gcgtcgacca agggccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaacctgt gacggtctcg 120  
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgcgggggga 360  
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 720  
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960  
 cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990

<210> 97

<211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> IgG CK nucl

<400> 97  
 cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60  
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120  
 tggaagtggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180  
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240  
 aacacaaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag 300  
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 98  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> IgG CL nucl

<400> 98  
 ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttccccg cctcctctga ggagcttcaa 60  
 gccacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120  
 gcttgaaaag cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180  
 caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgctga gcagtggaag 240  
 tccccagaaa gctacagctg ccaggtcacg catgaagggg gcaccgtgga gaagacagtg 300  
 gccctacag aatgttca 318

<210> 99  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA3 CDRH1

<400> 99

Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Ala  
 1 5

<210> 100  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA3 CDRH2

<400> 100

Ile Gly Gly Lys Gly Asp Ser Ile  
 1 5

043940

<210> 101  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA3 CDRH3

<400> 101

Val Lys Asp Leu Ala Val Leu Glu Ser Asp Arg Leu Glu Val Asp Gln  
1 5 10 15

<210> 102  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA3 VH

<400> 102

Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Gly Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

Ala Met Val Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Gly Gly Lys Gly Asp Ser Ile Tyr His Ile Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Arg Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Val Lys Asp Leu Ala Val Leu Glu Ser Asp Arg Leu Glu Val Asp Gln  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ala  
115 120

<210> 103  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA4 CDRH1

<400> 103

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val  
1 5

<210> 104  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA4 CDRH2

<400> 104

Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys  
 1 5

<210> 105  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA4 CDRH3

<400> 105

Ala Arg Gly Pro Val Pro Tyr Trp Ser Gly Glu Ser Tyr Ser Gly Ala  
 1 5 10 15

Tyr Phe Asp Phe  
 20

<210> 106  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA4 VH

<400> 106

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Thr Val Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Pro Val Pro Tyr Trp Ser Gly Glu Ser Tyr Ser Gly Ala  
 100 105 110

043940

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 107  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA5 CDRH1

<400> 107

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr  
1 5

<210> 108  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA5 CDRH2

<400> 108

Met Ser Ser Ser Glu Thr Ile Lys  
1 5

<210> 109  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA5 CDRH3

<400> 109

Ala Arg Ser Gly Ile Glu Thr Val Ala Gly Ser Ile Asp Tyr Tyr Gly  
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 110  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA5 VH

<400> 110

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val

043940

35 40 45  
Ser Tyr Met Ser Ser Ser Glu Thr Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Ser Gly Ile Glu Thr Val Ala Gly Ser Ile Asp Tyr Tyr Gly  
100 105 110  
Met Asp Val Trp Gly His Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 111  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA6 CDRH1

<400> 111

Asp Phe Thr Val Ser Asn Tyr Ala  
1 5

<210> 112  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA6 CDRH2

<400> 112

Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys  
1 5

<210> 113  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA6 CDRH3

<400> 113

Ala Thr Gly Val Thr Met Phe Gln Gly Ala Gln Thr Asn Ala Glu Tyr  
1 5 10 15

Leu His Tyr

<210> 114

## 043940

<211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA6 VH

<400> 114

Gln Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Asp Phe Thr Val Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Gly Val Thr Met Phe Gln Gly Ala Gln Thr Asn Ala Glu Tyr  
 100 105 110

Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Ile Ser Ser  
 115 120 125

<210> 115  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA7 CDRH1

<400> 115

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly  
 1 5

<210> 116  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA7 CDRH2

<400> 116

Val Ser Gly Asp Gly Ser Ser Thr  
 1 5

<210> 117

043940

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA7 CDRH3

<400> 117

Val Lys Asp Phe Trp Ser Gly Asp Gln Ser Leu Glu Ser Asp Phe  
 1 5 10 15

<210> 118  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA7 VH

<400> 118

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

Gly Met Val Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Leu  
 35 40 45

Ser Gly Val Ser Gly Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu His Met Ser Arg Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Val Lys Asp Phe Trp Ser Gly Asp Gln Ser Leu Glu Ser Asp Phe Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 119  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA8 CDRH1

<400> 119

Gly Phe Thr Phe Ser Ala His Ala  
 1 5

<210> 120

043940

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA8 CDRH2

<400> 120

Ile Ser Arg Asn Glu Asp Tyr Thr  
 1 5

<210> 121  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA8 CDRH3

<400> 121

Val Lys Asp Phe Gly Thr Ser Pro Gln Thr Asp Phe  
 1 5 10

<210> 122  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA8 VH

<400> 122

Asp Glu Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Val Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala His  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Arg Asn Glu Asp Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Arg Arg Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Val Lys Asp Phe Gly Thr Ser Pro Gln Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Ala Val Ser Ser  
 115

<210> 123

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA76 CDRH1

<400> 123

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Phe  
 1 5

<210> 124  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA76 CDRH2

<400> 124

Ile Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Lys  
 1 5

<210> 125  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA76 CDRH3

<400> 125

Ala Arg Pro Phe His Ser Glu Tyr Thr Tyr Gly Leu Asp Ala Phe Asp  
 1 5 10 15

Ile

<210> 126  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA76 VH

<400> 126

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

043940

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Ser Leu Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Pro Phe His Ser Glu Tyr Thr Tyr Gly Leu Asp Ala Phe Asp  
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 127  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA117 CDRH1

<400> 127

Gly Gly Ser Ile Arg Arg Thr Asn Ser Tyr  
1 5 10

<210> 128  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA117 CDRH2

<400> 128

Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr  
1 5

<210> 129  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA117 CDRH3

<400> 129

Ala Arg Leu Asn Asp Gly Ser Thr Val Thr Thr Ser Ser Tyr Phe Asp  
1 5 10 15

Tyr

<210> 130  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA117 VH

043940

<400> 130

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Arg Thr  
20 25 30

Asn Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Gln  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Phe Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asp His Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Leu Asn Asp Gly Ser Thr Val Thr Thr Ser Ser Tyr Phe  
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKB27 CDRH1

<400> 131

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser Trp  
1 5

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKB27 CDRH2

<400> 132

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr  
1 5

<210> 133

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKB27 CDRH3

## 043940

&lt;400&gt; 133

Ala Arg His Asp Tyr Ser Val Ser Glu Asn Gly Met Asp Val  
 1 5 10

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB27 VH

&lt;400&gt; 134

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser  
 20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe  
 50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Gly Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg His Asp Tyr Ser Val Ser Glu Asn Gly Met Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB29 CDRH1

&lt;400&gt; 135

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr  
 1 5

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB29 CDRH2

&lt;400&gt; 136

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys  
 1 5

&lt;210&gt; 137

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB29 CDRH3

&lt;400&gt; 137

Ala Arg Arg Ser Tyr Ser Ile Ser Cys Phe Asp Tyr  
 1 5 10

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB29 VH

&lt;400&gt; 138

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Arg Ser Tyr Ser Ile Ser Cys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB34 CDRH1

&lt;400&gt; 139

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser Gly  
 1 5

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB34 CDRH2

&lt;400&gt; 140

Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys  
 1 5

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB34 CDRH3

&lt;400&gt; 141

Ala Lys Asp Leu Thr Met Val Arg Gly Val His Tyr Tyr Tyr Tyr Val  
 1 5 10 15

Met Asp Val

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB34 VH

&lt;400&gt; 142

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

## 043940

85

90

95

Ala Lys Asp Leu Thr Met Val Arg Gly Val His Tyr Tyr Tyr Tyr Val  
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 143  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB39 CDRH1

<400> 143

Gly Tyr Thr Phe Asp Asp Tyr Tyr  
 1 5

<210> 144  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB39 CDRH2

<400> 144

Ile Asn Pro His Arg Gly Gly Thr  
 1 5

<210> 145  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB39 CDRH3

<400> 145

Val Arg Asp Gln Tyr Cys Asp Gly Gly Asn Cys Tyr Gly Ile His Gln  
 1 5 10 15

Pro His Tyr Gly Met Asp Val  
 20

<210> 146  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB39 VH

<400> 146

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

043940

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro His Arg Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Ile Met Thr Leu Asp Met Ser Ile Ser Thr Thr Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Arg Ile Thr Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Val Arg Asp Gln Tyr Cys Asp Gly Gly Asn Cys Tyr Gly Ile His Gln  
 100 105 110

Pro His Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 115 120 125

Ser Ser  
 130

<210> 147  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB46 CDRH1

<400> 147

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp  
 1 5

<210> 148  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB46 CDRH2

<400> 148

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr  
 1 5

<210> 149  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB46 CDRH3

<400> 149

043940

Ala Arg Arg Glu Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Gln Glu Asp Trp Phe Asp  
1 5 10 15

Pro

<210> 150  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKB46 VH

<400> 150

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Gln Glu Asp Trp Phe Asp  
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 151  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKB53 CDRH1

<400> 151

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
1 5

<210> 152  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB53 CDRH2

&lt;400&gt; 152

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Arg  
 1 5

&lt;210&gt; 153

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB53 CDRH3

&lt;400&gt; 153

Ala Arg His Val Glu Gln Leu Pro Ser Ser Gly Tyr Phe Gln His  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 154

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB53 VH

&lt;400&gt; 154

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Thr Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg His Val Glu Gln Leu Pro Ser Ser Gly Tyr Phe Gln His Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC26 CDRH1

&lt;400&gt; 155

Gly Phe Ile Phe Ser Asp Phe Tyr  
 1 5

&lt;210&gt; 156

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC26 CDRH2

&lt;400&gt; 156

Ile Gly His Asp Gly Ser Tyr Ile  
 1 5

&lt;210&gt; 157

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC26 CDRH3

&lt;400&gt; 157

Ala Arg Ala His Gly Gly Phe Arg His  
 1 5

&lt;210&gt; 158

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC26 VH

&lt;400&gt; 158

Gln Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asp Phe  
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Tyr Ile Gly His Asp Gly Ser Tyr Ile Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe  
 65 70 75 80

Leu Arg Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ala His Gly Gly Phe Arg His Trp Gly Gln Gly Thr Val Val  
 100 105 110

Ala Val Ser Pro  
 115

<210> 159  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD5 CDRH1

<400> 159

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Gly  
 1 5

<210> 160  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD5 CDRH2

<400> 160

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys  
 1 5

<210> 161  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD5 CDRH3

<400> 161

Ala Arg Asp Arg Asp His Tyr Asp Leu Trp Asn Ala Tyr Thr Phe Asp  
 1 5 10 15

Tyr

<210> 162  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD5 VH

<400> 162

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr

## 043940

20

25

30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp His Tyr Asp Leu Trp Asn Ala Tyr Thr Phe Asp  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 163  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD7 CDRH1

<400> 163

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
 1 5

<210> 164  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD7 CDRH2

<400> 164

Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asp Lys  
 1 5

<210> 165  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD7 CDRH3

<400> 165

Ala Gly Gly Pro Leu Gly Val Val Val Ile Lys Pro Ser Asn Ala Glu  
 1 5 10 15

His Phe His His

20

<210> 166  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD7 VH

<400> 166

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Pro Leu Gly Val Val Val Ile Lys Pro Ser Asn Ala Glu  
 100 105 110

His Phe His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 167  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD8 CDRH1

<400> 167

Gly Phe Thr Phe Ile Asn Tyr Ala  
 1 5

<210> 168  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD8 CDRH2

<400> 168

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

## 043940

1 5

<210> 169  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD8 CDRH3

<400> 169

Ala Thr Asp Ala Asp Ala Tyr Gly Asp Ser Gly Ala Asn Phe His Tyr  
 1 5 10 15

<210> 170  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD8 VH

<400> 170

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Lys  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Asn Tyr  
 20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Asp Ala Asp Ala Tyr Gly Asp Ser Gly Ala Asn Phe His Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 171  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD15 CDRH1

<400> 171

Asp Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ser

043940

1 5 10

<210> 172  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD15 CDRH2

<400> 172

Ile Tyr Ser Ser Gly Asp Thr  
1 5

<210> 173  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD15 CDRH3

<400> 173

Ala Arg Ala His Thr Pro Thr Ser Lys Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met  
1 5 10 15

Asp Val

<210> 174  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD15 VH

<400> 174

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Ala Ser Ile Ser Ser Gly  
20 25 30

Gly Phe Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Leu Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Gly Tyr Ile Tyr Ser Ser Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Val Asp Ile Phe Arg Ser Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Ala His Thr Pro Thr Ser Lys Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Ala

## 043940

100

105

110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 175  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD16 CDRH1

<400> 175

Gly Phe Thr Phe Ser Asp His Phe  
 1 5

<210> 176  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD16 CDRH2

<400> 176

Ser Arg Asn Lys Pro Asn Ser Tyr Thr Thr  
 1 5 10

<210> 177  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD16 CDRH3

<400> 177

Ala Lys Val Gly Gly Cys Tyr Gly Gly Asp Cys His Val Glu Asn Asp  
 1 5 10 15

Tyr

<210> 178  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD16 VH

<400> 178

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His  
 20 25 30

043940

Phe Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Arg Ser Arg Asn Lys Pro Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Lys Ala  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Val Gly Gly Cys Tyr Gly Gly Asp Cys His Val Glu  
100 105 110

Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 179  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD17 CDRH1

<400> 179

Gly Phe Ile Phe Ser Asp Tyr Ala  
1 5

<210> 180  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD17 CDRH2

<400> 180

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Arg  
1 5

<210> 181  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD17 CDRH3

<400> 181

Ala Arg Gly Tyr Cys Ser Ser Gly Thr Cys Phe Ser Thr Asn Ala Glu  
1 5 10 15

Tyr Phe His Pro  
20

043940

<210> 182  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD17 VH

<400> 182

Gln Val Gln Met Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Arg Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Cys Ser Ser Gly Thr Cys Phe Ser Thr Asn Ala Glu  
100 105 110

Tyr Phe His Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ala Thr Ile Ser Ser  
115 120 125

<210> 183  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD20 CDRH1

<400> 183

Gly Phe Thr Phe Ser Asp His Phe  
1 5

<210> 184  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKD20 CDRH2

<400> 184

Ser Arg Asn Lys Pro Asn Ser Tyr Thr Thr  
1 5 10

043940

<210> 185  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD20 CDRH3

<400> 185

Ala Arg Val Gly Gly Cys Asn Gly Gly Asp Cys His Val Glu Asn Asp  
 1 5 10 15

Tyr

<210> 186  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKD20 VH

<400> 186

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His  
 20 25 30

Phe Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ser Arg Asn Lys Pro Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Gly Gly Cys Asn Gly Gly Asp Cys His Val Glu  
 100 105 110

Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 187  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA134 CDRH1

<400> 187

Gly Gly Thr Phe Ser Ala Tyr Ala  
1 5

<210> 188  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA134 CDRH2

<400> 188

Ile Ile Pro Phe Phe Gly Thr Ala  
1 5

<210> 189  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA134 CDRH3

<400> 189

Ala Arg Ser Asp Ile Val Ser Thr Thr Arg Gly Tyr His His Tyr Gly  
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 190  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA134 VH

<400> 190

Gln Val His Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Asn Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ala Tyr  
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Phe Phe Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

## 043940

Ala Arg Ser Asp Ile Val Ser Thr Thr Arg Gly Tyr His His Tyr Gly  
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 191  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA246 CDRH1

<400> 191

Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr  
 1 5

<210> 192  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA246 CDRH2

<400> 192

Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Gly Thr  
 1 5

<210> 193  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA246 CDRH3

<400> 193

Ala Arg Gly Phe Thr Met Ile Ser Asp Arg Glu Phe Asp Pro  
 1 5 10

<210> 194  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA246 VH

<400> 194

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met



043940

<211> 127  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA256 VH

<400> 198

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
20 25 30

Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Gly Tyr Asp Asp Phe Trp Ser Gly Ser Tyr Ser Gly  
100 105 110

Ser Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 199  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKB42 CDRH1

<400> 199

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly  
1 5

<210> 200  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKB42 CDRH2

<400> 200

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Lys Lys  
1 5

<210> 201

043940

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB42 CDRH3

<400> 201

Val Lys Tyr Gly Glu Arg Ile Asn Gly Tyr Ser Asp Pro Phe Asp His  
 1 5 10 15

<210> 202  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB42 VH

<400> 202

Gln Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Phe Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr His Cys  
 85 90 95

Val Lys Tyr Gly Glu Arg Ile Asn Gly Tyr Ser Asp Pro Phe Asp His  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 203  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB85 CDRH1

<400> 203

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Ala  
 1 5

<210> 204

043940

<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKB85 CDRH2

<400> 204

Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro  
1 5

<210> 205  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKB85 CDRH3

<400> 205

Ala Arg Val Ile Val Pro Tyr Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 206  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKB85 VH

<400> 206

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Leu Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Val Ile Val Pro Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 207

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB47 CDRH1

<400> 207

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr  
 1 5

<210> 208  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB47 CDRH2

<400> 208

Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr  
 1 5

<210> 209  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB47 CDRH3

<400> 209

Ala Arg Asp Gln Tyr Gly Gly Tyr Ala Arg Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

<210> 210  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB47 VH

<400> 210

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

043940

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Tyr Gly Gly Tyr Ala Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 211  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKC6 CDRH1

<400> 211

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr  
1 5

<210> 212  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKC6 CDRH2

<400> 212

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
1 5

<210> 213  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKC6 CDRH3

<400> 213

Ala Arg Val Ser Asp Trp Gly Phe Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 214  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKC6 VH

<400> 214

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

## 043940

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Val Ser Asp Trp Gly Phe Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Gln  
 115

<210> 215  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA160 CDRH1

<400> 215

Gly Gly Ser Ile Thr Ser Tyr Ser  
 1 5

<210> 216  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA160 CDRH2

<400> 216

Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 217  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA160 CDRH3

<400> 217

Ala Arg Asp Gln Thr Met Pro Val Trp Val Gly Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

<210> 218

## 043940

<211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA160 VH

<400> 218

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asp Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Asp Gln Thr Met Pro Val Trp Val Gly Gly Met Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 219  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA172 CDRH1

<400> 219

Gly Tyr Ile Phe Thr Arg Tyr Trp  
 1 5

<210> 220  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA172 CDRH2

<400> 220

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr  
 1 5

<210> 221

043940

<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA172 CDRH3

<400> 221

Ala Arg Gln Glu Thr Ala Arg Glu Asp Gly Met Ala Val  
1 5 10

<210> 222  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA172 VH

<400> 222

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Arg Tyr  
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Thr Ala Arg Glu Asp Gly Met Ala Val Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 223  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA174 CDRH1

<400> 223

Gly Gly Ser Met Ser Asn Ser Tyr Tyr His  
1 5 10

<210> 224

## 043940

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA174 CDRH2

<400> 224

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 225  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA174 CDRH3

<400> 225

Ala Arg Asn Pro Val Phe Asn Pro Leu Thr Leu Thr His Asp Ala Phe  
 1 5 10 15

Asp Ile

<210> 226  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKA174 VH

<400> 226

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Asn Ser  
 20 25 30

Tyr Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Asn Pro Val Phe Asn Pro Leu Thr Leu Thr His Asp Ala  
 100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

043940

115 120 125

<210> 227  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA189 CDRH1

<400> 227

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
1 5

<210> 228  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA189 CDRH2

<400> 228

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr  
1 5

<210> 229  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA189 CDRH3

<400> 229

Ala Lys Trp Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Glu Ser Tyr Phe  
1 5 10 15

Asp Pro

<210> 230  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA189 VH

<400> 230

Gly Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val  
35 40 45

043940

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Trp Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Glu Ser Tyr Phe  
100 105 110

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 231  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA195 CDRH1

<400> 231

Gly Tyr Asn Phe Pro Ser Tyr Trp  
1 5

<210> 232  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA195 CDRH2

<400> 232

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr  
1 5

<210> 233  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA195 CDRH3

<400> 233

Ala Arg Ala Asp Cys Arg Ser Thr Ser Cys Tyr Leu Val Phe Glu  
1 5 10 15

<210> 234  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ZKA195 VH

043940

<400> 234

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Asp Ser Gly Tyr Asn Phe Pro Ser Tyr  
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ala Asp Cys Arg Ser Thr Ser Cys Tyr Leu Val Phe Glu Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 235

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKA215 CDRH1

<400> 235

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
1 5

<210> 236

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKA215 CDRH2

<400> 236

Ile Asp Pro Ser Asp Ser His Thr  
1 5

<210> 237

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZKA215 CDRH3

&lt;400&gt; 237

Ala Arg His Ala Leu Pro Asn Tyr Phe Asp Ser  
 1 5 10

&lt;210&gt; 238

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKA215 VH

&lt;400&gt; 238

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser His Thr Asp Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Ala Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg His Ala Leu Pro Asn Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 239

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKA218 CDRH1

&lt;400&gt; 239

Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr Trp  
 1 5

&lt;210&gt; 240

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKA218 CDRH2

&lt;400&gt; 240

Ile Asn Ser Asp Gly Arg Asn Thr  
 1 5

&lt;210&gt; 241

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKA218 CDRH3

&lt;400&gt; 241

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Gly Cys Phe Asp Tyr  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 242

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKA218 VH

&lt;400&gt; 242

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val  
 35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Arg Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Gly Cys Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 243

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB75 CDRH1

&lt;400&gt; 243

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
 1 5

&lt;210&gt; 244

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB75 CDRH2

&lt;400&gt; 244

Ile Ser Gly Thr Gly Gly Ser Thr  
 1 5

&lt;210&gt; 245

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB75 CDRH3

&lt;400&gt; 245

Ala Lys Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Val Cys  
 1 5 10 15

Tyr Leu Asn Pro Gly His His Asp Tyr  
 20 25

&lt;210&gt; 246

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKB75 VH

&lt;400&gt; 246

Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

## 043940

85

90

95

Ala Lys Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Val Cys  
 100 105 110

Tyr Leu Asn Pro Gly His His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 115 120 125

Thr Val Ser Ser  
 130

<210> 247  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB83 CDRH1

<400> 247

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp  
 1 5

<210> 248  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB83 CDRH2

<400> 248

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr  
 1 5

<210> 249  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB83 CDRH3

<400> 249

Ala Arg Leu Arg Gly Ser Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Arg Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15

Val Pro Gly Glu Thr Pro Asn Trp Phe Asp Pro  
 20 25

<210> 250  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKB83 VH

<400> 250

043940

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ser Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Trp Ser Ile Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Lys Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Leu Arg Gly Ser Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Arg Cys Tyr Ser  
 100 105 110

Val Pro Gly Glu Thr Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130

<210> 251  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKC3 CDRH1

<400> 251

Gly Gly Ser Ile Thr Ser Tyr Tyr  
 1 5

<210> 252  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZKC3 CDRH2

<400> 252

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 253  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

## 043940

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC3 CDRH3

&lt;400&gt; 253

Ala Arg Val Gly Gly Ala Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 254

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC3 VH

&lt;400&gt; 254

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Val Gly Gly Ala Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 255

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC18 CDRH1

&lt;400&gt; 255

Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 1 5

&lt;210&gt; 256

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC18 CDRH2

&lt;400&gt; 256

Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr  
 1 5 10

&lt;210&gt; 257

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC18 CDRH3

&lt;400&gt; 257

Ser Arg Asp His Thr Gly Thr Thr Tyr Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10

&lt;210&gt; 258

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKC18 VH

&lt;400&gt; 258

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile  
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Ser Arg Asp His Thr Gly Thr Thr Tyr Ala Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Gln  
 115 120

&lt;210&gt; 259

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKD1 CDRH1

&lt;400&gt; 259

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
 1 5

&lt;210&gt; 260

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKD1 CDRH2

&lt;400&gt; 260

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys  
 1 5

&lt;210&gt; 261

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKD1 CDRH3

&lt;400&gt; 261

Ala Arg Asp Arg Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Gly  
 1 5 10 15

Met Asp Val

&lt;210&gt; 262

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ZKD1 VH

&lt;400&gt; 262

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

043940

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Gly  
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 263  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Zika virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(14)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (25)..(25)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (27)..(27)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (33)..(33)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (35)..(35)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (41)..(41)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (60)..(60)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (83)..(83)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

043940

<221> misc\_feature  
 <222> (85)..(85)  
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid  
 <400> 263

Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Xaa Pro Ala Glu Xaa Xaa His Gly  
 1 5 10 15

Thr Val Thr Val Glu Xaa Gln Tyr Xaa Gly Xaa Asp Gly Pro Cys Lys  
 20 25 30

Xaa Pro Xaa Gln Met Ala Val Asp Xaa Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly  
 35 40 45

Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Xaa Thr Glu Asn Ser  
 50 55 60

Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val  
 65 70 75 80

Ile Gly Xaa Gly Xaa Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser  
 85 90 95

<210> 264  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> Zika virus

<400> 264

Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly  
 1 5 10 15

Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys  
 20 25 30

Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly  
 35 40 45

Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser  
 50 55 60

Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val  
 65 70 75 80

Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser  
 85 90 95

<210> 265  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZIKV EDIII generic

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably K, A,  
or E

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably V, F,  
or L

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(4)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably S or F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(17)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably I or V

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (21)..(21)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably T or V

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably L or D

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (30)..(30)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably V or G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (33)..(33)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably A or G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (35)..(35)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid except R,  
preferably T or A

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (41)..(41)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably V or I

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (43)..(43)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably A or V

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (49)..(49)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably M or T

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (68)..(68)  
<223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably S or G

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (70)..(70)  
 <223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably E or K

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (91)..(91)  
 <223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably V or I

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (93)..(93)  
 <223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably E, A, K, or D

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (94)..(94)  
 <223> X may be any (naturally occurring) amino acid, preferably E, A, or K, more preferably K or A

<400> 265

Xaa Gly Xaa Xaa Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys  
 1 5 10 15

Xaa Pro Ala Glu Xaa Xaa His Gly Thr Val Thr Val Glu Xaa Gln Tyr  
 20 25 30

Xaa Gly Xaa Asp Gly Pro Cys Lys Xaa Pro Xaa Gln Met Ala Val Asp  
 35 40 45

Xaa Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val  
 50 55 60

Ile Thr Glu Xaa Thr Xaa Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro  
 65 70 75 80

Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Xaa Gly Xaa Xaa Lys Ile  
 85 90 95

Thr His His Trp His Arg Ser Gly  
 100

<210> 266  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Zika-E-F1 primer

<400> 266  
 tgcaaacgcg gtcgcaaacc tggttg

26

<210> 267  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZIKV-E-R1 primer

<400> 267  
 cgtgccaagg taatggaatg tcgtg 25

<210> 268  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZIKV-Ef1530 primer

<400> 268  
 agcctaggac ttgattgtga accga 25

<210> 269  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZIKV-E-R2769 primer

<400> 269  
 ttacagatcc cacaacgacc gtcag 25

<210> 270  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZIKV-E-F2

<400> 270  
 acttggtcat gatactgctg attgc 25

<210> 271  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZIKV-E-R2

<400> 271  
 tcggttcaca atcaagtcct aggct 25

<210> 272  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ZIKV-E-f2058

<400> 272  
 gctaaccocg taatcactga aagca 25

<210> 273  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

&lt;223&gt; ZIKV-E-r2248

&lt;400&gt; 273

aagactgcc a ttctcttggc acctc

25

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающее-ся/специфически связывающийся с эпитопами вируса Зика на белке оболочки вируса Зика (белок ZIKV E), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит сайт связывания эпитопа, содержащий аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, а также аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 (i) согласно SEQ ID NO: 19-23 и 25, соответственно; или (ii) согласно SEQ ID NO: 19-22 и 24, 25, соответственно.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нейтрализует инфекцию вируса Зика.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент элиминирует размножение ускользающих мутантов вируса Зика.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не способствует антителозависимому усилению инфекции вируса Зика.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, отличающееся/отличающийся тем, что каждая CDR или каждая переменная область, включенная в антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, является CDR человека или гуманизированной переменной областью, соответственно.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является моноклональным антителом.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому пп.1-6, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является биспецифическим, триспецифическим, тетраспецифическим или пентаспецифическим.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является бивалентным, тривалентным, тетравалентным, гексавалентным или октавалентным.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп.1-8, отличающееся тем, что молекула антитела содержит две копии сайтов, специфически связывающихся с эпитопами вируса Зика.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к типу IgG.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает Fc фрагмент.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает мутацию в Fc фрагменте, причем указанная мутация снижает связывание антитела с рецептором Fc.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.10 или 12, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает мутацию CH2 L4A, мутацию CH2 L5A или обе.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет формат антитела Fabs-in-tandem-Ig.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет формат антитела DVD-Ig.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не включает сайта связывания для рецептора Fc.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом белка оболочки вируса Зика (EDIII).

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков латерального гребня (LR) в EDIII и/или один или несколько аминокислотных остатков шарнирной области EDI-EDIII.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может ингибировать стадию





и/или аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), соответствующую последовательности SEQ ID NO: 27, или функциональный вариант этой последовательности, который по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 88, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 92, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичен этой последовательности.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-26, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент находится в формате Fabs-in-tandem-Ig (FIT-Ig) и внешний Fab формата FIT-Ig содержит сайт связывания эпитопа, включающий аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, (i) соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 1-5 и 7; или функциональные варианты этих последовательностей, которые по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 88, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 92, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичны этим последовательностям; или (ii) соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 1-4 и 6, 7; или функциональные варианты этих последовательностей, которые по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 88, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 92, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичны этим последовательностям; и внутренний Fab формата FIT-Ig содержит сайт связывания эпитопа, содержащий аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, а также аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 (i) согласно SEQ ID NO: 19-23 и 25; или (ii) согласно SEQ ID NO: 19-22 и 24, 25.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.27, отличающееся/отличающийся тем, что внешний Fab формата FIT-Ig включает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), соответствующую последовательности SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант этой последовательности, который по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 88, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 92, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичен этой последовательности, и/или аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), соответствующую последовательности SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант этой последовательности, который по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 88, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 92, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичен этой последовательности.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.27 или 28, отличающееся/отличающийся тем, что внутренний Fab формата FIT-Ig включает сайт связывания эпитопа, содержащий аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), соответствующую последовательности SEQ ID NO: 26, или функциональный вариант этой последовательности, который по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 88, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 92, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичен этой последовательности, и/или аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), соответствующую последовательности SEQ ID NO: 27, или функциональный вариант этой последовательности, который по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 88, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 92, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичен этой последовательности.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся/отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является очищенным антителом или одноцепочечным антителом, например scFv.

31. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предыдущих пунктов в качестве лекарственного средства.

32. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-30.

33. Молекула нуклеиновой кислоты по п.32, которая является моно-, би- или полицистронной молекулой нуклеиновой кислоты.

34. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.32, 33, которая является ДНК или РНК.

35. Молекула нуклеиновой кислоты по п.34, причем молекула нуклеиновой кислоты является плазмидной ДНК или мРНК.

36. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.32-35.

37. Набор молекул нуклеиновых кислот, причем каждая молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий фрагмент антитела или его антигенсвязывающий фрагмент любому из пп.1-30, где набор нуклеиновых кислот кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-30.

38. Набор векторов, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-30.

39. Клетка, экспрессирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-

30, содержащая вектор по п.36 или набор векторов по п.38.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-30, молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.32-35, вектор по п.36, набор молекул нуклеиновых кислот по п.37, набор векторов по п.38 и/или клетку по п.39, причем фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

41. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-30 для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика.

42. Применение по п.41 для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, у субъектов с диагнозом инфекции вирусом Зика или у субъекта с проявлением симптомов инфекции вирусом Зика.

43. Применение по п.41 у субъектов без проявления симптомов.

44. Применение по любому из пп.41-43 у беременных.

45. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-30 для мониторинга качества вакцины против вируса Зика путем проверки того, что антиген указанной вакцины содержит специфический эпитоп в правильной конформации.

46. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-30 для (in vitro) диагностики инфекции вирусом Зика.

47. Набор для профилактики или лечения инфекции вируса Зика, содержащий по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-30, по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по любому из пп.32-35, по меньшей мере один вектор по п.36, набор молекул нуклеиновой кислоты по п.37, набор векторов по п.38, по меньшей мере одну клетку по п.39 или по меньшей мере одну фармацевтическую композицию по п.40.

48. Способ профилактики или лечения инфекции вируса Зика у субъекта, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-30, молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.32-35, вектора по п.36, набора молекул нуклеиновой кислоты по п.37, набора векторов по п.38, клетки по п.39 или фармацевтической композиции по п.40.

49. Способ по п.48, в котором у субъекта было диагностировано инфицирование вирусом Зика или обнаружены симптомы вирусной инфекции Зика.

50. Способ по п.48 или 49, в которых субъектом является беременная.

51. Способ по любому из пп.48-50, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в течение семи дней после (возможного) инфицирования вирусом Зика.

52. Способ по любому из пп.48-51, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с ингибитором контрольной точки.

53. Способ по любому из пп.48-52, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в (разовой) дозе от 0,005 до 100 мг.

Связывание (EC50, нг/мл)

Нейтрализация,  
(IC50, нг/мл)

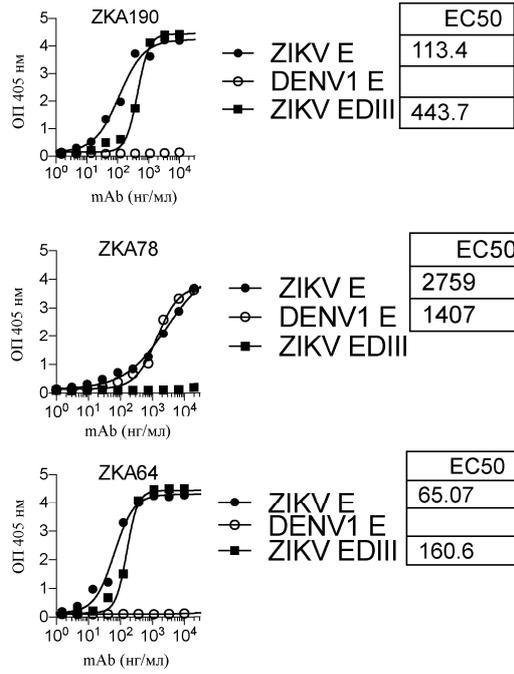
	ZIKV E	DENV1 E	DENV2 E	DENV3 E	DENV4 E	DENV1 VLP	DENV2 VLP	DENV3 VLP	DENV4 VLP	DIII ZKA	ZIKV neut	DENV1 neut
ZKA3	172	510	108	17	134	12	28	10	7	-	411	346
ZKA4	172	135	23	9	22	9	11	10	8	-	961	592
ZKA5	243	877	133	22	123	37	32	25	31	-	1978	-
ZKA6	79	355	28	13	58	13	14	9	10	-	1661	-
ZKA7	112	329	74	11	95	9	18	8	7	-	646	513
ZKA8	70	136	31	8	28	8	11	7	11	-	1336	102
ZKA76	408	-	-	-	-	-	-	-	-	3756	62	nd
ZKA78	2759	1407	982	33	385	158	83	131	136	-	2863	266
ZKA117	376	1780	341	49	391	142	86	36	158	-	1945	83
ZKB27	225	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	257	nd
ZKB29	285	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB30	1560	2011	2320	344	459	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB32	1668	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	545	nd
ZKB34	122	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB39	136	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	667	nd
ZKB41	241	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB45	125	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	1461	nd
ZKB46	3238	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB51	645	220	115	66	62	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB52	3398	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB53	59	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB84	4373	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC21	2069	4201	3659	877	1252	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC22	161	347	133	330	75	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC23	87	2162	97	37	21	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC24	92	177	71	240	55	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC26	52	150	61	21	28	nd	nd	nd	nd	-	420	nd
ZKD4	20	80	24	8	11	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD5	42	254	103	17	41	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD6	115	585	600	31	96	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD7	33	474	147	12	44	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD8	24	169	62	12	25	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD15	581	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD16	62	692	475	10	27	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD17	14	93	32	7	12	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD20	565	-	-	50	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD21	53	63	189	13	17	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKA64	65	-	-	-	-	-	-	-	-	161	155	-
ZKA134	168	-	-	-	-	-	-	-	-	626	432	nd
ZKA190	113	-	-	-	-	-	-	-	-	444	12	nd
ZKA246	473	-	-	-	-	-	-	-	-	5974	243	nd
ZKA256	115	-	-	-	-	-	-	-	-	214	224	nd
ZKB31	73	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	18	-	nd
ZKB42	5561	7073	6485	12065	6884	nd	nd	nd	nd	5158	-	nd
ZKB50	653	10000	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB85	953	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	2400	2387	nd
ZKB47	13	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	574	-	nd
ZKC6	8575	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	5533	32	nd
ZKC25	162	144	147	150	158	nd	nd	nd	nd	200	-	nd
ZKD18	17	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	12	-	nd
ZKA81	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	243	nd
ZKA144	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	48	nd
ZKA146	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	45	nd
ZKA155	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	99	nd
ZKA160	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	38	26
ZKA167	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	121	nd
ZKA169	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	321	nd
ZKA171	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	47	nd
ZKA172	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	9	nd
ZKA174	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	55	-
ZKA183	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	34	nd
ZKA185	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	13	-
ZKA189	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	273	nd
ZKA191	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	52	nd
ZKA195	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	33	-
ZKA207	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	43	nd
ZKA215	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	26	nd
ZKA218	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	14	nd
ZKA228	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	36	nd
ZKA230	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	10	nd
ZKB75	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	190	nd
ZKB79	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	391	nd
ZKB83	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	59	nd
ZKC3	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	170	nd
ZKC8	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	762	nd
ZKC15	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	15	nd
ZKC18	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	662	nd
ZKD1	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	1141	nd

EDII/II

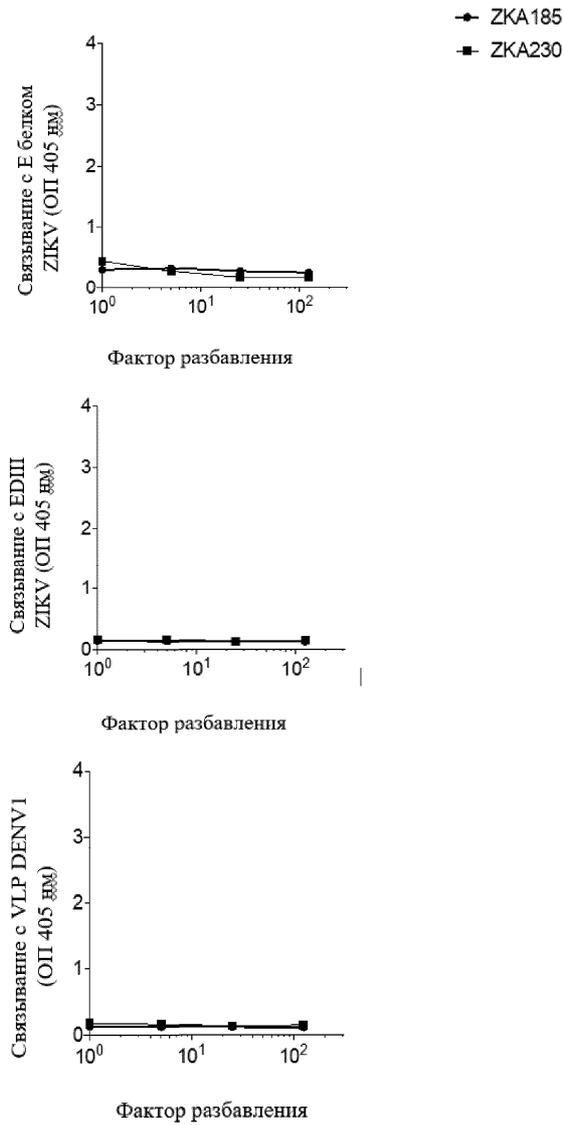
EDIII

NNB

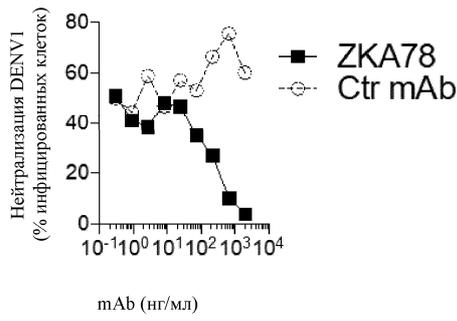
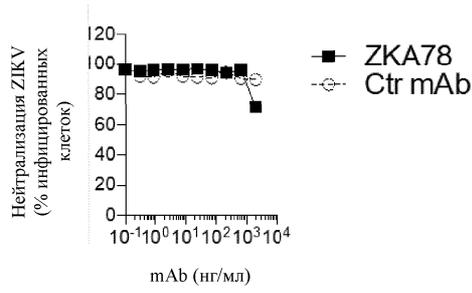
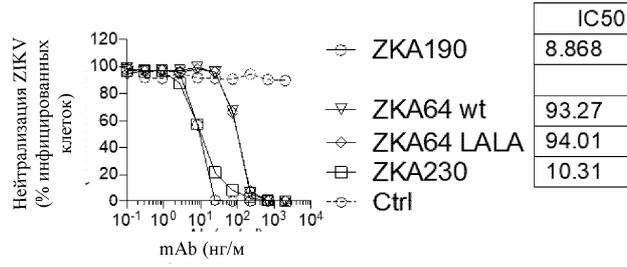
Фиг. 1



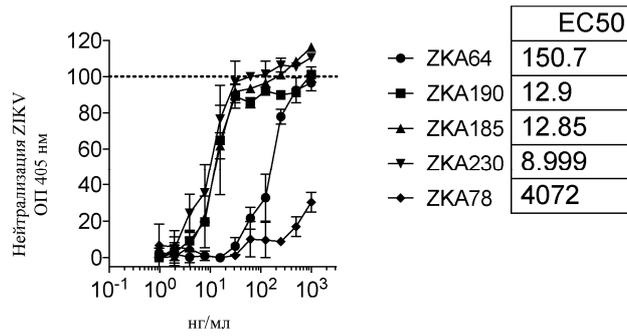
Фиг. 2



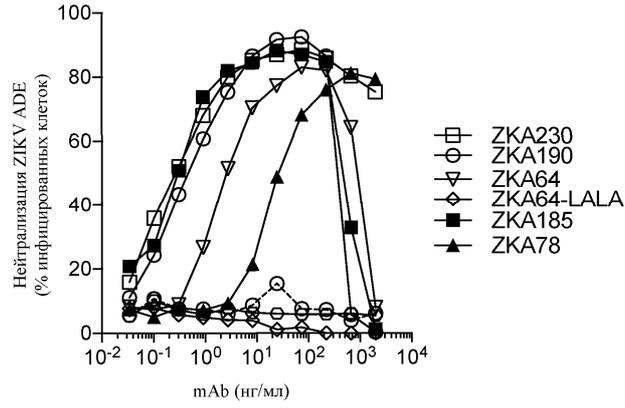
Фиг. 3



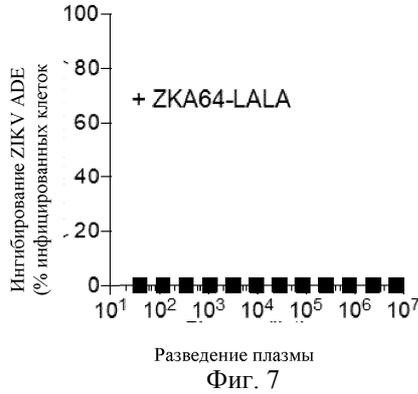
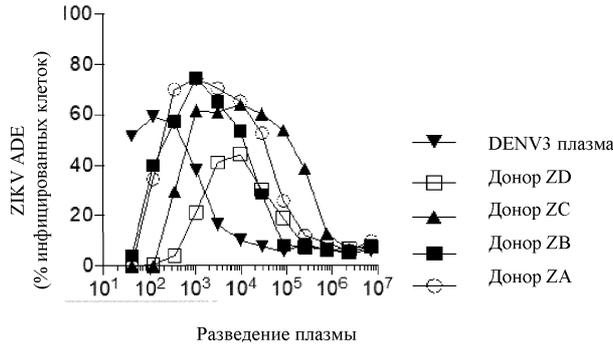
Фиг. 4



Фиг. 5



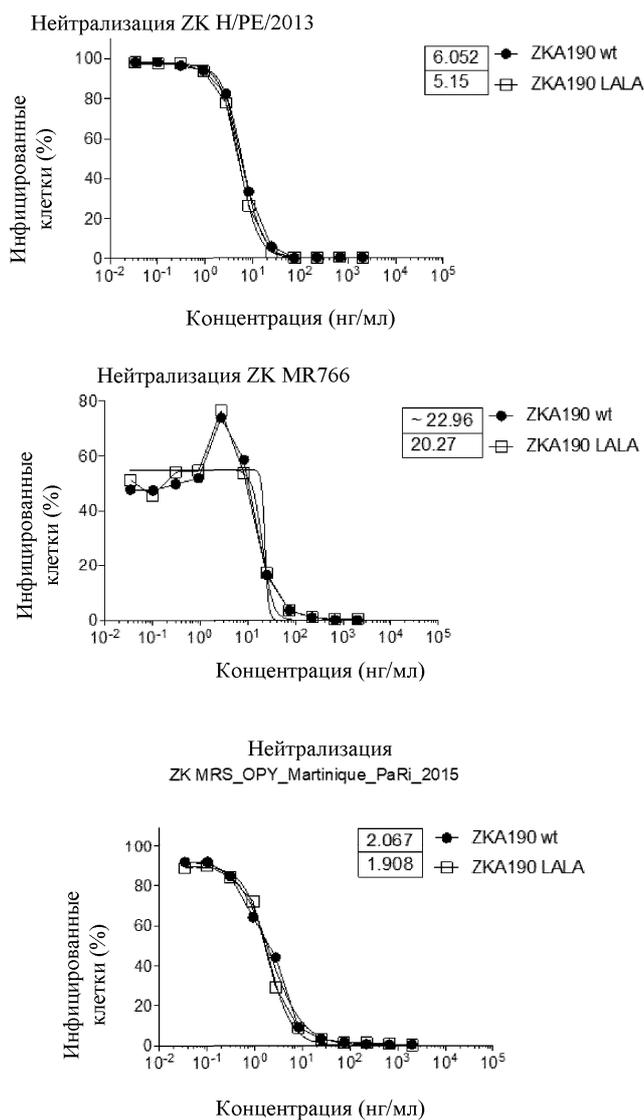
Фиг. 6



Фиг. 7

Шагм вируса Зика		20	40	60	80	
	H/PF/2013 (KU776791)	t a a f t f t k i p a e t l h g t v t v e v q y a g t d g p c k v p a q m a v d m q t l t p v g r i i t a n p v i t e s t e n s k m m l e l d p p f g d s y i v i g v g e k k i t h h w h r s				95
	SPH2015 (KU321639)	.....				95
MRS_OPY_Martinique_PaRI_2015 (KU647676)		.....				95
	MR766 (AY632535)	..... i . v . . . . . d . . . . .				95
	KU926309 Brazil 14-Jan-2016	.....				95
	KU870645 USA 02-Feb-2016	..... l . . . . .				95
	KU940228 Brazil 01-Jul-2015	.....				95
	KU365779 Brazil 2015	.....				95
	KU365778 Brazil 2015	.....				95
	KU312312 Suriname 2-Oct-15	.....				95
	KU853013 Italy 1-Feb-16	.....				95
	KU940224 Brazil 01-Aug-2015	.....				95
	KU820898 China 14-Feb-16	.....				95
	KU761564 China 12-Feb-16	.....				95
	KU729218 Brazil 2015	..... T . . . . .				95
	KU729217 Brazil 2015	.....				95
	KU922923 Mexico 25-Feb-16	.....				95
	KU365780 Brazil 2015	.....				95
	KU501216 Guatemala 1-Dec-15	.....				95
	KU740184 China 16-Feb	.....				95
	KU527068 Brazil 2015	.....				95
	KU955590 China 28-Feb-2016	.....				95
	KU707826 Brazil 1-Jul-15	.....				95
	KU922960 Mexico 25-Feb-16	.....				95
	KU866423 China 2016	.....				95
	KU501215 PuertoRico 1-Dec-15	.....				95
KJ776791 FrenchPolynesia 26-Nov-13		.....				95
KU501217 Guatemala 1-Nov-15		.....				95
	KU497555 Brazil 30-Nov-15	.....				95
	KU820897 Colombia 15-Dec	.....				95
KF993678 Canada 19-Feb-13		.....				95
	KU509999 Haiti 12-Dec-14	.....				95
	KU820899 China 17-Feb-16	.....				95
	KU365777 Brazil 2015	.....				95
KU955589 China 16-Feb-2016		.....				95
	KU853012 Italy 1-Feb-16	.....				95
	KU681081 Thailand 9-Jul-14	..... G . . . . .				95
	KU926310 Brazil 29-Jan-2016	..... A . . . . .				95
	KU744693 China 6-Feb-16	..... V D . . . . . G . . . . .				95

Фиг. 8

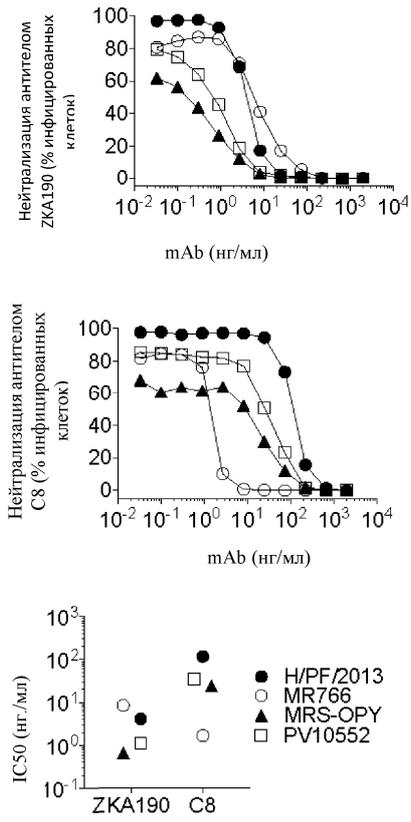


Фиг. 9

## B

	ZKA190	C8
Число величин	4	4
Минимум	0,6484	1,665
25% процентиль	0,7581	7,119
Среднее	2,586	29,04
75% процентиль	7,302	95,5
Максимум	8,374	115,8
Среднее	3,549	43,89
Стандартное отклонение	3,561	49,86
Стандартная ошибка среднего значения	1,781	24,93
Нижняя 95% CI среднего значения	-2,118	-35,45
Верхняя 95% CI среднего значения	9,215	123,2
Коэффициент вариации	100,35%	113,60%
Среднее геометрическое	2,216	19,89
Геометрический коэффициент SD	3,246	5,977
Сумма	14,19	175,5

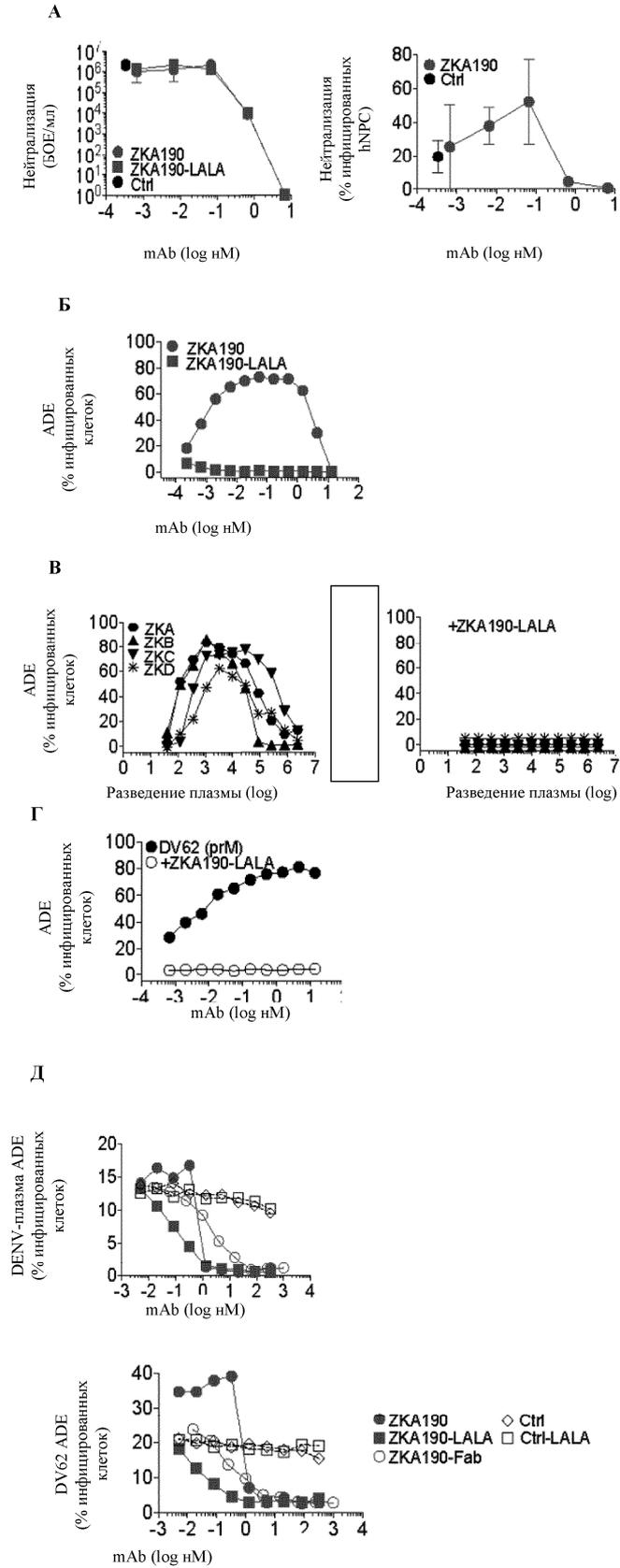
А



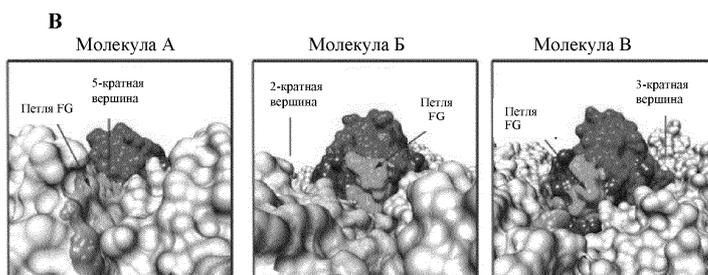
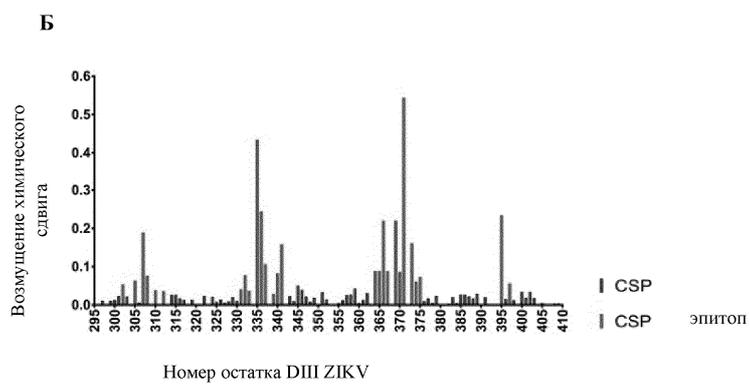
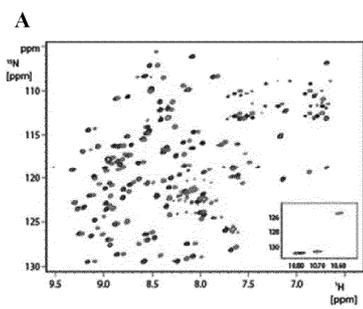
Б

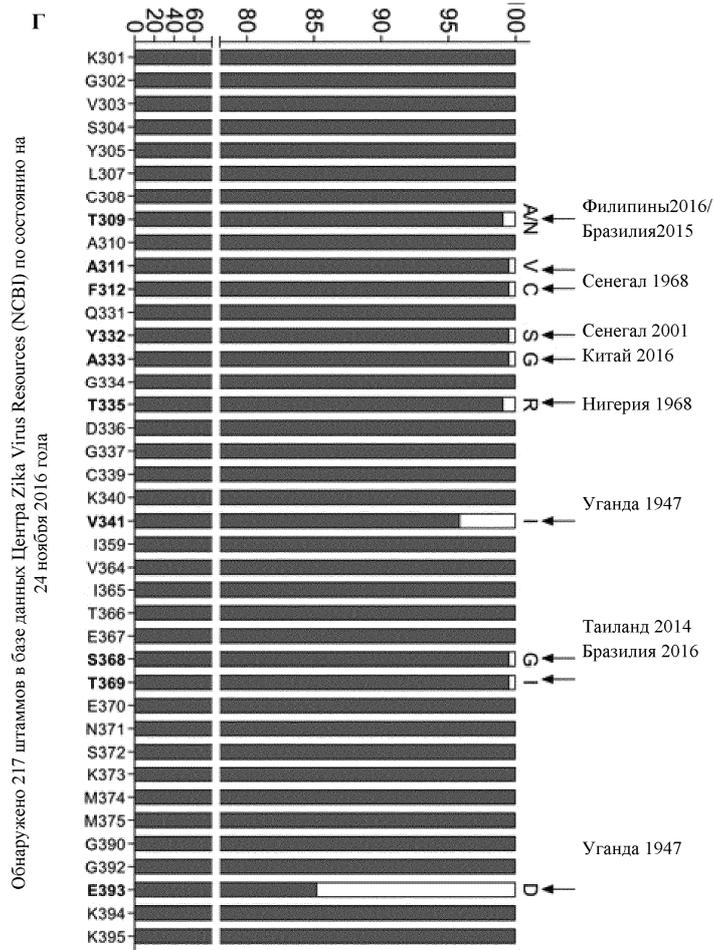
Штамм ZIKV	IC <sub>50</sub> (нг./мл)	
	ZKA190	C8
H/PF/2013	4,09	115,80
MR766	8,37	1,67
MRS-OPY	0,65	23,48
PV10552	1,09	34,60

Фиг. 10

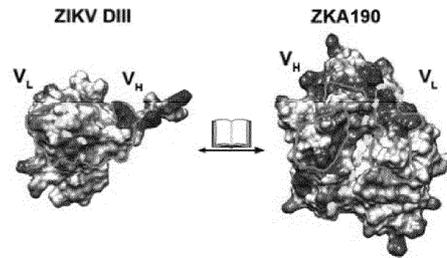


Фиг. 11

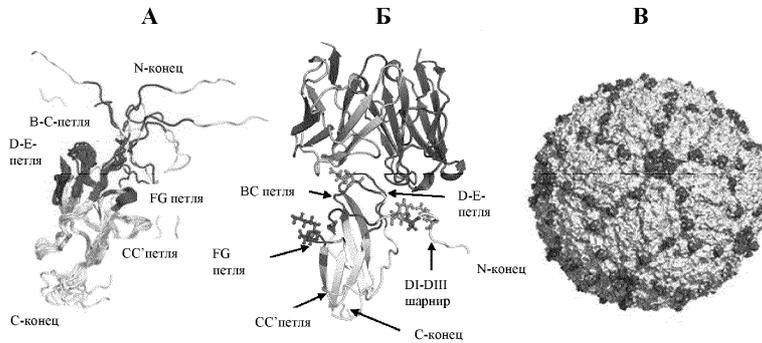




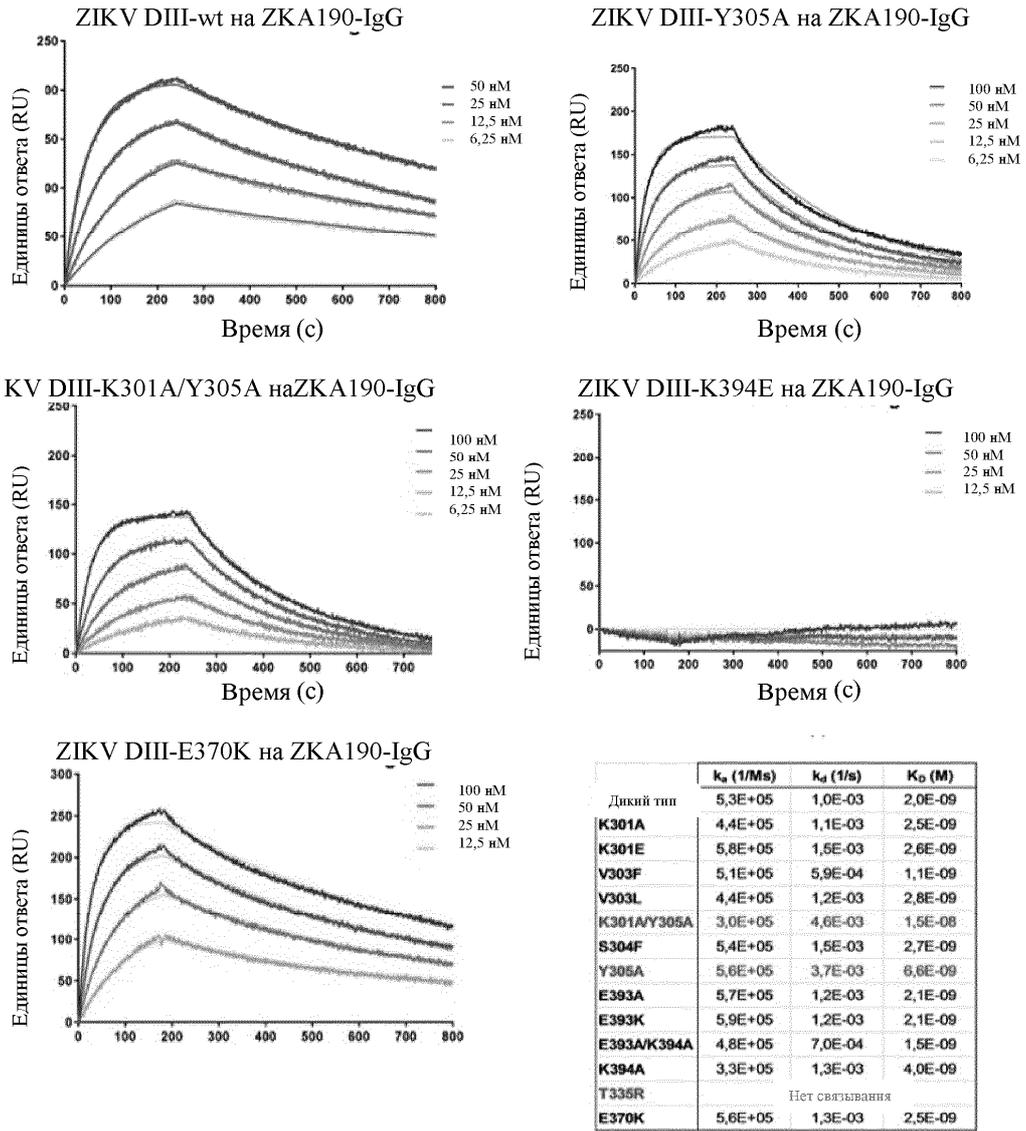
Д



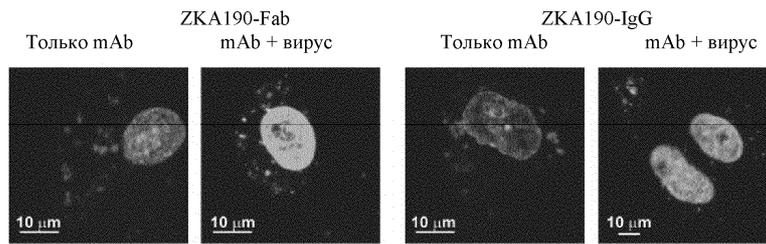
Фиг. 12



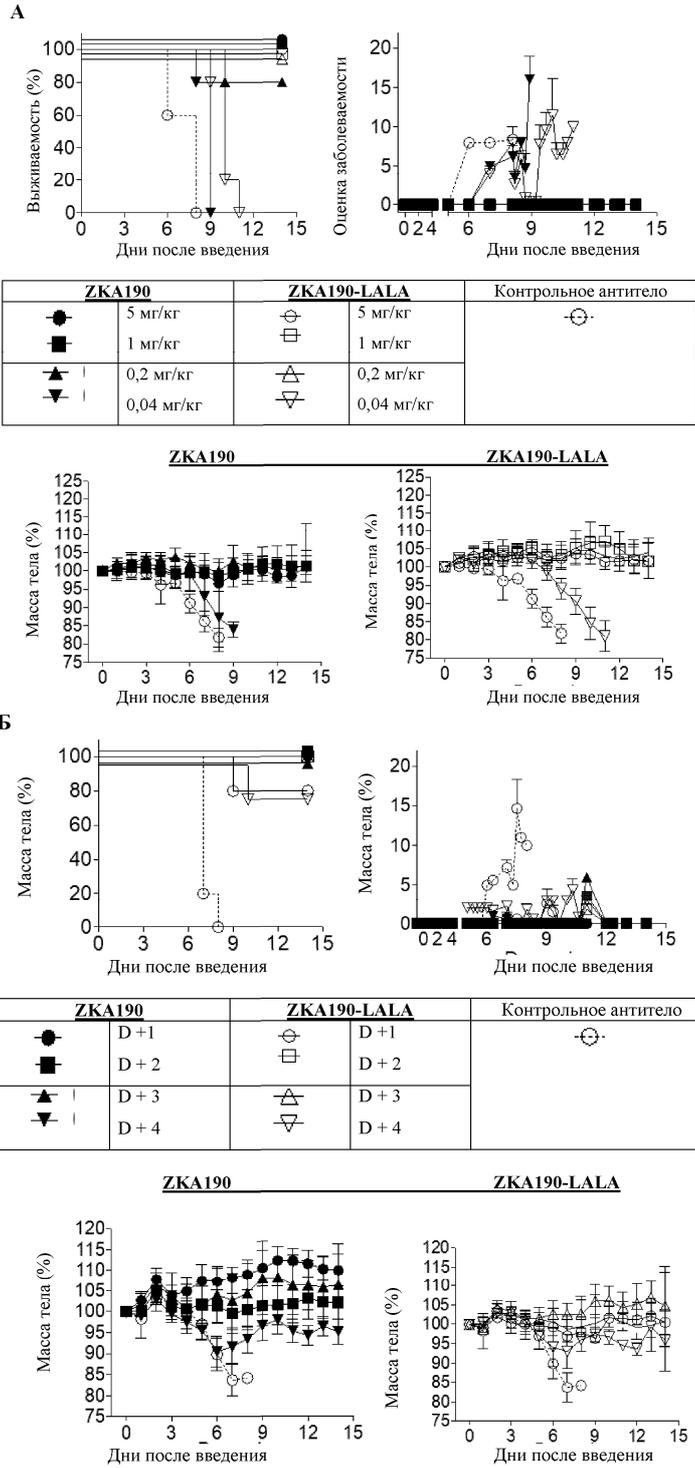
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

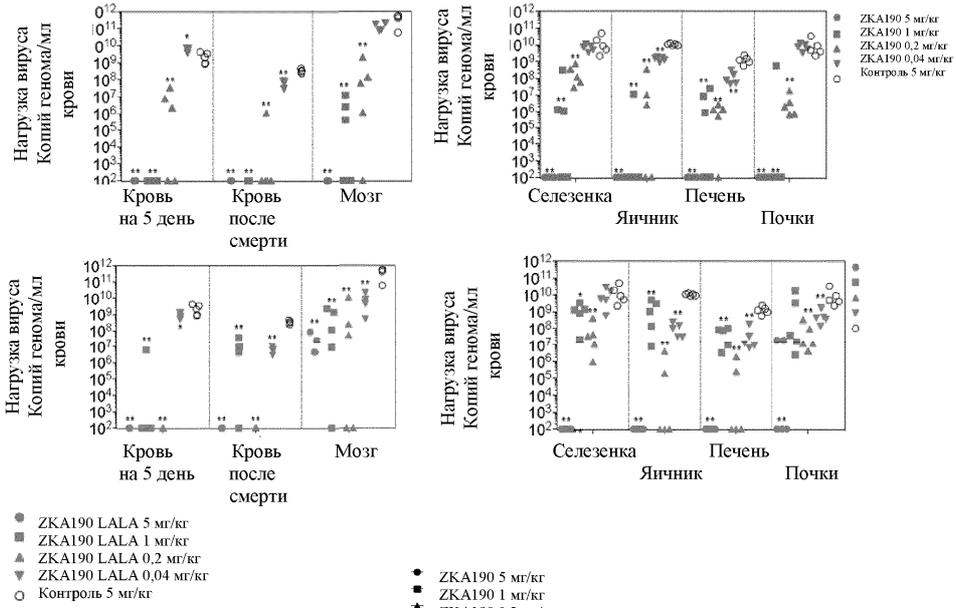


Фиг. 16

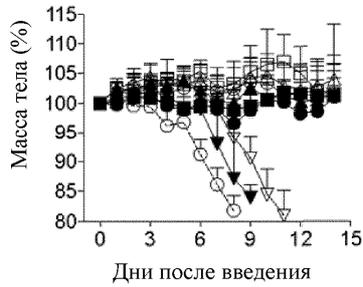
**А**



**Б**

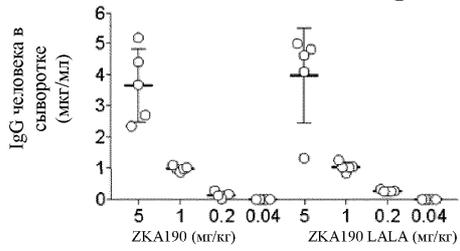


**В**



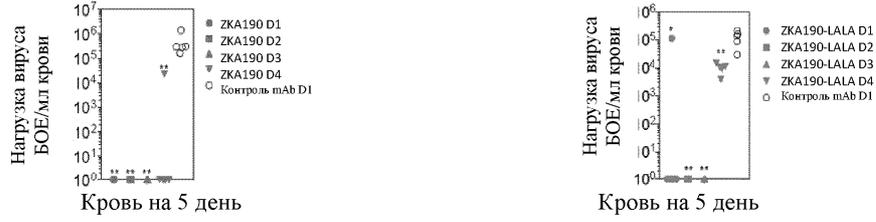
● ZKA190 5 мг/кг  
 ■ ZKA190 1 мг/кг  
 ▲ ZKA190 0,2 мг/кг  
 ▼ ZKA190 0,04 мг/кг  
 ○ ZKA190 LALA 5 мг/кг  
 ■ ZKA190 LALA 1 мг/кг  
 ▲ ZKA190 LALA 0,2 мг/кг  
 ▼ ZKA190 LALA 0,04 мг/кг  
 ○ Контроль 5 мг/кг

**Г**

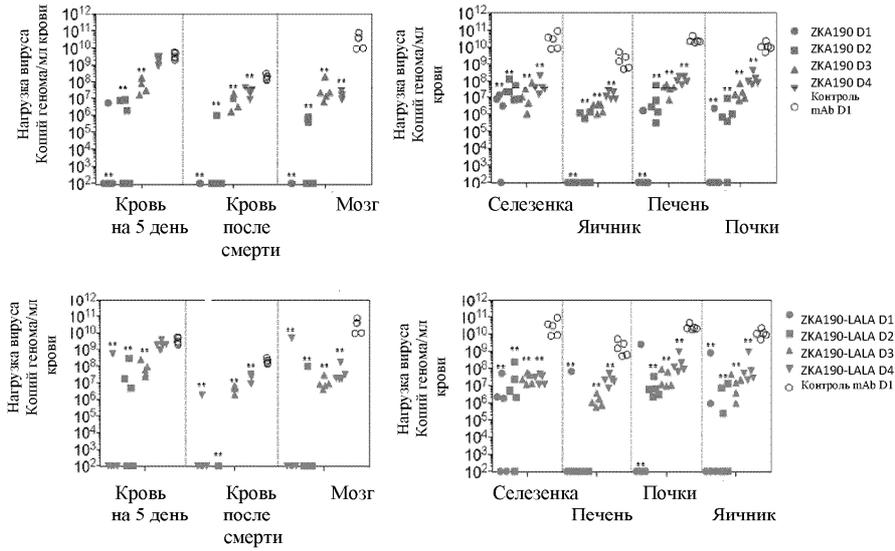


Фиг. 17

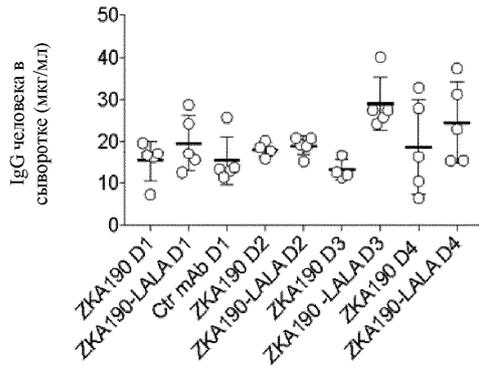
A



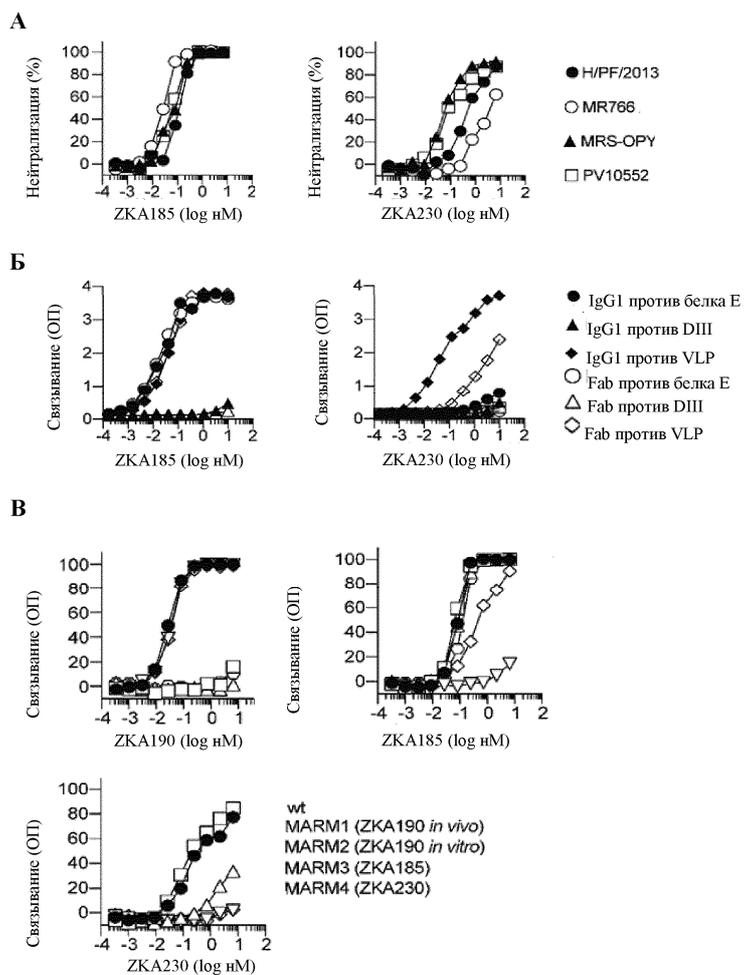
Б



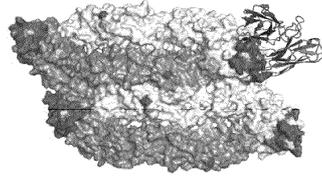
В



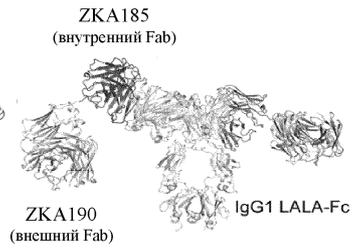
Фиг. 18



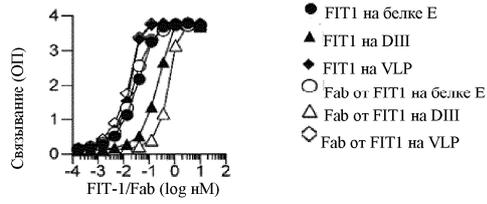
Г



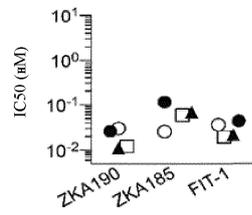
Д



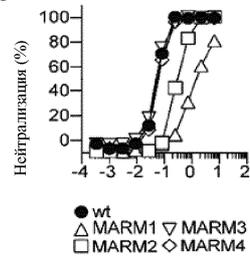
Е



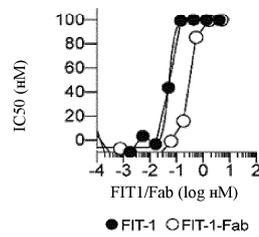
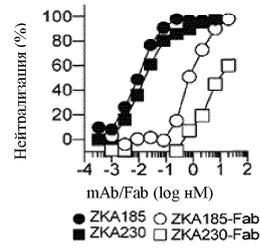
Ж



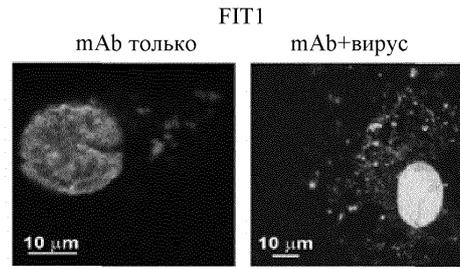
З



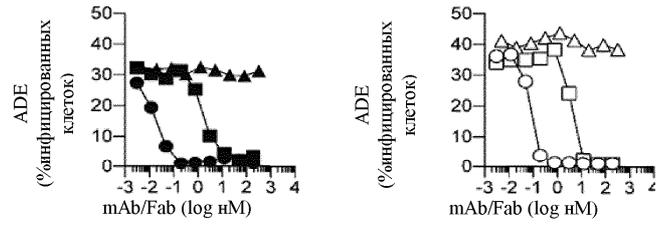
И



К



Л



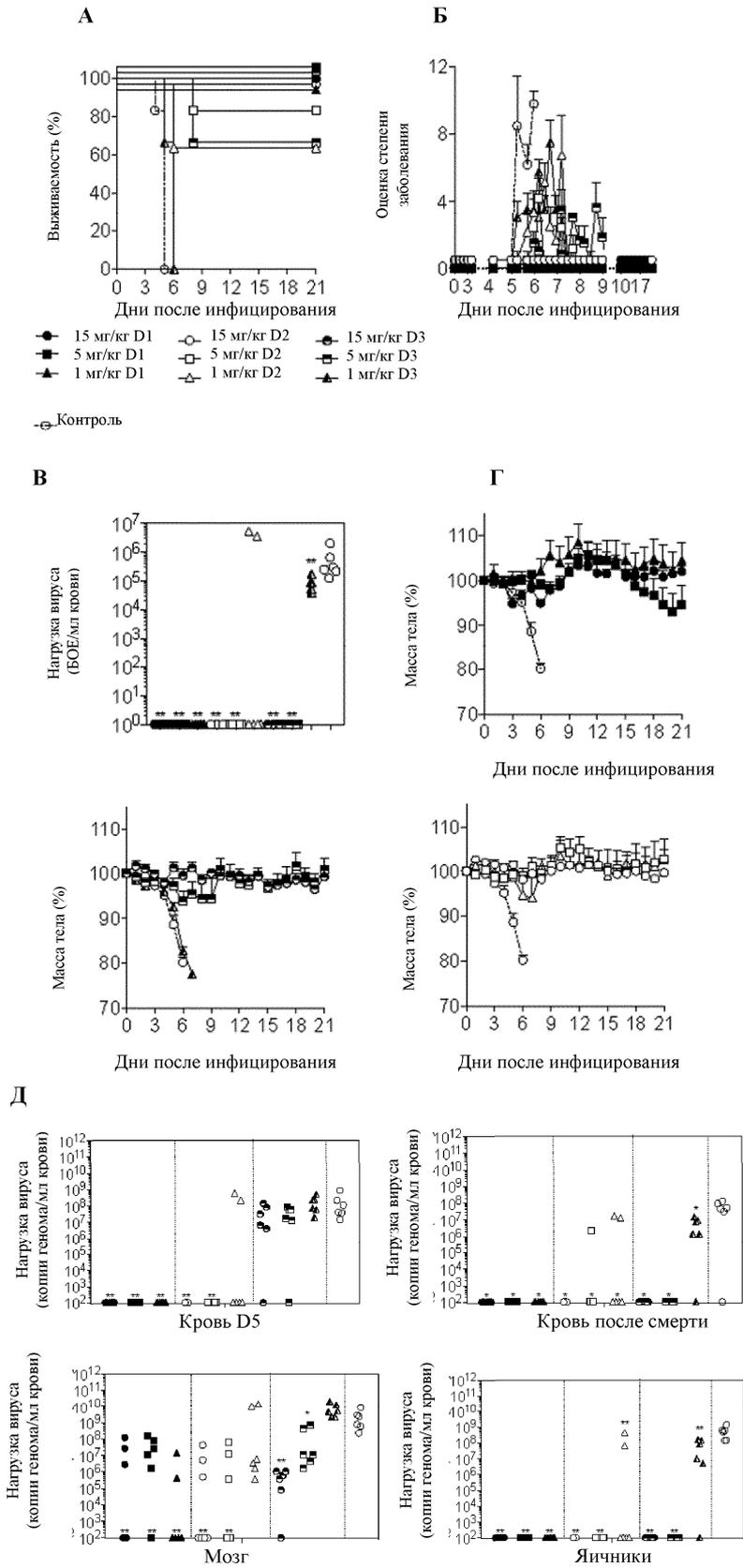
DV62 индуцирует ADE

- FIT1
- Fab FIT1
- ▲ Контрольное mAb

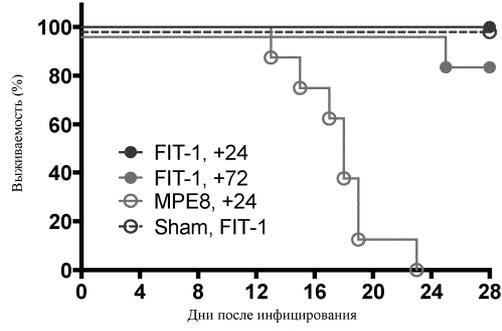
092-P индуцирует ADE

- FIT1
- Fab FIT1
- △ Контрольное mAb

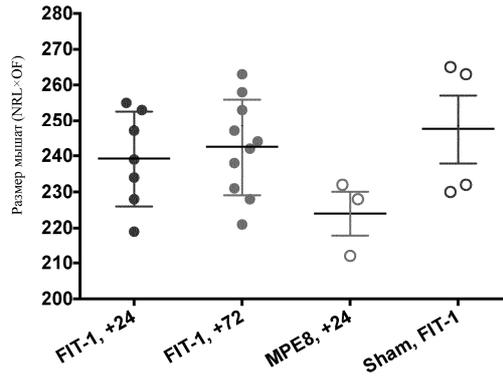
Фиг. 19



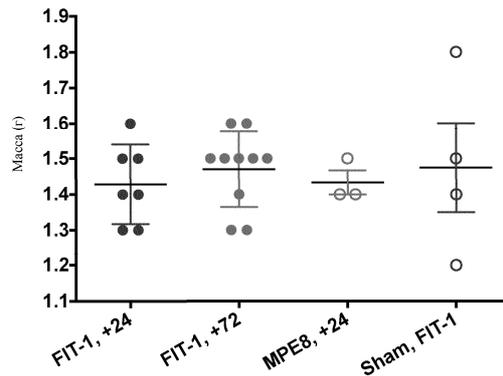
Фиг. 20



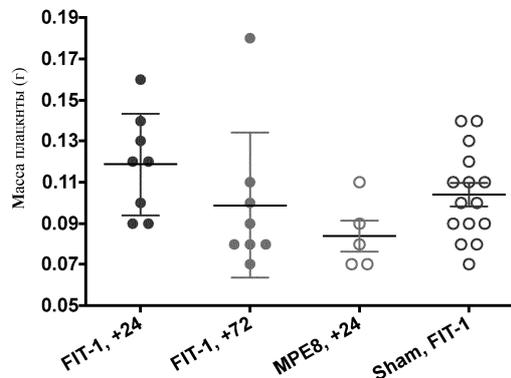
Фиг. 21



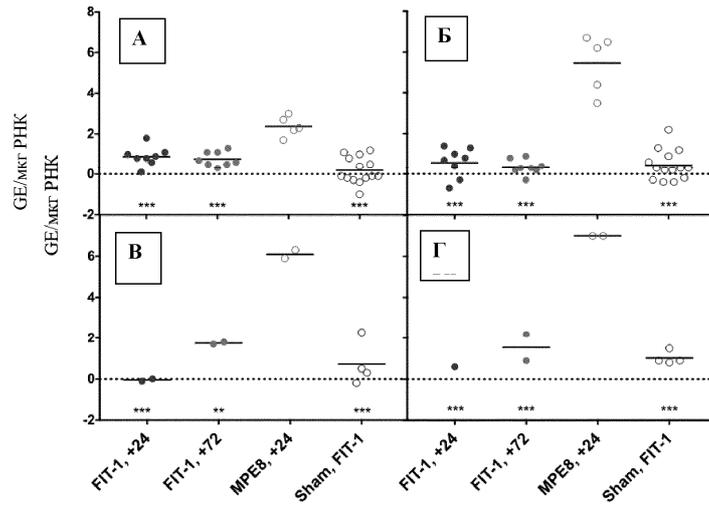
Фиг. 22



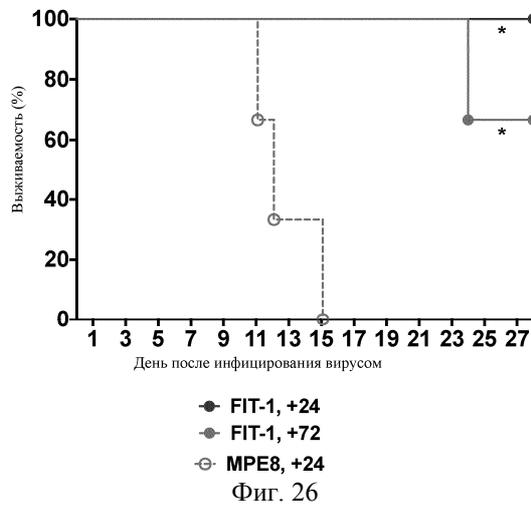
Фиг. 23



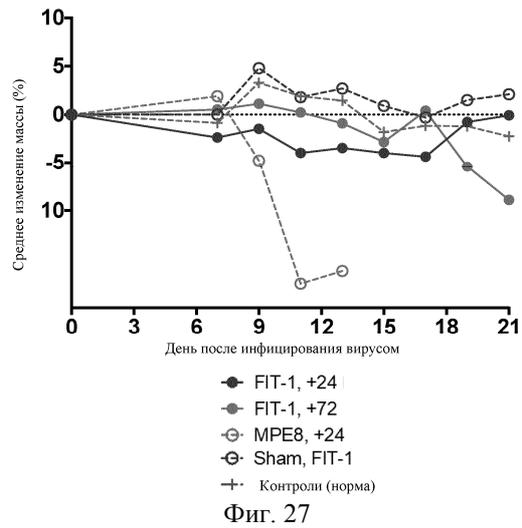
Фиг. 24



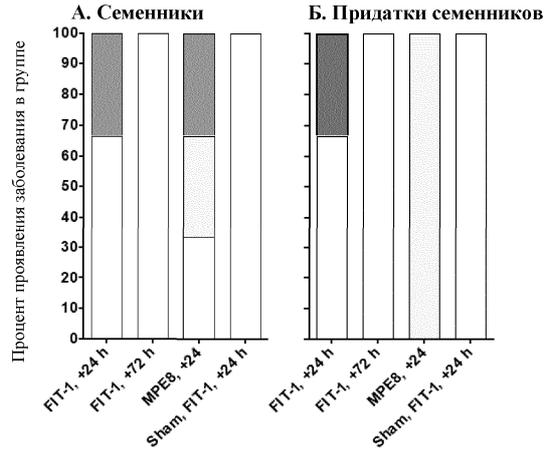
Фиг. 25



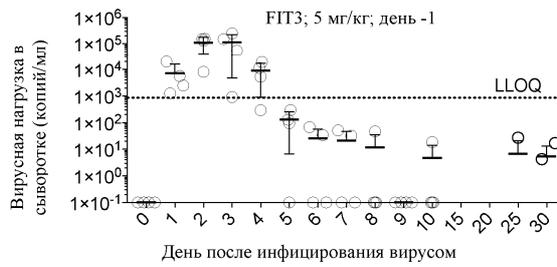
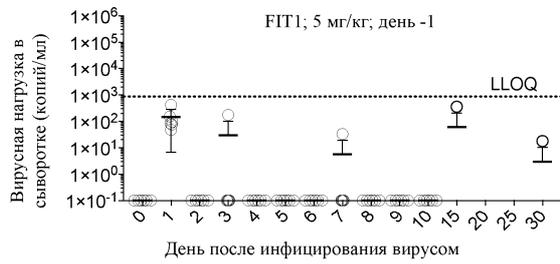
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29

