

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043756**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.20**

**(21)** Номер заявки  
**202092281**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.03.22**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/20** (2006.01)  
**A61P 33/06** (2006.01)  
**A61K 31/02** (2006.01)

---

**(54) АНТИ-PFRH5 АНТИТЕЛА И ИХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ**

---

**(31)** **62/648,259**

**(32)** **2018.03.26**

**(33)** **US**

**(43)** **2021.01.22**

**(86)** **PCT/US2019/023734**

**(87)** **WO 2019/190931 2019.10.03**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Перселл Лиза (US)**

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

**(56)** ROSALYNN L. ORD ET AL.: "A malaria vaccine candidate based on an epitope of the Plasmodium falciparum RH5 protein", *MALARIA JOURNAL*, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 13, no. 1, 18 August 2014 (2014-08-18), page 326, XP021193195, ISSN: 1475-2875, DOI: 10.1186/1475-2875-13-326, The whole document, in particular, fig. 1 and 4

ALEXANDER D. DOUGLAS ET AL.: "Neutralization of Plasmodium falciparum Merozoites by Antibodies against PfrH5", *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, vol. 192, no. 1, 29 November 2013 (2013-11-29), pages 245-258, XP055600601, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1302045, The whole document, in particular, fig. 4 and 5

LEYLA Y. BUSTAMANTE ET AL.: "A full-length recombinant Plasmodium falciparum PfrH5 protein induces inhibitory antibodies that are effective across common PfrH5 genetic variants", *VACCINE*, vol. 31, no. 2, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 373-379, XP055600519, AMSTERDAM, NL ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.10.106, the whole document

US-A1-2016215040

---

**(57)** Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с ретикулоцитсвязывающим белком-гомологом 5 Plasmodium falciparum (PfrH5), их композиции и способы получения таких антител, фрагментов и композиций. Способ и композиции для лечения, профилактики или диагностики инфекции Plasmodium falciparum и малярии также являются частью данного изобретения.

---

**B1**

**043756**

**043756 B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Данная заявка испрашивает приоритет в соответствии с §119(e) Раздела 35 Кодекса Законов США по предварительной заявке на патент США № 62/648259, поданной 26 марта 2018 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

### **Ссылка на перечень последовательностей**

Данная заявка включает в себя посредством ссылки Перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10437WO01-Sequence, созданного 22 марта 2019 г., содержащего 122791 байт.

### **Область техники**

Данное изобретение частично относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с PfRH5, а также к способам их применения для лечения или профилактики инфекций, вызываемых *Plasmodium falciparum*.

### **Уровень техники**

Инвазия эритроцитов хозяина представляет собой важный этап жизненного цикла *Plasmodium falciparum* и патологии малярии. Многие противомаларийные препараты направлены на бесполье стадии в кровеносном русле, однако их эффективности угрожает появление штаммов, резистентных к лекарственным препаратам (Argow et al., *Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance*. National Academies Press (US). 254-266 (2004). PMID:25009879; и Wright et al., *Structure of malaria invasion protein RH5 with erythrocyte basigin and blocking antibodies*, *Nature*: 515:427-430 (2014). PMID: 25132548). Кроме того, противомаларийные препараты обладают разными фармакокинетическими свойствами. Некоторые противомаларийные препараты, такие как артемизинин и хинин, быстро выводятся из организма в течение одного жизненного цикла паразита. С другой стороны, гидрофобные и липофильные противомаларийные препараты выводятся медленно, но они характеризуются различной скоростью всасывания в зависимости от количества потребляемых жиров (Argow et al.).

Ретикулоцитсвязывающий белок-гомолог 5 *Plasmodium falciparum* (PfRH5) является членом суперсемейства лигандов эритроцитов, называемых ретикулоцитсвязывающими подобными белками (RBL). PfRH5 связывает эритроциты, вероятно, необходим для роста паразита на стадии в кровеносном русле и участвует в видовом тропизме инвазии эритроцитов. Данные свидетельствуют о том, что рецептором для PfRH5 на эритроцитах является антиген группы крови Ок, базигин (BSG; CD147).

### **Краткое описание сущности изобретения**

В данном изобретении представлен антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), который (i) специфически связывается с тем же самым эпитопом на ретикулоцитсвязывающем белке-гомологе 5 *Plasmodium falciparum* (PfRH5), что и; или (ii) конкурирует за связывание с полипептидом PfRH5 с: антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который содержит (a) тяжелую цепь иммуноглобулина, которая содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354; и/или (b) легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 легкой цепи иммуноглобулина, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306. Например, в варианте осуществления данного изобретения анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит (i) тяжелую цепь иммуноглобулина, которая содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354; и/или (ii) легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 легкой цепи иммуноглобулина, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306. Например, в варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354; и/или (b) вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306. В варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит (a) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354, и имеющей по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250,

258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354; и/или (b) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 легкой цепи иммуноглобулина, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306, и имеющей по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306. Данное изобретение также включает антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержащий: тяжелую цепь иммуноглобулина, которая содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GYSFTSYW (SEQ ID NO: 4); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IYPGSDT (SEQ ID NO: 6); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARQDITGTTGFDY (SEQ ID NO: 8); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFSSYA (SEQ ID NO: 20); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ISYDGSNK (SEQ ID NO: 22); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: AKERLFGVVSYYGMDV (SEQ ID NO: 24); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GGSISSSYY (SEQ ID NO: 36); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IYYSGST (SEQ ID NO: 38); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARQDREALFDY (SEQ ID NO: 40); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFRFDDYA (SEQ ID NO: 52); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: I NWNSGGK (SEQ ID NO: 54); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: A KDRGI-AARLLSRDAFDM (SEQ ID NO: 56); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: SFTFSSYG (SEQ ID NO: 68); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ISYDGSNK (SEQ ID NO: 70); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: AREVRRYYYYGMD

V (SEQ ID NO: 72); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GF T F D D Y A (SEQ ID NO: 84); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ISWNSGDI (SEQ ID NO: 86); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: AKDTLSGTGTTWYYFDY (SEQ ID NO: 88); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFSSYG (SEQ ID NO: 100); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ISYDGSNK (SEQ ID NO: 102); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: AQDGSSAIYFYGMDV (SEQ ID NO: 104); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFSSYG (SEQ ID NO: 116); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IWYDGSNK (SEQ ID NO: 118); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARGEHYYGSGPFDP (SEQ ID NO: 120); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GGSISSFG

YY (SEQ ID NO: 132); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IYYSGSI (SEQ ID NO: 134); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARERDYGDFDY (SEQ ID NO: 136); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFSSYG (SEQ ID NO: 148); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IWYDGSNK (SEQ ID NO: 150); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARDQDYGSGSSYGMDV (SEQ ID NO: 152); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFT

FSTYG (SEQ ID NO: 164); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IWYD-GTNK (SEQ ID NO: 166); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARDPSGG-DHYYYYGMDV (SEQ ID NO: 168); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFSSYG (SEQ ID NO: 180); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ISFDERNK (SEQ ID NO: 182); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ASEVGYSFGH DAFDI (SEQ ID NO: 184); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFNYYA (SEQ ID NO: 196); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ISGSGDST (SEQ ID NO: 198); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: AKDQGLYYYGSGSFDY (SEQ ID NO: 200); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFAFSDSA (SEQ ID NO: 212); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IRNKANRFAT (SEQ ID NO: 214); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARHGHDLTTEGYGMDV (SEQ ID NO: 216); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GGTFSSYT (SEQ ID NO: 228); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IPLYGTA (SEQ ID NO: 230); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ASTLELRAFDAFDI (SEQ ID NO: 232); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GGSISSGGYY (SEQ ID NO: 236); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IYYSGST (SEQ ID NO: 238); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARAPPYNWFDY (SEQ ID NO: 240); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFSDYY (SEQ ID NO: 244); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ISNSGNTQ (SEQ ID NO: 246); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: TREGLEYSSSEPFYD (SEQ ID NO: 248); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GYTFTAYY (SEQ ID NO: 252); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: INPNNGDT (SEQ ID NO: 254); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARDDLAAAGIGWFDS (SEQ ID NO: 256); или CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFDDYA (SEQ ID NO: 260); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ISWNSESI (SEQ ID NO: 262); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность:









тельность: FDPEHGKI (SEQ ID NO: 326); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ATFFYNWNSYYFGMDV (SEQ ID NO: 328); и варибельную область легкой цепи иммуноглобулина, которая содержит: CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 308); CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 310); и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 312); (27) варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GFTFSSYA (SEQ ID NO: 332); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: VSGSADIT (SEQ ID NO: 334); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: AKDKVYNWNYGIYYGMDV (SEQ ID NO: 336); и варибельную область легкой цепи иммуноглобулина, которая содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 308); CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 310); и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 312); (28) варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит: CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: GGSISSSYY (SEQ ID NO: 340); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: IYYSGST (SEQ ID NO: 342); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARQGRWERENFDY (SEQ ID NO: 344); и варибельную область легкой цепи иммуноглобулина, которая содержит CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 308); CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 310); и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 312); и/или (29) варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность: DESFSDYY (SEQ ID NO: 348); CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность: ITHSGST (SEQ ID NO: 350); и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность: ARGGDYGLLDY (SEQ ID NO: 352); и варибельную область легкой цепи иммуноглобулина, которая содержит: CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность: QSVSSSY (SEQ ID NO: 308); CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность: GAS (SEQ ID NO: 310); и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 312). Например, в варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит (а) тяжелую цепь иммуноглобулина, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354; и/или (b) легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306. В варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок является мультиспецифическим (например, биспецифическим, мультипаратопным или бипаратопным).

В варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) включает одно или несколько из следующих свойств: подавляет рост *Plasmodium falciparum* в эритроцитах человека; подавляет рост штаммов D10, Dd2, 7G8, W2-mef, 3D7, HB3, FCR-1/FVO, Cam3.11 или RF7 *Plasmodium falciparum* в эритроцитах человека; блокирует связывание полипептида PfRH5 с полипептидом базигином; например, в концентрации около 6,67 микро-моль вызывает максимальное подавление роста (например, *in vitro*) *Plasmodium falciparum* (например, штамм FCR-1/FVO) в инактивированной нагреванием сыворотке крови человека или обезьяны *Aotus* (например, при измерении по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита), которое на около 1-10% (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10%) (по сравнению с неинфицированными эритроцитами) выше, чем в неинактивированной нагреванием сыворотке крови человека или обезьяны *Aotus*, соответственно; при воздействии указанного антигенсвязывающего белка не вызывает мутации PfRH5 в *Plasmodium falciparum* (например, штамме 3D7), например, *in vitro* после около 45 суток постепенного увеличения концентрации антител, например, от около 1XEC<sub>50</sub> до около 110XEC<sub>50</sub>; и/или связывается с PfRH5, не содержащим аминоконцевые остатки M1-Y139 и включающим остатки K140-Q526, но не содержащим K247-L295 и имеющим, например, мутации T216A и T299A, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность данным документе.

Данное изобретение также включает комплекс, содержащий антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), связанный с полипептидом ретикулоцитсвязывающим белком-гомологом 5 *Plasmodium falciparum* (PfRH5). Например, PfRH5 находится на поверхности клетки, такой как *Plasmodium falciparum* (например, мерозоитов *Plasmodium falciparum*), например, в организме субъекта (например, человека). В одном варианте осуществления данного изобретения PfRH5 находится на поверхности *Plasmodium falciparum*, например, мерозоите в эритроците.

В данном изобретении также представлен способ получения анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), изложенного в данном документе, или его иммуноглобулиновой цепи, включающей: (а) введение одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих иммуноглобулиновую цепь указанного антигенсвязывающего белка в клетку-хозяина (например, клетку яичника китайского хомячка); (b) культивирование клетки-хозяина в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида; и (с) необязательно выделение антигенсвязывающего белка или

иммуноглобулиновой цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой клетка-хозяин выращивается. Антигенсвязывающий белок или иммуноглобулиновая цепь, которые являются продуктом такого способа, также составляют часть данного изобретения.

Тест-полоска на наличие антигенов для иммунохроматографического анализа, содержащая антигенсвязывающий белок анти-PfRH5, изложенный в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), является частью данного изобретения. Способы обнаружения *Plasmodium falciparum* в образце крови от субъекта и/или из организма субъекта с использованием тест-полоски также являются частью данного изобретения.

Полипептид, содержащий: (а) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина иммуноглобулиновой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354; или (б) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 варибельной области легкой цепи иммуноглобулина иммуноглобулиновой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306 также являются частью данного изобретения. Полинуклеотиды (например, ДНК или РНК), кодирующие такой полипептид, также являются частью данного изобретения вместе с вектором, который содержит полинуклеотид.

В данном изобретении также представлена клетка-хозяин (например, клетка яичника китайского хомячка), содержащая антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) или иммуноглобулиновую цепь, или полипептид, или полинуклеотид, или вектор, которые изложены в данном документе.

В данном изобретении также представлена композиция или набор, которые содержат один или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) анти-PfRH5 антигенсвязывающих белков (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), изложенных в данном документе, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом (например, противопаразитарным препаратом, хлорохином, атоваквоном, прогванилом, артемизинином, люмефантрином, мефлохином, хинином, хинидином, доксициклином (необязательно в комбинации с хинином), клиндамицином, вакциной, противомаларийной вакциной или RTS, S/AS01). В данном изобретении также представлена фармацевтическая композиция, содержащая анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок, изложенный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель и необязательно дополнительный терапевтический агент.

В данном изобретении также представлен сосуд или инъекционное устройство (например, автоинъектор или предварительно заполненный шприц), содержащие анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) или композицию (например, фармацевтическую композицию), изложенные в данном документе.

В данном изобретении представлен способ лечения или профилактики инфекции *Plasmodium falciparum* (например, малярии) у субъекта (например, человека), нуждающегося в этом, включающий введение (например, парентерально) терапевтически эффективного количества анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, обсуждаемого в данном документе, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом. В варианте изобретения субъекта диагностируют как страдающего инфекцией *Plasmodium falciparum* (например, малярией), до начала лечения. Например, в варианте осуществления данного изобретения субъекта диагностируют с помощью тест-полоски для хроматографического анализа, как изложено в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения субъект не инфицирован *Plasmodium falciparum*, но ему вводят терапевтически эффективное количество анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка профилактически, т.е. для предупреждения такой инфекции.

В данном изобретении также представлен способ диагностики инфекции *Plasmodium falciparum* у субъекта, включающий приведение в контакт анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка по данному изобретению с образцом (например, кровью) от указанного субъекта и, если комплекс между антигенсвязывающим белком и полипептидом PfRH5 в образце обнаруживают, определение, что субъект инфицирован *Plasmodium falciparum*. Например, указанный комплекс может быть образован на тест-полоске для хроматографического анализа, как изложено в данном документе, содержащей анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок по данному изобретению и полипептид PfRH5 (из образца субъекта).

В данном изобретении представлен способ введения анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), изложенного в данном документе, в организм субъекта (например, человека), включающий инъекцию антигенсвязывающего белка в организм субъекта, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом, например, подкожно, внутривенно или внутримышечно.

Данное изобретение также охватывает любой полипептид или полинуклеотид иммуноглобулина, изложенный в данном документе, например, содержащий любую аминокислотную последовательность члена, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248,

250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 и 360; или полинуклеотид, содержащий любую нуклеотидную последовательность члене, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357 и 359.

#### **Краткое описание графических материалов**

На чертеже изображено выравнивание последовательностей PfRH5, соответствующих каждому PfRH5-специфическому антителу, через 45 дней после постепенного увеличения давления антитела (от  $1 \times EC_{50}$  до  $110 \times EC_{50}$ ).

#### **Подробное описание сущности изобретения**

*Plasmodium falciparum* представляет собой простейшего паразита, одного из видов *Plasmodium*, которые вызывают малярию у людей, которая может передаваться самками комара *Anopheles*. Малярия, вызываемая этим видом (которую можно назвать "злокачественной трехдневной малярией"), представляет собой очень опасную форму малярии с высоким уровнем осложнений и смертности. См., например, Gardner et al., Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, Nature 419(6906): 498-511 (2002). *Plasmodium falciparum* включает любой его штамм, который проявляет чувствительность к антигенсвязывающему белку по данному изобретению, например, D10, Dd2, 7G8, W2-mef, 3D7, HB3, FCR-1/FVO, Cam3.П или RF7. "Инфекция *Plasmodium falciparum*" относится к инвазии и размножению *Plasmodium falciparum* в организме субъекта. В данном изобретении представлены различные антигенсвязывающие белки, которые являются эффективными для лечения или профилактики инфекции *Plasmodium falciparum*.

Анти-PfRH5 "антигенсвязывающий белок" представляет собой отдельный полипептид (например, ScFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент)) или комплекс из более чем одного полипептида (например, тетрамерное антитело IgG), который специфически связывается с полипептидом PfRH5, например, анти-PfRH5 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вне зависимости от того, являются ли они моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими), моновалентными или мультивалентными (например, бивалентными). Моновалентный антигенсвязывающий белок имеет один антигенсвязывающий домен, в то время как бивалентный антигенсвязывающий белок имеет два антигенсвязывающих домена.

Базигин (BSG, индуктор металлопротеиназы внеклеточного матрикса, EMMPRIN, CD147) представляет собой полипептид, который представляет собой мишень на эритроцитах, с которой связывается PfRH5. В варианте осуществления данного изобретения аминокислотная последовательность базигина изложена под номером доступа Uniprot Q54A51. См., например, Crosnier et al, Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*, Nature. 2011 Nov 9; 480(7378):534-7. В одном варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок по данному изобретению блокирует связывание между PfRH5 и BSG.

#### **Ретикулоцитсвязывающий белок-гомолог 5 *Plasmodium falciparum* (PfRH5)**

Ретикулоцитсвязывающий белок-гомолог 5 *Plasmodium falciparum* (PfRH5) является членом суперсемейства лигандов эритроцитов, называемых ретикулоцитсвязывающими подобными белками (RBL). Данные свидетельствуют о том, что PfRH5 необходим для распространения инфекции *Plasmodium falciparum* на стадии в кровеносном русле. PfRH5 связывает эритроциты и участвует в видовом тропизме при инвазии эритроцитов. См., например, Bustamante et al., Vaccine. 2013 Jan 2; 31(2):373-379.

В варианте осуществления данного изобретения PfRH5 содержит аминокислотную последовательность:

MIRIKKKLIL TIIYIHLFIL NRLSFENAIK KTKNQENNL LLLPIKSTEE KDDIKNGKDI  
 KKEIDNDKEN IKTNNAKDHS TYIKSYLNTN VNDGLKYLF PSHNSFIKKY  
 SVFNQINDGM  
 LLNEKNDVKN NEDYKNVDYK NVNFLQYHFK ELSNYNIANS IDILQEKEGH  
 LDFVIIPHYT  
 FLDYYKHLSY NSIYHKSSTY GKCIAVDAFI KKinETYDKV KSKCNDIKND  
 LIATIKKLEH  
 PYDINKNDD SYRYDISEEI DDKSEETDDE TEEVEDSIQD TDSNHTPSNK  
 KKNDLMNRTF  
 KKMMDEYNTK KKKLIKCIKN HENDFNKICM DMKNYGTNLF EQLSCYNNNF  
 CNTNGIRYHY  
 DEYIHKLILS VKSKNLNKDL SDMTNILQQS ELLLTNLNKK MGSYIYIDTI  
 KFIHKEMKHI  
 FNRIEYHTKI INDKTKIIQD KIKLNIWRTF QKDELLKRIL DMSNEYSLFI TSDHLRQMLY  
 NTFYSKEKHL NNIFHHLIYV LQMKFNDVPI KMEYFQTYKK NKPLTQ

(SEQ ID NO: 361)

Полипептид "PfRH5ΔNL.6his" (PfRH5 (K140-Q526; del M1-Y139; del K247-L295; T216A; T299A)), в котором отсутствуют N-концевые остатки 1-139 и остатки 247-295 и имеются мутации T216A и T299A, а также C-концевая метка His<sub>6</sub>, является частью данного изобретения совместно с полинуклеотидами, кодирующими полипептид. В варианте изобретения полипептид PfRH5ΔNL.6his содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362:

KNVNFLQYHFKELSNYNIANSIDILQEKEGHLDVFIIPHYTFLDYYKHLSSYNSIYH  
 KSSTYGKYIAVDAFIKKINEAYDKVSKCNDIKNDLIATIKKLEHPYDINNMRFAFKKM  
 MDEYNTKKKKLIKCIKNHENDFNKICMDMKNYGTNLFQQLSCYNNNF CNTNGIRYHYD  
 EYIHKLILSVKSKNLNKDLSDMTNILQSQSELLLTNLNKKMGSIYIYIDTIKFIHKEMKHI  
 RIEYHTKI INDKTKIIQDKIKLNIWRTFQKDELLKRILDMSNEYSLFI TSDHLRQMLYNTFY  
 SKEKHLNNIFHHLIYV LQMKFNDVPIKMEYFQTYKKNKPLTQNNNNNN

В варианте осуществления данного изобретения полипептид находится в кристаллизованной форме или в некристаллизованной форме.

#### Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

В данном изобретении представлены антигенсвязывающие белки, такие как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком PfRH5 или его антигенным фрагментом. Иммуноглобулиновые цепи по данному изобретению описаны в данном документе в примере 1 в табл. 1-1.

Термин "антитело", используемый в данном документе, относится к иммуноглобулиновым молекулам, содержащим четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), соединенные между собой дисульфидными связями (т.е., "молекулы полноразмерных антител"), а также их мультимерам (например, IgM), например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2; или H1H29215P2. Каждая тяжелая цепь (HC) содержит переменную область тяжелой цепи ("HCVR" или "V<sub>H</sub>") (например, SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354) и константную область тяжелой цепи (состоящую из доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). Каждая легкая цепь (LC) состоит из переменной области легкой цепи ("LCVR или V<sub>L</sub>") (например, SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306) и константной области легкой цепи (CL). V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые разделены областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> содержит три CDR и четыре FR, расположенные от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) являются идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественно или искусственно модифицированы.

В типичном случае переменные домены как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина содержат три гипервариабельные области, также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), расположенные внутри относительно консервативных каркасных областей (FR). Как правило, от N-конца до C-конца переменные домены как легкой, так и тяжелой цепей содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В варианте осуществления данного изобретения назначение аминокислот каждому домену соответствует определениям Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5<sup>th</sup> ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 or Chothia, et al., (1989) Nature 342:878-883.

В данном изобретении представлены моноклональные анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также моноклональные композиции, содержащие множество выделенных моноклональных антигенсвязывающих белков. Термин "моноклональное антитело", используемый в данном документе, относится к популяции по сути гомогенных антител, т.е., молекулы антитела, составляющие популяцию, являются идентичными по аминокислотной последовательности, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. "Множество" таких моноклональных антител и фрагментов в композиции относится к концентрации идентичных (т.е., как обсуждалось выше, по аминокислотной последовательности, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах) антител и фрагментов, которое выше того, которое обычно встречается в природе, например, в крови организма-хозяина, такого как мышь или человек.

В варианте осуществления данного изобретения анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержит константный домен тяжелой цепи, например, типа IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) или IgM. В варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержит константный домен легкой цепи, например, типа каппа или лямбда.

Термин "человеческий" антигенсвязывающий белок, такой как антитело или антигенсвязывающий фрагмент, используемый в данном документе, включает антитела и фрагменты, имеющие вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека, будь то в клетке человека или привитые в отличную от человеческой клетку, например, клетку мыши. См., например, US 8502018, US 6596541 или US 5789215. Человеческие моноклональные антитела (mAb) по данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. В то же время термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, не предполагает включение mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты к FR последовательностям человека. Указанный термин включает антитела, рекомбинантно продуцируемые в млекопитающем, отличном от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Указанный термин не предназначен для включения антител, выделенных или созданных у субъекта-человека.

Данное изобретение включает анти-PfRH5 химерные антигенсвязывающие белки, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, и способы их применения. Используемый в данном документе термин "химерное антитело" представляет собой антитело, имеющее вариабельный домен первого антитела и константный домен второго антитела, где первое и второе антитела относятся к разным видам, (см., например, US4816567; и Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855).

Термин "рекомбинантные" антигенсвязывающие белки, такие как антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относится к таким молекулам, созданным, экспрессируемым, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в данной области техники, такой, как технология рекомбинантных ДНК, которая включает, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин включает антитела, экспрессируемые в организме млекопитающих, отличных от человека (в том числе трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например, трансгенных мышей), или в клеточной (например, клетки CHO) экспрессионной системе, или выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

Рекомбинантные анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, раскрываемые в данном документе, также могут быть получены в экспрессионной системе *E. coli*/T7'. В этом варианте осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуноглобулиновые молекулы анти-PfRH5 антител по данному изобретению (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2 или H1H29215P2), могут быть вставлены в плазмиду на основе pET и экспрессированы в системе *E. coli*/T7'. Например, данное изобретение включает способы экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его иммуноглобулиновой цепи в клетке-хозяине (например, бактериальной клетке-хозяине, такой как *E. coli*, такой как BL21 или BL21DE3), включающие экспрессию РНК-полимеразы T7 в клетке, которая также содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноглобулиновую цепь, которая функционально связана с промотором T7. Например, в варианте осуществления данного изобретения бактериальная клетка-хозяин, такая как *E. coli*, содержит полинуклеотид, кодирующий ген РНК-полимеразы T7, функционально связанный с промотором *lac*, и экспрессия полимеразы и цепи индуцируется инкубацией клетки-хозяина с IPTG (изопропил-бета-D-тиогаляктопиранозидом). См. US4952496 и US5693489 или Studier & Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 1986 May

5;189(1): 113-30.

Существует несколько способов получения рекомбинантных антител, которые известны в данной области техники. Один пример способа рекомбинантного получения антител раскрыт в US 4816567.

Трансформация может осуществляться любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают опосредованную декстраном трансфекцию, преципитацию фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида (полинуклеотидов) в липосомы, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторами. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 4399216; 4912040; 4740461 и 4959455.

Полинуклеотиды, кодирующие иммуноглобулины, изложенные в данном документе (например, содержащие нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357 и 359), которые находятся в векторе и/или функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии, такой как промотор, составляют часть данного изобретения. Промотор может представлять собой, например, промотор CMV (например, основной немедленно-ранний промотор (MIE) цитомегаловируса человека (CMV) или промотор CMV мыши) или промотор SV40 (например, ранний промотор SV40). Вектор может представлять собой плазмиду (например, кольцевую плазмиду или линейаризованную плазмиду) или вирусный вектор, который может эктопически поддерживаться в клетке-хозяине или интегрироваться в хромосому хозяина. Такие клетки-хозяева составляют часть данного изобретения.

Полинуклеотид является "функционально связанным", когда он находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. Как правило, хотя и не всегда, "функционально связанный" означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторной лидерной последовательности, смежными и находятся в фазе считывания. В то же время, энхансеры не обязательно должны быть смежными.

Таким образом, данное изобретение включает рекомбинантные способы получения анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, такого как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению, или его иммуноглобулиновую цепь, включающие (i) введение одного или нескольких полинуклеотидов (например, в том числе нуклеотидной последовательности в любой одной или нескольких из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 145, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273, 281, 289, 297, 305, 313, 321, 329, 337, 345 и/или 353), кодирующих легкие и/или тяжелые иммуноглобулиновые цепи антигенсвязывающего белка, например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2 или H1H29215P2, например, где полинуклеотид находится в векторе; и/или интегрирован в хромосому клетки-хозяина и/или функционально связан с промотором; (ii) культивирование клетки-хозяина (например, CHO или Pichia или Pichia pastoris) в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида, и (iii) необязательно выделение антигенсвязывающего белка (например, антитела или фрагмента) или цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой выращивается клетка-хозяин. При создании антигенсвязывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента), содержащего более одной иммуноглобулиновой цепи, например, антитела, которое содержит две тяжелые иммуноглобулиновые цепи и две легкие иммуноглобулиновые цепи, коэкспрессия цепей в одной клетке-хозяине приводит к ассоциации цепей, например, в клетке или на поверхности клетки или вне клетки, если такие цепи секретируются таким образом, чтобы образовать антигенсвязывающий белок (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент). Способы по данному изобретению включают в себя таковые, в которых в клетке экспрессируется только тяжелая цепь иммуноглобулина или только легкая цепь иммуноглобулина (например, любая из обсуждаемых в данном документе, в том числе зрелые фрагменты и/или их переменные домены). Такие одиночные цепи пригодны, например, в качестве посредников при экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который содержит такую цепь. Например, данное изобретение также включает анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, такие как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие иммуноглобулин тяжелой цепи (или его переменный домен или содержащие

его CDR), кодируемый полинуклеотидом, содержащим нуклеотидные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273, 281, 289, 297, 313, 321, 329, 337, 345 или 353, и иммуноглобулин легкой цепи (или его варибельный домен или содержащие его CDR), кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217 или 305, которые являются продуктом таких способов получения, и необязательно, способов очистки, изложенных в данном документе. Например, в варианте осуществления данного изобретения продукт способа представляет собой анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок, который представляет собой антитело или фрагмент, содержащий  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354, и  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306.

В варианте осуществления данного изобретения способ создания анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включает в себя способ очистки антигенсвязывающего белка, например, с помощью колоночной хроматографии, преципитации, и/или фильтрации. Продукт такого способа также составляет часть настоящего изобретения.

Эукариотические и прокариотические клетки-хозяева, в том числе клетки млекопитающих, можно использовать в качестве хозяев для экспрессии анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента). Такие клетки-хозяева хорошо известны в данной области техники, и многие из них доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Эти клетки-хозяева включают, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO, SP2, клетки HeLa, клетки почек детенышей хомячка (ВНК), клетки почек обезьян (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3, клетки HEK-293 и ряд других клеточных линий. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, крупного рогатого скота, лошади и хомяка. Другие линии клеток, которые можно использовать, представляют собой линии клеток насекомых (например, *Spodoptera frugiperda* или *Trichoplusia ni*), клетки амфибий, бактериальные клетки, клетки растений и клетки грибов. Клетки грибов включают в себя клетки дрожжевых и нитчатых грибов, в том числе, например, *Pichia*, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia piiperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenulapolyomorpha*, *Kluveromyces sp.*, *Kluveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrelapatens* и *Neurospora crassa*. Данное изобретение включает выделенную клетку-хозяина (например, клетку CHO), содержащую антигенсвязывающий белок, такой как H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2 или H1H29215P2; или один или несколько полинуклеотидов, кодирующих иммуноглобулиновую цепь или его цепи.

Данное изобретение также включает в себя клетку *Plasmodium falciparum*, которая экспрессирует PfRH5, который связывается антигенсвязывающим белком по данному изобретению, например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2 или H1H29215P2, например, где клетка находится в организме субъекта или находится *in vitro*.

Термин "специфически связывается" относится к тем антигенсвязывающим белкам (например, mAb), имеющим аффинность связывания с антигеном, таким как белок PfRH5 (например, PfRH5 $\Delta$ NL.6his), выражаемую в виде  $K_D$ , по меньшей мере, около  $10^{-8}$  М (например, любую  $K_D$  указанную в табл. 5-1 или 5-2 в данном документе), как измеряется в анализе безмаркерной биослойной интерферометрии в реальном времени, например, при 25°C или 37°C, например, с помощью биосенсора Octet® HTX, или с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или с помощью ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа). Данное изобретение включает в себя антигенсвязывающие белки, которые специфически связываются с белком PfRH5. В варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок имеет  $K_a$ ,  $K_d$  и/или  $t_{1/2}$ , как изложено в табл. 5-1 или 5-2 в данном документе.

Термины "антигенсвязывающая часть антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент антитела" и т.п., используемые в данном документе, включают в себя любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин,

который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) P(ab')<sub>2</sub>-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) пептиды с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4 (например, содержащие FR3, FR4 и CDR-H3 или CDR-L3, как изложено в данном документе). Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфичное антитела, однодоменные антитела, доменно-делеционные антитела, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела и малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", как используется в данном документе. В варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий фрагмент содержит три или более CDR из H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2; или H1H29215P2 (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3; и/или CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3).

В варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V<sub>H</sub>-домен, ассоциированный с V<sub>L</sub>-доменом, V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-домены могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем взаиморасположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать V<sub>H</sub> - V<sub>H</sub>-, V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>- или V<sub>L</sub> - V<sub>L</sub>-димеры. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V<sub>H</sub>- или V<sub>L</sub>-домен.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по данному изобретению, включают: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; и (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть или непосредственно связаны друг с другом, или могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными V<sub>H</sub>- или V<sub>L</sub>-доменами (например, с помощью дисульфидной (дисульфидных) связи (связей)).

Антигенсвязывающие белки (например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты) могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антигенсвязывающие белки обсуждаются в данном документе дополнительно.

В варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающие белки по данному изобретению (например, антитело или фрагмент антитела) могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как терапевтический фрагмент ("иммуноконъюгат"), таким как противомаларийный препарат, второе анти-PfRH5 антитело или любой другой терапевтический фрагмент, пригодный для лечения инфекции *Plasmodium falciparum* (См., например, ниже).

Данное изобретение также относится к комплексу, содержащему анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обсуждаемый в данном документе, в комплексе с полипептидом PfRH5 или его антигенным фрагментом и/или с вторичным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, детектируемое меченое вторичное антитело), которое специфически связывается с анти-PfRH5 антителом или фрагментом. В варианте осуществления данного изобретения комплекс находится *in vitro* (например, иммобилизован на твердом субстрате) или находится в организме субъекта. В варианте осуществления данного изобретения PfRH5 иммобилизован на твердом субстрате (например, тест-полоске для хроматографического анализа) или находится на поверхности клетки, такой как *Plasmodium falciparum*. Иммобилизованные анти-PfRH5 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ковалентно связаны с нерастворимым матричным материалом (например, стеклом или полисахаридом, таким как агароза или сефароза, например, их гранулой или другой частицей), также являются частью данного изобретения; при этом необязательно, где иммобилизованное антитело образует комплекс с PfRH5 или его антигенным фрагментом или вторичным антителом или его фрагментом.

"Выделенные" антигенсвязывающие белки (например, антитела или их антигенсвязывающие фраг-

менты), полипептиды, полинуклеотиды и векторы, по меньшей мере, частично не содержат других биологических молекул из клеток или клеточной культуры, из которых они получены. Такие биологические молекулы включают нуклеиновые кислоты, белки, другие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, липиды, углеводы или другой материал, такой как продукты распада клеток и среду для роста. Выделенный антигенсвязывающий белок может, кроме того, по меньшей мере частично не содержать компонентов экспрессионной системы, таких как биологические молекулы из клетки-хозяина или ее среды для роста. Как правило, термин "выделенный" не предназначен для обозначения полного отсутствия таких биологических молекул или отсутствия воды, буферов или солей, или компонентов фармацевтического состава, который содержит антигенсвязывающие белки (например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты).

Данное изобретение включает антигенсвязывающие белки, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и антигенсвязывающий белок по данному изобретению (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2 или H1H29215P2). Например, данное изобретение включает антигенсвязывающие белки, которые связываются с эпитопом варианта PfRH5 (например, PfRH5ANL.6his), не имеющим аминокислот M1-Y139 и содержащим остатки K140-Q526, но не содержащим K247-L295 и имеющим мутации T216A и T299A (необязательно в том числе метку HisX6).

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте (например, на полипептиде PfRH5), которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом антигенсвязывающего белка, например, вариабельной областью молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с различными участками антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Термин "эпитоп" может также относиться к сайту на антигене, на который отвечают В- и/или Т-клетки, и/или к участку антигена, который связывается антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подмножество структурных эпитопов и имеют те остатки, которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, т.е., состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахара, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в некоторых вариантах осуществления, могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или характеристики удельного заряда.

Способы определения эпитопа антигенсвязывающего белка, например, антитела или фрагмента или полипептида, включают сканирующий аланиновый мутационный анализ, анализ пептидов блотом (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования ЯМР-анализ. Кроме того, могут применяться такие способы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9:487-496). Другим способом, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антигенсвязывающий белок (например, антитело или фрагмент, или полипептид), является водород/дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии (См., например, Ehrling (1999) *Analytical Biochemistry* 267:252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A).

Данное изобретение включает антигенсвязывающие белки, которые конкурируют за связывание с PfRH5, например, эпитопом варианта PfRH5, как обсуждается в данном документе, с антигенсвязывающим белком по данному изобретению, например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2 или H1H29215P2. Термин "конкурирует", используемый в данном документе, относится к антигенсвязывающему белку (например, антителу или его антигенсвязывающему фрагменту), который связывается с антигеном (например, PfRH5 или PfRH5ANL.6his) и подавляет или блокирует связывание другого антигенсвязывающего белка (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) с антигеном. Термин также включает конкуренцию между двумя антигенсвязывающими белками, например, антителами в обеих ориентациях, т.е., первым антителом, которое связывает и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело) и второй антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело) могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первый и второй антигенсвязывающие белки (например, антитела) могут связываться с разными, но, например, перекрывающимися эпитопами, при этом связывание одного из них подавляет или блокирует связывание второго антитела, например, посредством стерического препятствия. Конкуренцию между

антигенсвязывающими белками (например, антителами) можно измерить способами, известными в данной области техники, например, путем безмаркерной биослойной интерферометрии в реальном времени. В варианте осуществления данного изобретения конкуренция между первым и вторым анти-PfRH5 антигенсвязывающим белком (например, антителом) определяется путем измерения способности иммобилизованного первого анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка (например, антитела) (изначально не образующего комплекс с белком PfRH5) связываться с белком PfRH5 или его фрагментом, образующим комплекс со вторым анти-PfRH5 антигенсвязывающим белком (например, антителом). Снижение способности первого анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка (например, антитела) связываться с образующим комплекс белком PfRH5 по сравнению с не образующим комплекс белком PfRH5 указывает на то, что первый и второй анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки (например, антитела) конкурируют. Степень конкуренции может быть выражена в виде процента уменьшения связывания. Такую конкуренцию можно измерить путем безмаркерной биослойной интерферометрии в реальном времени, например, на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.), посредством ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа) или SPR (поверхностного плазмонного резонанса).

Конкуренция за связывание между анти-PfRH5 антигенсвязывающими белками (например, моноклональными антителами (mAb)) может быть определена путем безмаркерной биослойной интерферометрии в реальном времени на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Например, чтобы определить конкуренцию между двумя анти-PfRH5 моноклональными антителами, анти-PfRH5 mAb можно сначала захватить на кончики биосенсора Octet, покрытые анти-hFc антителами (Pall ForteBio Corp., № 18-5060), погрузив кончики в раствор анти-PfRH5 mAb (далее обозначаемого "mAb1"). В качестве положительного контроля для блокирования кончики биосенсора, захваченные антителом, затем можно насытить известным блокирующим изотипическим контрольным mAb (впоследствии обозначаемым "блокирующее mAb") путем погружения в раствор блокирующего mAb. Для определения того, конкурирует ли mAb2 с mAb1, кончики биосенсора затем можно погрузить в образующий комплекс раствор полипептида PfRH5 и второго анти-PfRH5 mAb (впоследствии обозначаемого "mAb2"), которые предварительно инкубировали в течение некоторого времени, и можно определить связывание mAb1 с полипептидом PfRH5. Кончики биосенсора можно промывать в буфере между каждой стадией эксперимента. Реакцию связывания в реальном времени можно контролировать в течение эксперимента, а ответ при связывании можно фиксировать в конце каждой стадии.

В варианте осуществления данного изобретения конкурентный анализ проводят на платформе биосенсора (например, Octet HTX), где одно антитело связывается/образует комплекс с полипептидом PfRH5, который был связан с кончиком сенсора, и затем оценивают связывание второго антитела с PfRH5. Можно оценивать способность второго антитела связываться с предварительно образующим комплекс полипептидом PfRH5, и, если обнаружено снижение связывания (например, по сравнению с PfRH5, не образующим комплекс с первым антителом) или отсутствие связывания второго антитела, то определяют, что первое и второе антитела конкурируют за связывание полипептида PfRH5. В варианте осуществления данного изобретения анализ проводят при 25°C и pH около 7, например 7,4, например, в присутствии буфера (например, HEPES), соли (например, NaCl), EDTA, поверхностно-активного вещества (например, Tween-20) и/или неспецифического белка (например, бычьего сывороточного альбумина). В одном из вариантов данного изобретения связывание с вариантом PfRH5 (например, PfRH5 $\Delta$ NL.6his) оценивается в конкурентном анализе, например, где вариант представляет собой PfRH5, не имеющий аминокислот M1-Y139 и содержащий остатки K140-Q526, но не имеющий K247-L295 и имеющий мутации T216A и T299A (необязательно в том числе метку HisX6). Метка HisX6 или His<sub>6</sub> представляет собой метку, которая содержит HHHHHH (SEQ ID NO: 365).

В типичном случае антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению, который модифицирован каким-либо образом, сохраняет способность специфически связываться с PfRH5, например, сохраняет по меньшей мере 10% своей связывающей активности в отношении PfRH5 (по сравнению с исходным антителом), если эта активность выражается на молярной основе. Предпочтительно антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению сохраняет по меньшей мере 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% или более аффинности связывания в отношении PfRH5 от исходного антитела. Также предполагается, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены (обозначаемые "консервативными вариантами" или "функционально консервативными вариантами" антитела), которые по сути не изменяют его биологическую активность.

Анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки по данному изобретению могут содержать варианты иммуноглобулиновых цепей, аминокислотные и нуклеотидные последовательности которых конкретно изложены в данном документе.

"Вариант" полипептида, такой как иммуноглобулиновая цепь (например, V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, HC или LC H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2;

H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2; или H1H29215P2) относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70-99,9% (например, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) идентична или аналогична упомянутой аминокислотной последовательности, которая изложена в данном документе (например, SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346, 354, 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306); если сравнение выполняется с помощью алгоритма BLAST, в котором параметры алгоритма выбираются так, чтобы получить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, ожидаемое пороговое значение: 10; размер слова: 3; максимальное совпадение в диапазоне запроса: 0; матрица BLOSUM 62; штрафы за гэпы: наличие 11, продление 1; условная корректировка матрицы композиционных вкладов).

"Вариант" полинуклеотида относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 70-99,9% (например, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) идентична упомянутой нуклеотидной последовательности, которая изложена в данном документе (например, SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273, 281, 289, 297, 313, 321, 329, 337, 345, 353, 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217 или 305); если сравнение выполняется с помощью алгоритма BLAST, в котором параметры алгоритма выбираются так, чтобы получить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, ожидаемое пороговое значение: 10; размер слова: 28; максимальное совпадение в диапазоне запроса: 0; оценка соответствия/несоответствия: 1, -2; штрафы за разрыв: линейные).

Анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению, в варианте осуществления данного изобретения содержат переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую по меньшей мере 70% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи иммуноглобулина, аминокислотная последовательность которой изложена в данном документе, например, в SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354; и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую по меньшей мере 70% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) идентичность аминокислотной последовательности с легкой цепью иммуноглобулина, аминокислотная последовательность которой изложена в данном документе, например, в SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306.

Кроме того, анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок по данному изобретению может включать полипептид иммуноглобулина варианта, содержащий аминокислотную последовательность, которая изложена в данном документе, за исключением одной или нескольких (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) мутаций, таких как, например, миссенс-мутации (например, консервативные замены), бессмысловые мутации, делеции или вставки. Например, данное изобретение включает антигенсвязывающие белки, которые включают вариант легкой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218 или 306, но имеющий одну или несколько таких мутаций и/или вариант тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 314, 322, 330, 338, 346 или 354, но имеющий одну или несколько таких мутаций. В варианте осуществления данного изобретения анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок содержит вариант легкой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где одна или несколько (например, 1, 2 или 3) таких CDR имеют одну или несколько таких мутаций (например, консервативные замены) по сравнению с последовательностью, которая конкретно изложена в данном документе, и/или вариант тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где одна или несколько (например, 1 или 2 или 3) таких CDR имеют одну или несколько таких мутаций (например, консервативные замены) по сравнению с последовательностью, которая конкретно изложена в данном документе.

В данном изобретении также представлены анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки вариантов, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие один или несколько CDR вариантов (например, любую одну или несколько из CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3), которые изложены в данном документе, с по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% идентичностью или сходством последовательности с ними.

Варианты осуществления данного изобретения также включают анти-PfRH5 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат  $V_H$  и  $V_L$  вариантов иммуноглобулина; или HC и LC, которые содержат аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) общую идентичность или сходство аминокислотной последовательности с аминокислотными последовательностями, соответствующими  $V_H$ ,  $V_L$ , HC или LC, конкретно изложенные в

данном документе, однако где CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 таких иммуноглобулинов не являются вариантами и содержат аминокислотные последовательности, изложенные в данном документе. Таким образом, в таких вариантах осуществления CDR в таких антигенсвязывающих белках сами по себе не являются вариантами.

"Консервативно модифицированный вариант" или "консервативная замена" относится к варианту, в котором имеется одна или несколько замен аминокислот в полипептиде другими аминокислотами, имеющими аналогичные характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию и жесткость остова и т.д.). Такие изменения часто можно выполнить без значительного нарушения биологической активности антитела или фрагмента. Специалисты в данной области техники признают, что, как правило, замены отдельных аминокислот в несущественных областях полипептида существенно не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4<sup>th</sup> Ed.)). Кроме того, замены структурно или функционально аналогичных аминокислот с меньшей вероятностью существенно нарушают биологическую активность. Анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки по данному изобретению могут содержать иммуноглобулиновые цепи, имеющие аминокислотную последовательность данным документе, но имеющие один или несколько консервативно модифицированных вариантов.

Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256:1443-45.

В варианте осуществления данного изобретения анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок по данному изобретению, например, содержащий иммуноглобулиновую цепь, содержащую вариант аминокислотной последовательности, изложенной в данном документе, проявляет одно или несколько из следующих функциональных свойств:

Подавляет *in vitro* или *in vivo* рост *Plasmodium falciparum* в эритроцитах человека, например, при измерении по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита (например, со скоростью от около 51 до около 69% или до 100% включительно (например, когда анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок инкубируют с клетками в течение 96 часов (по сравнению с неинфицированными эритроцитами), например, когда антигенсвязывающий белок представляет собой H1H29100P, H1H29104P, H1H29127P, H1H29143P или любую их комбинацию из двух таких белков (см., например, табл. 2-1).

Подавляет рост *in vitro* или *in vivo* штамма 3D7 или 7G8 *Plasmodium falciparum* в эритроцитах человека, например, при измерении с помощью активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита ЛДГ, например, в присутствии хлорохинфосфата (CQ) (например, в концентрации около 4,81 нМ или 6,58 нМ), например, со скоростью от около 34 до 61% в отсутствие CQ, от около 32 до 51% в присутствии 4,81 нМ CQ или от около 20 до 75% в присутствии 6,58 нМ CQ.

Связывается с полипептидом PfRH5 или его антигенным фрагментом, например, PfRH5ΔNL.6his, с  $K_D$  от около 4,72 пМ до около 1,67 нМ при 25°C и/или от около 1,10 пМ до около 1,10 нМ при 37°C, например, как изложено в табл. 5-1 и 5-2 в данном документе.

Подавляет рост *in vitro* или *in vivo* штамма D10, Dd2, 7G8, W2-mef, 3D7, HB3, FCR-1/FVO, Cam3.П или RF7 *Plasmodium falciparum* в эритроцитах человека, например, при измерении с помощью активности лактатдегидрогеназы паразита (ЛДГ), например, в концентрации около 666,67 нМ со скоростью, изложенной в табл. 4-2, по сравнению с неинфицированными эритроцитами.

Блокирует связывание полипептида PfRH5 (например, PfRH5ΔNL.6his, например, в концентрации около 0,5 нМ или 2,0 нМ) с полипептидом базигином (например, на около 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100%), например, связывание PfRH5 с базигином, который связан с твердым матриксом (например, планшетом для ELISA), в котором анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок присутствует в количестве около 100 нМ. Например, при этом базигин представлен аминокислотами Thr25-His205, например, экспрессируемыми с помощью С-концевого линкера, DIEGRMD (SEQ ID NO: 363), за которым следует часть IgG1 человека (Pro100-Lys330) и 6X гистидиновая метка.

Связывается с тем же самым эпитопом, что и H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2; или H1H29215P2, например, связывается с PfRH5, не имеющим аминоконцевых остатков M1-Y139 и содержащим остатки K140-Q526, но не имеющим K247-L295 и

имеющим мутации T216A и T299A (PfRH5ΔNL.6his), например, дополнительно включающие С-концевую гексагистидиновую метку, например, при измерении поверхностного плазмонного резонанса.

Конкурирует с H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2, H1H29214P2; или H1H29215P2 за связывание с полипептидом PfRH5, например, PfRH5ΔNL.6his.

Данное изобретение включает отличного от человека примата (NHP) (например, обезьяну, такую как обезьяна Aotus), организм которого содержит анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент), такой как H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2; или H1H29215P2. Например, отличному от человека примату может быть введен антигенсвязывающий белок, или он может быть сконструирован для экспрессии этого белка. В варианте осуществления данного изобретения отличным от человека приматом является Aotus pansumaae. В варианте осуществления данного изобретения отличным от человека приматом является Plasmodium falciparum (например, штаммом 3D7).

Данное изобретение включает "нейтрализующие" или "антагонистические" анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые включают молекулы, которые подавляют активность PfRH5 до любой определяемой степени. Например, нейтрализующий анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок может подавлять рост Plasmodium falciparum и/или блокировать связывание PfRH5/BSG.

"H1H29089P"; "H1H29094P"; "H1H29100P"; "H1H29104P"; "H1H29106P"; "H1H29109P"; "H1H29125P"; "H1H29127P"; "H1H29131P"; "H1H29134P"; "H1H29138P"; "H1H29141P"; "H1H29143P"; "H1H29146P2"; "H1H29147P2"; "H1H29149P2"; "H1H29151P2"; "H1H29163P2"; "H1H29166P2"; "H1H29171P2"; "H1H29179P2"; "H1H29183P2"; "H1H29187P2"; "H1H29192P2"; "H1H29196P2"; "H1H29198P2"; "H1H29207P2"; "H1H29209P2"; "H1H29214P2"; или "H1H29215P2" относятся к антигенсвязывающим белкам, например, антителам и их антигенсвязывающим фрагментам (в том числе мультиспецифическим антигенсвязывающим белкам), содержащим вариabельную область тяжелой цепи иммуноглобулина ( $V_H$ ; или ее вариант) и вариabельную область легкой цепи иммуноглобулина ( $V_L$ ; или ее вариант), которые изложены в данном документе в табл. 1-1; или которые содержат  $V_H$ , которая содержит их CDR (CDR-H1 (или ее вариант), CDR-H2 (или ее вариант) и CDR-H3 (или ее вариант)) и/или  $V_L$ , которая содержит их CDR (CDR-L1 (или ее вариант), CDR-L2 (или ее вариант) и CDR-L3 (или ее вариант)), например, где вариabельные области и/или CDR иммуноглобулиновых цепей содержат конкретные аминокислотные последовательности, описанные ниже. В варианте осуществления данного изобретения  $V_H$  связана с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина (например, IgG, такого как IgG1 или IgG4) и/или  $V_L$  связана с константной областью легкой цепи иммуноглобулина (например, каппа или лямбда).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению содержат иммуноглобулиновые цепи, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные в данном документе, а также клеточные и посттрансляционные модификации *in vitro* антитела или фрагмента. Например, данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PfRH5, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой и/или легкой цепи, изложенные в данном документе (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3), а также антитела и фрагменты, в которых один или несколько аминокислотных остатков гликозилированы, один или несколько остатков Asp деамидированы, один или несколько остатков (например, Met, Trp и/или His) окислены, N-концевой Gln представляет собой пироглутамат (пироE) и/или C-концевой лизин отсутствует.

В данном изобретении представлен сосуд (например, пластиковый или стеклянный флакон, например, с крышкой или хроматографической колонкой, иглой с полым отверстием или цилиндром шприца), содержащий анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок по данному изобретению, например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2.

Данное изобретение также относится к инъекционному устройству, содержащему один или несколько антигенсвязывающих белков (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с PfRH5, например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2;

H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2; или H1H29215P2, или их фармацевтическую композицию. Инъекционное устройство может быть упаковано в набор. Инъекционное устройство представляет собой устройство, которое вводит вещество в организм субъекта парентеральным путем, например, внутримышечно, подкожно или внутривенно. Например, инъекционное устройство может представлять собой шприц (например, предварительно заполненный фармацевтической композицией, такой как автоинжектор), который, например, включает в себя цилиндр или цилиндр для удержания вводимой жидкости (например, содержащей антитело или его фрагмент, или фармацевтическую композицию), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для введения жидкости; и плунжер для выталкивания жидкости из цилиндра через отверстие иглы.

Данное изобретение также относится к способам введения анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка по данному изобретению, например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2, субъекту, включающим введение антигенсвязывающего белка в организм субъекта (например, человека), например, парентерально. Например, способ включает прокалывание тела субъекта иглой шприца и введение антигенсвязывающего белка в организм субъекта, например, в вену, артерию, опухоль, мышечную ткань или подкожный слой субъекта.

#### **Получение человеческих антител**

Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей известны в данной области техники. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте данного изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с PfRH5. Иммуноген, содержащий любое из следующего, может быть использован для образования антител, которые специфически связываются с PfRH5. В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитела по данному изобретению получают от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным PfRH5, или живым аттенуированным или инактивированным вирусом, или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. В качестве альтернативы, белок PfRH5 или его фрагмент могут быть получены с использованием стандартных биохимических методик, модифицированы и использованы в качестве иммуногена. В одном варианте осуществления данного изобретения иммуноген представляет собой рекомбинантно полученный белок PfRH5 или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления данного изобретения иммуноген может представлять собой вакцину полипептида PfRH5. В определенных вариантах осуществления можно вводить одну или несколько бустерных инъекций. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный полипептид PfRH5, экспрессируемый в *E. coli*, или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

С помощью технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) могут быть изначально выделены высокоаффинные химерные антитела к PfRH5, имеющие переменные человеческие области и константные мышинные области. Технология VELOCIMMUNE® включает в себя создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с локусами эндогенной константной области мыши, так что мышь вырабатывает антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепи. Затем ДНК экспрессируется в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мышь VELOCIMMUNE® заражают интересующим антигеном, и лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют у мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с линией клеток миеломы для получения линий клеток бессмертной гибридомы, и такие линии клеток гибридомы подвергаются скринингу и отбираются для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфичные к антигену, представляющему интерес. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с необходимыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть продуцирован в клетке, такой как клетка CHO. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующая антигенспецифичное химерное антитело или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифичных лимфоцитов.

Антитела, представляющие интерес, могут быть также выделены из В-клеток мыши. Вкратце, спленоциты собирают у каждой мыши и В-клетки сортируют (как описано, например, в US 2007/0280945A1) путем FACS с использованием антигена, представляющего интерес, в качестве реагента сортировки, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-клетки). Различные способы идентификации и сортировки антиген-положительных В-клеток, а также конструирование кас-

сет экспрессии генов иммуноглобулина с помощью ПЦР для получения клеток, экспрессирующих рекомбинантные антитела, хорошо известны в данной области техники. См., например, WO 20141460741, патент США № 7884054B2, и Liao, et al. June 2009. High-Throughput Isolation of Immunoglobulin Genes from Single Human B Cells and Expression as Monoclonal Antibodies. J Virol Methods 158(1-2): 171-9.

Изначально выделяли высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. Антитела характеризуются и отбираются по необходимым характеристикам, в том числе аффинности, селективности, эпитопа и т.д. Мышинные константные области заменяют необходимой человеческой константной областью для образования полностью человеческого антитела по данному изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинной антигенсвязывающей и целевой специфичности находятся в вариабельной области.

#### **Анти-PfRH5 антитела, содержащие Fc-варианты**

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения представлены анти-PfRH5 антигенсвязывающие фрагменты, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые, например, усиливают или уменьшают связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Например, данное изобретение включает анти-PfRH5 антитела, содержащие мутацию в C<sub>H</sub>2- или C<sub>H</sub>3-области Fc-домена, где мутация (мутации) увеличивает (увеличивают) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, при этом pH находится в диапазоне от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация содержит модификацию 265A (например, D265A) и/или модификацию 297A (например, N297A).

Например, данное изобретение включает анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376B и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F).

Анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub>, как изложено в данном документе, содержащие любые возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена, рассматриваются в объеме данного изобретения.

Данное изобретение также включает анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, содержащие V<sub>H</sub>, изложенную в данном документе, и химерную константную область тяжелой цепи (C<sub>H</sub>), при этом химерная C<sub>H</sub>-область содержит сегменты, полученные из C<sub>H</sub>-областей более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела по данному изобретению могут содержать химерную C<sub>H</sub>-область, содержащую часть или весь C<sub>H</sub>2-домен, полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в сочетании с частью или всем C<sub>H</sub>3-доменом, полученным из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по данному изобретению содержат химерную C<sub>H</sub>-область, имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность "верхнего шарнира" (аминокислотные остатки в положениях с 216 по 227 согласно нумерации EU), полученную из области петли IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в сочетании с последовательностью нижней петли (аминокислотные остатки в положениях 228-236 согласно нумерации EU), полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную C<sub>H</sub>-область, как описано в данном документе, может в некоторых вариантах осуществления проявлять модифицированные эффекторные функции Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, WO 2014/022540).

### Мультиспецифические антигенсвязывающие белки

Данное изобретение включает анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также способы их применения и способы создания таких антигенсвязывающих белков. Термин "анти-PfRH5" антигенсвязывающие белки, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, включает мультиспецифические (например, биспецифические или бипаратопные) молекулы, которые содержат по меньшей мере один первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с PfRH5 (например, антиген-связывающий домен из H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2) и по меньшей мере один второй антигенсвязывающий домен, который связывается с другим антигеном или с эпитопом в PfRH5, который отличается от первого антигенсвязывающего домена (например, CD3, CD16, BSG (базигин), EXP1, MSP1, MSP2, MSPMSP3, MSP4, MSP5, MSP6, MSP7, MSP9, MSP10 GLURP, Sera, RAMA, SEA, AMA1, MTRAP, PTRAMP, ASP, RH1, RH2a, RH2b, RH4, RAP1, RAPH2, RAP3, Rhop, RhopH3, EMA175, EMA140 и/или EBA181). В варианте осуществления данного изобретения первый и второй эпитопы перекрываются. В другом варианте осуществления данного изобретения первый и второй эпитопы не перекрываются.

В варианте осуществления данного изобретения мультиспецифический антигенсвязывающий белок связывается с PfRH5 и с антигеном, который вызывает активацию иммунных клеток, таких как цитотоксические Т-клетки, НК-клетки, мононуклеарные фагоциты или нейтрофилы, например, CD3 или CD16.

"H1H29089P"; "H1H29094P"; "H1H29100P"; "H1H29104P"; "H1H29106P"; "H1H29109P"; "H1H29125P"; "H1H29127P"; "H1H29131P"; "H1H29134P"; "H1H29138P"; "H1H29141P"; "H1H29143P"; "H1H29146P2"; "H1H29147P2"; "H1H29149P2"; "H1H29151P2"; "H1H29163P2"; "H1H29166P2"; "H1H29171P2"; "H1H29179P2"; "H1H29183P2"; "H1H29187P2"; "H1H29192P2"; "H1H29196P2"; "H1H29198P2"; "H1H29207P2"; "H1H29214P2"; или "H1H29215P2" включает мультиспецифические молекулы, например антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCDR и LCDR, V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> или HC и LC H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2 соответственно (в том числе их варианты, как изложено в данном документе), и один или несколько антигенсвязывающих доменов, которые связываются с другим эпитопом.

В варианте осуществления данного изобретения антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с PfRH5, который может быть включен в мультиспецифическую молекулу, содержит:

(1) (i) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, которая содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранной из: H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 и H1H29215P2, и

(ii) последовательность вариабельного домена легкой цепи, которая содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранной из: H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 и H1H29215P2 соответственно; или

(2) (i) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), выбранную из H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 и H1H29215P2; и

(ii) последовательность вариабельного домена легкой цепи (V<sub>L</sub>), выбранную из: H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 и H1H29215P2 соответственно;

и один или несколько антигенсвязывающих доменов, которые связываются с другим эпитопом.

В варианте осуществления данного изобретения мультиспецифическое антитело или фрагмент содержит более двух различных специфичностей связывания (например, триспецифическую молекулу), например, один или несколько дополнительных антигенсвязывающих доменов, которые являются таки-

ми же или отличными от первого и/или второго антигенсвязывающего домена.

В одном варианте осуществления данного изобретения биспецифический антигенсвязывающий фрагмент содержит первый scFv (например, содержащий V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 и H1H29215P2), имеющий специфичность связывания к первому эпитопу (например, PfRH5), и второй scFv, имеющий специфичность связывания к второму, другому эпитопу. Например, в варианте осуществления данного изобретения первый и второй scFv связаны с линкером, например пептидным линкером (например, линкером GS, таким как (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 364), где n составляет, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). Другие биспецифические антигенсвязывающие фрагменты включают F(ab)<sub>2</sub> биспецифического антитела IgG, который содержит CDR тяжелой и легкой цепей H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 и H1H29215P2, и другого антитела, которое связывается с другим эпитопом.

#### **Иммуноконъюгаты**

Данное изобретение охватывает анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например антитела или антигенсвязывающие фрагменты, конъюгированные с другим фрагментом, например, терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как токсоид (например, дифтерийный токсоид или столбнячный токсоид), или противопаразитарным препаратом для лечения инфекции *Plasmodium falciparum*. В одном варианте данного изобретения анти-PfRH5 антитело или фрагмент конъюгируют с любым из дополнительных терапевтических агентов, изложенных в данном документе. Используемый в данном документе термин "иммуноконъюгат" относится к антигенсвязывающему белку, например, антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который химически или биологически связан с другой молекулой.

#### **Способы лечения**

Данное изобретение относится к способам лечения или предупреждения инфекции *Plasmodium falciparum* (например, малярии) путем введения терапевтически эффективного количества анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2) субъекту (например, человеку), нуждающемуся в таком лечении или предупреждении. "Малярия" представляет собой заболевание, часто передающееся при укусе инфицированной самки комара (например, комара *Anopheles*), вызываемое инфицированием хозяина паразитом *Plasmodium falciparum*. Термин "инфекция, вызываемая *Plasmodium falciparum*" относится к инвазии в организм субъекта *Plasmodium falciparum* и включает малярию.

Эффективная или терапевтически эффективная доза анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2), для лечения или предупреждения инфекции *Plasmodium falciparum* относится к количеству антитела или фрагмента, достаточному для облегчения одного или нескольких признаков и/или симптомов инфекции у подвергающегося лечению субъекта, как путем индукции регресса или устранения таких признаков и/или симптомов, так путем подавления прогрессирования таких признаков и/или симптомов. Размер дозы может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут производить введение, целевого заболевания, патологических состояний, пути введения и т.п. В варианте осуществления данного изобретения эффективная или терапевтически эффективная доза анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению для лечения или предупреждения инфекции *Plasmodium falciparum*, например, у взрослого субъекта-человека составляет от около 1 до 150 мг/кг. В зависимости от тяжести инфекции, частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок по данному изобретению можно вводить в начальной дозе с последующей одной или несколькими вторичными дозами. В определенных вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз антигенсвязывающего белка в количестве, которое может быть приблизительно таким же или меньшим, чем количество начальной дозы, при этом последующие дозы разделяются не менее чем 1-3 днями; не менее чем одной неделей, не менее чем 2 неделями; не менее чем 3 неделями; не менее чем 4 неделями; не менее чем 5 неделями; не менее чем 6 неделями; не менее

чем 7 неделями; не менее чем 8 неделями; не менее чем 9 неделями; не менее чем 10 неделями; не менее чем 12 неделями; или по меньшей мере 14 неделями.

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к млекопитающему (например, крысе, мышши, кошке, собаке, корове, овце, лошади, козе, кролику), предпочтительно человеку, например, нуждающемуся в предупреждении и/или лечении инфекции, вызываемой *Plasmodium falciparum*. Субъект может иметь инфекцию, вызываемую *Plasmodium falciparum*, или быть предрасположенным к развитию инфекции *Plasmodium falciparum*, или иметь повышенный риск развития такой инфекции. Субъекты, предрасположенные к развитию инфекции *Plasmodium falciparum*, или субъекты, которые могут иметь повышенный риск заражения инфекцией *Plasmodium falciparum*, включают субъектов с ослабленной иммунной системой, например, из-за аутоиммунного заболевания, лиц, получающих иммуносупрессивную терапию, лиц, страдающих синдромом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), с определенными формами анемии, которые истощают или разрушают лейкоциты, лиц, получающие лучевую терапию или химиотерапию, или лиц, страдающих воспалительным заболеванием. Кроме того, могут быть предрасположены субъекты очень молодого или пожилого возраста. Любой человек, вступающий в контакт с комарами или в непосредственной близости от них, особенно в тропиках, Южной Америке, Центральной Америке, Африке, Юго-Восточной Азии и Восточно-Средиземноморском регионе имеет повышенный риск развития инфекции *Plasmodium falciparum*.

"Лечить" или "лечение" означает введение анти-PfPRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125; H1H29125; H1H29125; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2), субъекту, имеющему инфекцию *Plasmodium falciparum*, таким образом, что один или несколько признаков или симптомов инфекции у субъекта уменьшаются или устраняются, например, когда *Plasmodium falciparum* ослабляется или по сути устраняется (например, полностью устраняется) из организма субъекта.

Признаки и симптомы инфекции *Plasmodium falciparum* включают анемию; кровавый стул; озноб, жар, потливость; кому; судороги; головную боль; желтуху; боль в мышцах; тошноту и рвоту; увеличение селезенки; желтуху; увеличение печени; учащенное дыхание; *Plasmodium falciparum* в кровотоке, печени или эритроцитах; анемию; гемолиз; свободный гемоглобин в кровотоке; гемоглобинурию; острую почечную недостаточность; острый респираторный дистресс-синдром (ARDS); низкое кровяное давление; метаболический ацидоз и гипогликемию.

Данное изобретение также включает профилактическое введение анти-PfPRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29109125; H1H29109P; H1H29109P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2) субъекту, который находится в группе риска (например, предрасположен или подвержен повышенному риску) инфекции *Plasmodium falciparum*, с тем, чтобы предупредить такую инфекцию. "Предупредить" или "предупреждение" означает введение анти-PfPRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению, субъекту, который не инфицирован *Plasmodium falciparum*, таким образом, что проявление инфекции в организме субъекта подавляется, или уменьшается вероятность или уменьшается тяжесть, если инфекция действительно имеет место.

#### **Комбинации и фармацевтические композиции**

Данное изобретение относится к композициям, которые включают анти-PfPRH5 антигенсвязывающие белки и один или несколько ингредиентов; а также способы их применения и способы создания таких композиций.

Для получения фармацевтических композиций анти-PfPRH5 антигенсвязывающих белков, например, антител и их антигенсвязывающих фрагментов (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29129H129P; H1H29127P; H1H29127; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H2H229H2; H1H2291P2; H1H29183P2; H1H229H2198; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2), антигенсвязывающий белок смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopoeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA. (1984); Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.)

(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. В варианте осуществления данного изобретения фармацевтическая композиция является стерильной. Такие композиции являются частью данного изобретения.

Фармацевтические композиции по данному изобретению содержат фармацевтически приемлемые носители, разбавители, эксципиенты и/или стабилизаторы, такие как, например, воду, буферные агенты, стабилизирующие агенты, консерванты, изотонификаторы, неионные детергенты, антиоксиданты и/или другие различные добавки.

Объем данного изобретения включает высушенные, например, лиофилизированные композиции, содержащие анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29109P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2), или их фармацевтическую композицию, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель, но по сути не содержит воды.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения дополнительный терапевтический агент, который вводят субъекту в сочетании с анти-PfRH5 антигенсвязывающим белком, например антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2; или H1H29215P2), раскрываемый в данном документе, вводят субъекту в соответствии с Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57<sup>th</sup> edition (Nov. 1, 2002)).

Способ введения антигенсвязывающего белка или его композиции может варьироваться. Пути введения включают пероральный, ректальный, чрезслизистый, кишечный, парентеральный; внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интратекальный, прямой внутрижелудочковый, внутривенный, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, ингаляционный, инсуффляционный, местный, кожный, трансдермальный или внутриартериальный.

В данном изобретении представлены способы введения анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H2912529P; H1H2912529P; H1H2912529P; H1H2912529P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2) субъекту, включающие введение белка или фармацевтической композиции или их комбинации в организм субъекта. Например, способ включает прокалывание тела субъекта иглой шприца и введение антигенсвязывающего белка или фармацевтической композиции, или их комбинации в организм субъекта, например, в вену, артерию, опухоль, мышечную ткань или подкожный слой субъекта.

В данном изобретении представлен сосуд (например, пластмассовый или стеклянный флакон, например, с крышкой или хроматографической колонкой, иглой с полым отверстием или цилиндром шприца), содержащий любой из анти-PfRH5 антигенсвязывающих белков, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2) или фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель или их комбинацию.

Данное изобретение включает комбинации, включающие анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2), в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок и дополнительный терапевтический агент могут находиться в одной композиции или в отдельных композициях. Например, в варианте осуществления данного изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой противопаразитарный или противомаларийный терапевтический агент. В варианте осуществления данного изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой хлорохин, атовакон и/или прогуанил, артемизинин и/или люмефантрин, мефлохин, хинин, хинидин, доксициклин (необязательно в комбинации с хинином) и/или клинда-

мицин (необязательно в комбинации с хинином). В варианте осуществления данного изобретения дополнительным терапевтическим агентом является вакцина, такая как противомаларийная вакцина, например, RTS, S/AS01 (находится в продаже в виде Mosquirix). Способы лечения или предупреждения инфекции *Plasmodium falciparum* у субъекта, нуждающегося в указанном лечении или предупреждении, путем введения Н1Н29089Р; Н1Н29094Р; Н1Н29100Р; Н1Н29104Р; Н1Н29106Р; Н1Н29109Р; Н1Н29125Р; Н1Н29127Р; Н1Н29131Р; Н1Н29134Р; Н1Н29138Р; Н1Н29141Р; Н1Н29143Р; Н1Н29146Р2; Н1Н29147Р2; Н1Н29149Р2; Н1Н29151Р2; Н1Н29163Р2; Н1Н29166Р2; Н1Н29171Р2; Н1Н29179Р2; Н1Н29183Р2; Н1Н29187Р2; Н1Н29192Р2; Н1Н29196Р2; Н1Н29198Р2; Н1Н29207Р2; Н1Н29209Р2; Н1Н29214Р2 или Н1Н29215Р2 в сочетании с другим терапевтическим агентом являются частью данного изобретения.

Данное изобретение включает комбинацию, включающую два или более (например, 2, 3 или 4) антигенсвязывающих белка по данному изобретению (например, антитело или антигенсвязывающий белок) в сочетании друг с другом. Например, если Н1Н29089Р представляет собой Ab1; если Н1Н29094Р представляет собой Ab2; если Н1Н29100Р представляет собой Ab1; если Н1Н29104Р представляет собой Ab4; если Н1Н29106Р представляет собой Ab5; если Н1Н29109Р представляет собой Ab6; если Н1Н29125Р представляет собой Ab7; если Н1Н29127Р представляет собой Ab8; если Н1Н29131Р представляет собой Ab9; если Н1Н29134Р представляет собой Ab10; если Н1Н29138Р представляет собой Ab11; если Н1Н29141Р представляет собой Ab12; если Н1Н29143Р представляет собой Ab13; если Н1Н29146Р2 представляет собой Ab14; если Н1Н29147Р2 представляет собой Ab15; если Н1Н29149Р2 представляет собой Ab16; если Н1Н29151Р2 представляет собой Ab17; если Н1Н29163Р2 представляет собой Ab18; если Н1Н29166Р2 представляет собой Ab19; если Н1Н29171Р2 представляет собой Ab20; если Н1Н29179Р2 представляет собой Ab21; если Н1Н29183Р2 представляет собой Ab22; если Н1Н29187Р2 представляет собой Ab23; если Н1Н29192Р2 представляет собой Ab24; если Н1Н29196Р2 представляет собой Ab25; если Н1Н29198Р2 представляет собой Ab26; если Н1Н29207Р2 представляет собой Ab27; если Н1Н29214Р2 представляет собой Ab28; если Н1Н29215Р2 представляет собой Ab29 и если Н1Н29209Р представляет собой Ab30, то такие композиции по данному изобретению включают комбинации, включающие следующие антигенсвязывающие белки по данному изобретению (например, антитела и/или антигенсвязывающие белки) в сочетании друг с другом:

Ab1 и Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab2 Ab22 Ab15 Ab9 Ab29 Ab24 Ab20 Ab17 Ab15 Ab14  
 Ab1 и Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab3 Ab23 Ab16 Ab10 Ab5 Ab25 Ab21 Ab18 Ab16 Ab15  
 Ab1 и Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab4 Ab24 Ab17 Ab11 Ab6 Ab26 Ab22 Ab19 Ab17 Ab16  
 Ab1 и Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab5 Ab25 Ab18 Ab12 Ab7 Ab27 Ab23 Ab20 Ab18 Ab17  
 Ab1 и Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab6 Ab26 Ab19 Ab13 Ab8 Ab28 Ab24 Ab21 Ab19 Ab18  
 Ab1 и Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab7 Ab27 Ab20 Ab14 Ab9 Ab29 Ab25 Ab22 Ab20 Ab19  
 Ab1 и Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab8 Ab28 Ab21 Ab15 Ab10 Ab6 Ab26 Ab23 Ab21 Ab20  
 Ab1 и Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab9 Ab29 Ab22 Ab16 Ab11 Ab7 Ab27 Ab24 Ab22 Ab21  
 Ab1 и Ab2 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab10 Ab3 Ab23 Ab17 Ab12 Ab8 Ab28 Ab25 Ab23 Ab22  
 Ab1 и Ab2 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab11 Ab4 Ab24 Ab18 Ab13 Ab9 Ab29 Ab26 Ab24 Ab23  
 Ab1 и Ab2 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab12 Ab5 Ab25 Ab19 Ab14 Ab10 Ab7 Ab27 Ab25 Ab24  
 Ab1 и Ab2 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab13 Ab6 Ab26 Ab20 Ab15 Ab11 Ab8 Ab28 Ab26 Ab25  
 Ab1 и Ab2 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab14 Ab7 Ab27 Ab21 Ab16 Ab12 Ab9 Ab29 Ab27 Ab26  
 Ab1 и Ab2 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab15 Ab8 Ab28 Ab22 Ab17 Ab13 Ab10 Ab8 Ab28 Ab27  
 Ab1 и Ab2 и Ab2 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab7 и Ab8 и  
 Ab16 Ab9 Ab29 Ab23 Ab18 Ab14 Ab11 Ab9 Ab29 Ab28  
 Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и Ab8 и  
 Ab17 Ab10 Ab4 Ab24 Ab19 Ab15 Ab12 Ab10 Ab9 Ab29  
 Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и Ab9 и  
 Ab18 Ab11 Ab5 Ab25 Ab20 Ab16 Ab13 Ab11 Ab10 Ab10  
 Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и Ab9 и  
 Ab19 Ab12 Ab6 Ab26 Ab21 Ab17 Ab14 Ab12 Ab11 Ab11  
 Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и Ab9 и  
 Ab20 Ab13 Ab7 Ab27 Ab22 Ab18 Ab15 Ab13 Ab12 Ab12  
 Ab1 и Ab2 и Ab3 и Ab3 и Ab4 и Ab5 и Ab6 и Ab7 и Ab8 и Ab9 и  
 Ab21 Ab14 Ab8 Ab28 Ab23 Ab19 Ab16 Ab14 Ab13 Ab13

Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab16 и	Ab18 и	Ab19 и	Ab22 и
Ab14	Ab15	Ab17	Ab20	Ab24	Ab29	Ab22	Ab19	Ab29	Ab25
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab15 и	Ab16 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab22 и
Ab15	Ab16	Ab18	Ab21	Ab25	Ab16	Ab23	Ab20	Ab21	Ab26
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab15 и	Ab16 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab22 и
Ab16	Ab17	Ab19	Ab22	Ab26	Ab17	Ab24	Ab21	Ab22	Ab27
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab15 и	Ab16 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab22 и
Ab17	Ab18	Ab20	Ab23	Ab27	Ab18	Ab25	Ab22	Ab23	Ab28
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab15 и	Ab16 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab22 и
Ab18	Ab19	Ab21	Ab24	Ab28	Ab19	Ab26	Ab23	Ab24	Ab29
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab15 и	Ab16 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab23 и
Ab19	Ab20	Ab22	Ab25	Ab29	Ab20	Ab27	Ab24	Ab25	Ab24
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab16 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab23 и
Ab20	Ab21	Ab23	Ab26	Ab15	Ab21	Ab28	Ab25	Ab26	Ab25
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab16 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab23 и
Ab21	Ab22	Ab24	Ab27	Ab16	Ab22	Ab29	Ab26	Ab27	Ab26
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab17 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab23 и
Ab22	Ab23	Ab25	Ab28	Ab17	Ab23	Ab18	Ab27	Ab28	Ab27
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab17 и	Ab18 и	Ab20 и	Ab23 и
Ab23	Ab24	Ab26	Ab29	Ab18	Ab24	Ab19	Ab28	Ab29	Ab28
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab17 и	Ab18 и	Ab21 и	Ab23 и
Ab24	Ab25	Ab27	Ab14	Ab19	Ab25	Ab20	Ab29	Ab22	Ab29
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab21 и	Ab24 и
Ab25	Ab26	Ab28	Ab15	Ab20	Ab26	Ab21	Ab20	Ab23	Ab25
Ab9 и	Ab10 и	Ab11 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab21 и	Ab24 и
Ab26	Ab27	Ab29	Ab16	Ab21	Ab27	Ab22	Ab21	Ab24	Ab26
Ab9 и	Ab10 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab21 и	Ab24 и
Ab27	Ab28	Ab13	Ab17	Ab22	Ab28	Ab23	Ab22	Ab25	Ab27
Ab9 и	Ab10 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab15 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab21 и	Ab24 и
Ab28	Ab29	Ab14	Ab18	Ab23	Ab29	Ab24	Ab23	Ab26	Ab28
Ab9 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab16 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab21 и	Ab24 и
Ab29	Ab12	Ab15	Ab19	Ab24	Ab17	Ab25	Ab24	Ab27	Ab29
Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab16 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab21 и	Ab25 и
Ab11	Ab13	Ab16	Ab20	Ab25	Ab18	Ab26	Ab25	Ab28	Ab26
Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab16 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab21 и	Ab25 и
Ab12	Ab14	Ab17	Ab21	Ab26	Ab19	Ab27	Ab26	Ab29	Ab27
Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab16 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab22 и	Ab25 и
Ab13	Ab15	Ab18	Ab22	Ab27	Ab20	Ab28	Ab27	Ab23	Ab28
Ab10 и	Ab11 и	Ab12 и	Ab13 и	Ab14 и	Ab16 и	Ab17 и	Ab19 и	Ab22 и	Ab25 и
Ab14	Ab16	Ab19	Ab23	Ab28	Ab21	Ab29	Ab28	Ab24	Ab29

Ab26 и Ab15 и  
 Ab27 Ab30  
 Ab26 и Ab16 и  
 Ab28 Ab30  
 Ab26 и Ab17 и  
 Ab29 Ab30  
 Ab27 и Ab18 и  
 Ab28 Ab30  
 Ab27 и Ab19 и  
 Ab29 Ab30  
 Ab28 и Ab20 и  
 Ab29 Ab30  
 Ab1 и Ab21 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab2 и Ab22 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab3 и Ab23 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab4 и Ab24 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab5 и Ab25 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab6 и Ab26 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab7 и Ab27 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab8 и Ab28 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab9 и Ab29 и  
 Ab30 Ab30  
 Ab10 и  
 Ab30  
 Ab11 и  
 Ab30  
 Ab12 и  
 Ab30  
 Ab13 и  
 Ab30  
 Ab14 и  
 Ab30

В одном варианте осуществления данного изобретения композиция содержит два или более неконкурирующих антигенсвязывающих белка. Перекрестная конкуренция между анти-PfRH5 антителами по данному изобретению представлена в обобщенном виде ниже в табл. 6-1.

Термин "в сочетании с" указывает на то, что компоненты, анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению, вместе с другим агентом, таким как хлорохин, могут быть составлены в единую композицию, например, для одновременной доставки или составлены отдельно в две или более композиции (например, набор, включающий каждый компонент). Каждый компонент можно вводить субъекту в другое время по сравнению с тем, когда вводится другой компонент; например, каждое введение можно выполнять не одновременно (например, отдельно или последовательно) с интервалами в течение заданного периода времени. Более того, отдельные компоненты можно вводить субъекту тем же самым или другим путем.

#### **Тестирование и диагностика**

Ранняя диагностика малярии способствует получению положительного клинического результата. В данном изобретении представлены способы лечения инфекции *Plasmodium falciparum* (например, малярии) у субъекта, включающие диагностику инфекции у субъекта и в случае, если у субъекта диагностирована инфекция, введение терапевтически эффективного количества анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента, субъекту. См., например, Moody, *Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites, Clinical Microbiology Reviews* 15 (1):66-78 (2002).

Инфекцию *Plasmodium falciparum* можно диагностировать под микроскопом (например, с помощью флуоресцентной микроскопии). Например, *Plasmodium falciparum* можно идентифицировать, исследуя под микроскопом каплю крови субъекта, например, распространенную в виде "мазка крови" на предметном стекле микроскопа (например, толстый мазок крови или тонкий мазок крови). Перед исследованием образец можно окрасить (например, красителем Гимза). Данное изобретение включает способы лечения

инфекции *Plasmodium falciparum* (как обсуждается в данном документе), при которых инфекция диагностируется микроскопически.

В одном варианте осуществления данного изобретения присутствие *Plasmodium falciparum* в образце, взятом у субъекта, обнаруживается путем обнаружения лактатдегидрогеназы *Plasmodium falciparum*. Если ЛДГ обнаруживается в исследуемом образце выше, чем в контрольном образце известного неинфицированного образца, то определяется, что исследуемый образец содержит *Plasmodium falciparum*. См., например, Miura, H. Zhou, A. Diouf, SE. Moretz, MP. Fay, LH. Miller, LB. Martin, MA. Pierce, RD. Ellis, GED. Mullen, CA. Long. Anti-Apical-Membrane-Antigen-1 antibody is more effective than anti-42-kilodalton-Merozoite-Surface-Protein-1 antibody in inhibiting *Plasmodium falciparum* growth, as determined by the in vitro growth inhibition assay. Clin Vaccine Immunol. 16, 963-968 (2009). PMID: PMC2708396.

Присутствие нуклеиновых кислот *Plasmodium falciparum* также может быть обнаружено, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обнаружением, например, генов малой субъединицы 18S рРНК и/или циркумспорозитов (ЦС).

Инфекцию *Plasmodium falciparum* также можно диагностировать путем обнаружения антигенов паразита в организме субъекта. Например, в одном варианте данного изобретения антиген определяют иммуногенно, например, с помощью экспресс-диагностического теста. См., например, Van der Palen et al. Test characteristics of two rapid antigen detection tests (SD FK50 and SD FK60) for the diagnosis of malaria in returned travelers, Malaria Journal 8:90 (2009); или патент США № 5712170.

Анти-PfRH5 антигенсвязывающие белки, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2), можно использовать для обнаружения и/или измерения PfRH5 (например, клетки *Plasmodium falciparum*, которая содержит белок PfRH5) в образце (например, жидкости организма, такой как кровь). Примеры анализов на PfRH5 могут включать, например, приведение в контакт образца с анти-PfRH5 антигенсвязывающим белком по данному изобретению, где, например, анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок помечен детектируемой меткой или репортерной молекулой. Если обнаруживается анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок в комплексе с PfRH5, то это указывает на присутствие PfRH5 в образце и/или присутствие *Plasmodium falciparum* в образце и в организме субъекта.

Например, данное изобретение включает способы обнаружения полипептида PfRH5 или клетки, содержащей такой полипептид (например, *Plasmodium falciparum*), с использованием иммунохроматографического теста обнаружения антигена. Такие хроматографические тесты основаны на захвате детектируемых меченных антигенсвязывающих белков (например, антител и их антигенсвязывающих фрагментов) с получением видимой полосы на полоске субстрата. В диагностических тестах на малярию *Plasmodium falciparum* меченый антигенсвязывающий белок сначала связывается с антигеном паразита, PfRH5, и полученный комплекс захватывается на полоске полосой связанного антигенсвязывающего белка, образуя видимую линию (тестовая линия). Контрольная линия дает информацию о целостности конъюгата антитело-метка, однако не подтверждает способность обнаруживать антиген паразита.

В данном изобретении представлена хроматографическая тест-полоска для обнаружения присутствия PfRH5 (например, клетки *Plasmodium falciparum*) в образце, содержащем субстрат (например, нитроцеллюлозу), которая содержит следующие области, расположенные латерально вдоль субстрата:

- (i) место для ввода образца (зона образца);
- (ii) прокладку конъюгата, которая содержит первый анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок (например, H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2; H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 или H1H29215P2), который является детектируемым образом меченым, например, красителем, но не иммобилизован на субстрате;
- (iii) тестовую линию, содержащую второй анти-PfRH5 антигенсвязывающий белок, который не является детектируемым образом меченым и не конкурирует в значительной степени с первым анти-PfRH5 антигенсвязывающим белком за связывание с PfRH5, но иммобилизован на субстрате; и
- (iv) контрольную линию, содержащую вторичный антигенсвязывающий белок, иммобилизованный на субстрате, который связывается с первым анти-PfRH5 антигенсвязывающим белком (например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом, или белком А).

В варианте осуществления данного изобретения:

(i) после того, как образец, содержащий жидкость, помещен на прокладку для образца, образец (и любой содержащийся в нем полипептид PfRH5) диффундирует за счет капиллярного действия через субстрат на прокладку для конъюгации, затем в тестовую линию, а затем в контрольную линию;

(ii) полипептид PfRH5, который достигает прокладки конъюгата, образует комплекс с детектируе-

мым образом меченым первым анти-PfRH5 антигенсвязывающим белком, и комплекс далее диффундирует в тестовую линию, где образуется дополнительный комплекс со вторым анти-PfRH5 антигенсвязывающим белком (образующим тройной комплекс, в котором PfRH5 связан указанными первым и вторым антигенсвязывающими белками и иммобилизован внутри тестовой линии);

(iii) любой избыток первого анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка, который не иммобилизуется на тестовой линии, продолжает диффундировать в контрольную линию и связывается со вторичным антигенсвязывающим белком, тем самым становясь иммобилизованным в контрольной линии; и/или

(iv) положительный тест, указывающий на присутствие PfRH5 в образце, определяется наличием детектируемой метки в тестовой линии; отрицательный результат теста, указывающий на отсутствие детектируемых уровней PfRH5 в образце, определяется отсутствием детектируемой метки в тестовой линии; а обнаруживаемая метка в контрольной линии указывает, что тестовая система работает правильно.

В варианте осуществления данного изобретения детектируемая метка представляет собой краситель (например, синий индиго), фермент, ферритин, флуоресцентную или окрашенную микрочастицу/гранулу или наночастицу/гранулу или коллоидный металл (например, золото, селеновый краситель (например, в липосомах) или серебро, например, его коллоидную частицу). В варианте осуществления данного изобретения детектируемая метка обнаруживается визуально.

В варианте осуществления данного изобретения субстрат представляет собой нерастворимый материал, способный поддерживать поток жидкости, например, фильтровальную бумагу из стекловолокна; натуральные полимерные материалы, материалы на основе целлюлозы, фильтровальную бумагу, хроматографическую бумагу, нитроцеллюлозу, ацетат целлюлозы, поли(винилхлорид), полиакриламид или сшитый декстран.

В данном изобретении также представлен способ определения того, содержит ли образец (например, биологическая жидкость, такая как, например, кровь) PfRH5 (например, клетку, содержащую PfRH5, такую как *Plasmodium falciparum*), включающий приведение в контакт зоны образца устройства, основанного на принципе растекания жидкости в радиальном направлении, как изложено в данном документе, с образцом, ожидание капиллярного потока для переноса образца через субстрат к контрольной линии, необязательно ожидание в течение некоторого времени, и наблюдение за тестовой и контрольной линиями, при этом наличие детектируемой метки в тестовой линии указывает на то, что образец содержит PfRH5, а наличие детектируемой метки в контрольной линии указывает на то, что хроматографическая тест-полоска функционирует правильно. Отсутствие детектируемой метки в тестовой линии при наличии детектируемой метки в контрольной линии указывает на отсутствие PfRH5 в образце. В варианте осуществления данного изобретения способ дополнительно включает лечение субъекта, у которого был взят образец, терапевтически эффективным количеством анти-PfRH5 антигенсвязывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента), если тест показывает наличие PfRH5 в образце и хроматографическая тест-полоска функционирует правильно.

### Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как разрабатывать и применять способы и композиции по данному изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет около 25°C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Получение человеческих антител, которые связываются с PfRH5.

Человеческие антитела к RH5 *P. falciparum* (PfRH5) получали у мышей VELOCIMMUNE®, содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и каппа-легкой цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали рекомбинантным белком RH5 (PfRH5ΔNL). Некоторых мышей иммунизировали рекомбинантным белком PfRH5 (PfRH5@NL.6his) с последующей бустерной вакциной мерозоитов *P. falciparum*, выделенных из штамма 3D7. Иммунный ответ антитела контролировали с помощью PfRH5-специфического иммунологического анализа. В случае, если необходимого иммунного ответа достигали, спленоциты извлекали и антитела выделяли непосредственно из антиген-позитивных В-клеток мыши без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 2007/0280945A1, явным образом включенном в данный документ посредством ссылки в полном объеме. С помощью этого способа получали несколько полностью человеческих анти-PfRH5 антител (т.е., антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами); иллюстративные антитела, полученные таким образом, обозначали как H1H29089P; H1H29094P; H1H29100P; H1H29104P; H1H29106P; H1H29109P; H1H29125P; H1H29127P; H1H29131P; H1H29134P; H1H29138P; H1H29141P; H1H29143P; H1H29146P2; H1H29147P2; H1H29149P2; H1H29151P2; H1H29163P2; H1H29166P2; H1H29171P2; H1H29179P2; H1H29183P2; H1H29187P2; H1H29192P2; H1H29196P2; H1H29198P2;

H1H29207P2; H1H29209P2; H1H29214P2 и H1H29215P2.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в разделе Примеры, изложенном ниже. Последовательности иммуноглобулиновых цепей антител изложены ниже.

Таблица 1-1. Последовательности иммуноглобулиновых цепей по данному изобретению\*

Антитело №	Название	V <sub>H</sub>		CDR-H1		CDR-H2		CDR-H3		V <sub>L</sub>		CDR-L1		CDR-L2		CDR-L3	
		ДНК	ПЕП	ДНК	ПЕП	ДНК	ПЕП	ДНК	ПЕП	ДНК	ПЕП	ДНК	ПЕП	ДНК	ПЕП	ДНК	ПЕП
1	H1H29089P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
2	H1H29094P	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
3	H1H29100P	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
4	H1H29104P	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
5	H1H29106P	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
6	H1H29109P	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
7	H1H29125P	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
8	H1H29127P	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
9	H1H29131P	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
10	H1H29134P	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
11	H1H29138P	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176
12	H1H29141P	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
13	H1H29143P	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208
14	H1H29146P2	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224
15	H1H29147P2	225	226	227	228	229	230	231	232	217	218	219	220	221	222	223	224
16	H1H29149P2	233	234	235	236	237	238	239	240	217	218	219	220	221	222	223	224
17	H1H29151P2	241	242	243	244	245	246	247	248	217	218	219	220	221	222	223	224
18	H1H29163P2	249	250	251	252	253	254	255	256	217	218	219	220	221	222	223	224
19	H1H29166P2	257	258	259	260	261	262	263	264	217	218	219	220	221	222	223	224
20	H1H29171P2	265	266	267	268	269	270	271	272	217	218	219	220	221	222	223	224
21	H1H29179P2	273	274	275	276	277	278	279	280	217	218	219	220	221	222	223	224
22	H1H29183P2	281	282	283	284	285	286	287	288	217	218	219	220	221	222	223	224
23	H1H29187P2	289	290	291	292	293	294	295	296	217	218	219	220	221	222	223	224
24	H1H29192P2	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312
25	H1H29196P2	313	314	315	316	317	318	319	320	305	306	307	308	309	310	311	312
26	H1H29198P2	321	322	323	324	325	326	327	328	305	306	307	308	309	310	311	312
27	H1H29207P2	329	330	331	332	333	334	335	336	305	306	307	308	309	310	311	312
28	H1H29214P2	337	338	339	340	341	342	343	344	305	306	307	308	309	310	311	312
29	H1H29215P2	345	346	347	348	349	350	351	352	305	306	307	308	309	310	311	312
30	H1H29209P2	353	354	355	356	357	358	359	360	305	306	307	308	309	310	311	312

Числа, соответствующие V<sub>H</sub>, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, V<sub>L</sub>, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, относятся к SEQ ID NO, изложенным в данном документе. "ПЕП" относится к аминокислотной последовательности; "ДНК" относится к нуклеотидной последовательности.

Имуноглобулиновые последовательности и их соответствующие SEQ ID NO, которые представлены в обобщенном виде в табл. 1-1, представлены ниже. Приведенные ниже последовательности также находятся в Перечне последовательностей, который включен в данный документ посредством ссылки.

SEQ ID NO: 1  
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCT  
CTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATA  
CAGCTTTACCAGTTACTGGATCGTCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGC  
CTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTG  
GTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTC  
AGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC  
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGA  
GACAAGATATAACTGGAACCTACGGGGTT  
TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
SEQ ID NO: 2  
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIVWVRQMPGKGLEWMGIYPG  
DSDTRYSPSFQGGVITISADKSISTAY  
LQWSSLKASDTAMYCARQDITGTTGFDYWGQGLVTVSS;  
SEQ ID NO: 3  
GGA TAC AGC TTT ACC AGT TAC TGG;  
SEQ ID NO: 4  
G Y S F T S Y W;  
SEQ ID NO: 5  
ATC TAT CCT GGT GAC TCT GAT ACC;  
SEQ ID NO: 6  
I Y P G D S D T;  
SEQ ID NO: 7  
GCG AGA CAA GAT ATA ACT GGA ACT ACG GGG TTT GAC TAC;  
SEQ ID NO: 8  
A R Q D I T G T T G F D Y;  
SEQ ID NO: 9  
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA  
GAGCATTAGGAACTATTTGAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT  
AAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT  
TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT  
CACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTTCTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCATTCACTTT  
CGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA  
ACGA;

SEQ ID NO: 10  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ  
 SGVPSRFRSGSGSGTDFLTISSLQP  
 EDFATYFCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKR;  
 SEQ ID NO: 11  
 CAG AGC ATT AGG AAC TAT;  
 SEQ ID NO: 12  
 Q S I R N Y;  
 SEQ ID NO: 13  
 GCT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 14  
 A A S;  
 SEQ ID NO: 15  
 CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCA TTC ACT;  
 SEQ ID NO: 16  
 Q Q S Y S T P F T;  
 SEQ ID NO: 17  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
 TCGGACTCTCCTGTTCAGGCACTGGATT  
 CACCTCAGTAGCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGA  
 CTGGAATGGGTGGCACTTATATCATATG  
 ATGGAAGTAATAAATATTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTC  
 CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTCT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAAAAGTGAAGGACACGGCGATATATTACTGTGCGA  
 AAGAGAGGCTTTTTGGAGTGGTCTCTTA  
 TTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCA;  
 SEQ ID NO: 18  
 QVQLVESGGDVVQPGRLRLSCSGTGFTFSSYAMHWVRQAPGKLEWVALISY  
 DGSNKYYGDSVKGRFTVSRDNSKNTLS  
 LQMNSLKTEDTAIYYCAKERLFGVVSYYGMDVWGQGTITVTVSS;  
 SEQ ID NO: 19  
 GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCC;  
 SEQ ID NO: 20  
 G F T F S S Y A;  
 SEQ ID NO: 21  
 ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA;  
 SEQ ID NO: 22  
 I S Y D G S N K;  
 SEQ ID NO: 23  
 GCG AAA GAG AGG CTT TTT GGA GTG GTC TCT TAT TAC GGT ATG GAC GTC;

SEQ ID NO: 24  
 A K E R L F G V V S Y Y G M D V;  
 SEQ ID NO: 25  
 G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T C T G C A T C T G T A G G A G A C A G  
 A G T C A C C A T C A C T T G C C A G G C G A G T C A  
 G G A C A T T A A T A G G G A T C T A A A T T G G T A T C A G C A G A A A T C A G G G A A A G G C C C C  
 A A A C T C C T G A T C T A C G A T G C A T C C A A T T  
 T G G A A A C A G G G G T C C C A T C A A G G T T C A G T G G A A A T A G A T T T G G G A C A G A T T T  
 T A C T T T C A C C A T C A G C A G A C T G C A G C C T  
 G A A G A T A T T G C A A C A T A T T T C T G T C A A C A G T A T A A A A A T C T C C C G T A C A C T T T  
 T G G C C A G G G A C C A A G C T G G A G A T C A A  
 A C G A;  
 SEQ ID NO: 26  
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q A S Q D I N R D L N W Y Q Q K S G K G P K L L I Y D A S N L E  
 T G V P S R F S G N R F G T D F T F T I S R L Q P  
 E D I A T Y F C Q Q Y K N L P Y T F G Q G T K L E I K R;  
 SEQ ID NO: 27  
 C A G G A C A T T A A T A G G G A T;  
 SEQ ID NO: 28  
 Q D I N R D;  
 SEQ ID NO: 29  
 G A T G C A T C C;  
 SEQ ID NO: 30  
 D A S;  
 SEQ ID NO: 31  
 C A A C A G T A T A A A A A T C T C C G T A C A C T;  
 SEQ ID NO: 32  
 Q Q Y K N L P Y T;  
 SEQ ID NO: 33  
 C A G C 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 A C T G G T G A A G C C T T C G G A G A C C C  
 T G T C C C T C A C C T G C A C T G T C T C T G G T G G  
 C T C C A T C A G C A G T A G T A G T T A C T A C T G G G G C T G G A T C C G C C A G C C C C A G G G  
 A A G G G C C T G G A G T G G A T T G G G A T T A T C T  
 A T T A T A G T G G G A G C A C C T A C T A C A A C C C G T C C C T C A A G A G T C G A G T C A C C A T  
 T T C C G T A G A C A C G T C C A A G A A C C A G T T C  
 T C C C T G A A G C T G A G C T C T G T G A C C G C C G A G A C A C G G C T G T G T A T T A C T G T G C  
 G A G A C A G G A C A G G G A G G C C C T C T T T G A  
 C T A C T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T C T C C T C A;  
 SEQ ID NO: 34

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYY  
 GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQF  
 SLKLSVTAADTAVYYCARQDREALFDYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 35  
 GGT GGC TCC ATC AGC AGT AGT AGT TAC TAC;  
 SEQ ID NO: 36  
 G G S I S S S Y Y;  
 SEQ ID NO: 37  
 ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC;  
 SEQ ID NO: 38  
 I Y Y S G S T;  
 SEQ ID NO: 39  
 GCG AGA CAG GAC AGG GAG GCC CTC TTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 40  
 A R Q D R E A L F D Y;  
 SEQ ID NO: 41  
 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGA  
 AAGTCACCATCACCTGCCGGGCCAGTCA  
 GCGCATTGGTAGTAGCTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCA  
 AAGCTCCTCATCAAGTATGCTTCCAGT  
 CCTTCTCAGGGTCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC  
 ACCCTCACCATCAATAGCCTGGAAGCT  
 GAAGATGCTGCAACGTATTACTGTGCATCAGAGTAGTACTTTACCCACCTTCGG  
 CCAAGGGACACGACTGGAGATTAACG  
 A;  
 SEQ ID NO: 42  
 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQRIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSF  
 GVPSRFSGSGSDFTLTINSLEA  
 EDAATYYCHQSSTLPTFGQGRLEIKR;  
 SEQ ID NO: 43  
 CAG CGC ATT GGT AGT AGC;  
 SEQ ID NO: 44  
 Q R I G S S;  
 SEQ ID NO: 45  
 TAT GCT TCC;  
 SEQ ID NO: 46  
 Y A S;  
 SEQ ID NO: 47  
 CAT CAG AGT AGT ACT TTA CCC ACC;  
 SEQ ID NO: 48

H Q S S T L P T;  
 SEQ ID NO: 49  
 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGCAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
 CAGGTTTGACGATTATGCCATGCACTGGGTCCGACAAGCTCCAGGGAAGGGC  
 CTGGAATGGGTCTCAGGTATTAATGGGA  
 ATAGTGGTGGCAAAGGCTATGCGGACTCTGTGCAGGGCCGATTACCATCTC  
 CAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTTTAT  
 CTGCAAATGAACAGTCTGAGAAGTGGACACGGCCTTGTATTATTGTGCAA  
 AAGATAGGGGTATAGCAGCTCGTCTTCT  
 CTCTCGTGATGCTTTTGATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTT  
 CA;  
 SEQ ID NO: 50  
 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFRDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIN  
 WNSGGKGYADSVQGRFTISRDNKNSLY  
 LQMNSLRTEDTALYYCAKDRGIAARLLSRDAFDMWGQGMVTVSS;  
 SEQ ID NO: 51  
 GGA TTC AGG TTT GAC GAT TAT GCC;  
 SEQ ID NO: 52  
 G F R F D D Y A;  
 SEQ ID NO: 53  
 ATT AAT TGG AAT AGT GGT GGC AAA;  
 SEQ ID NO: 54  
 I N W N S G G K;  
 SEQ ID NO: 55  
 GCA AAA GAT AGG GGT ATA GCA GCT CGT CTT CTC TCT CGT GAT GCT TTT  
 GAT ATG;  
 SEQ ID NO: 56  
 A K D R G I A A R L L S R D A F D M;  
 SEQ ID NO: 57  
 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCTGGCCAGTCA  
 GGACGTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAATCCCTT  
 AAGCTCCTAATCTTTGCTGCATCCACTT  
 TGCAAGGTGGGATCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATT  
 CACTCTCACAATCAGCAGCCTGCGGCCT  
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACACCTTAATACTTACCCGTACACTTT  
 TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA  
 ACGA;  
 SEQ ID NO: 58

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCWASQDVSSYLAWYQKPKGKSPKLLIFAATLQ  
 GGIPSRFSGSGSGTEFTLTISLRP  
 EDFATYYCQHLNTYPYTFGQGTKLEIKR;  
 SEQ ID NO: 59  
 CAG GAC GTT AGC AGT TAT;  
 SEQ ID NO: 60  
 Q D V S S Y;  
 SEQ ID NO: 61  
 GCT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 62  
 A A S;  
 SEQ ID NO: 63  
 CAA CAC CTT AAT ACT TAC CCG TAC ACT;  
 SEQ ID NO: 64  
 Q H L N T Y P Y T;  
 SEQ ID NO: 65  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTTCATT  
 CACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGGCAAGGGG  
 CTGGAGTGGGTGGCAGTTATAAGTTATG  
 ATGGAAGTAATAAAATACTATGGAGACTTCGTGAGGGGCCGATTACCATCTC  
 CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATGTATTATTGTGCGA  
 GAGAAGTTCGTCGCTACTATTATTACGG  
 TATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 66  
 QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASSFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVISY  
 DGSNKYYGDFVRGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAMYYCAREVRRYYYYGMDVWGQGTITVTVSS;  
 SEQ ID NO: 67  
 TCA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC;  
 SEQ ID NO: 68  
 S F T F S S Y G;  
 SEQ ID NO: 69  
 ATA AGT TAT GAT GGA AGT AAT AAA;  
 SEQ ID NO: 70  
 I S Y D G S N K;  
 SEQ ID NO: 71  
 GCG AGA GAA GTT CGT CGC TAC TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC;  
 SEQ ID NO: 72

A R E V R R Y Y Y Y G M D V;  
SEQ ID NO: 73  
G A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C T G T C T G C A T C T G T A G G A G A C A G  
A G T C A C C A T C A C T T G C C A G G C G A G T C A  
G G A C A T T A G T A A T T A T T T A A A T T G G T A T C T G C A G A A A C C A G G G A A A G C C C C T  
A A G C T C C T G A T C T C C G A T G C A T C C A A T T  
T G G A A A C A G G G G T C C C A T C A A G G T T C A G T G G A A G T G G A T C T G G G A C A G A T T T  
T A C T T T C A C C A T C A G C A G C C T G C A G C C T  
G A A G A T A T T G C A A C A T A T T A C T G T C A A C A G T A T A A T A A T C T C C C G C T C A C T T T  
C G G C G G A G G G A C C A A G G T G G A G A T C A A  
A C G A ;  
SEQ ID NO: 74  
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q A S Q D I S N Y L N W Y L Q K P G K A P K L L I S D A S N L E T  
G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P  
E D I A T Y Y C Q Q Y N N L P L T F G G G T K V E I K R ;  
SEQ ID NO: 75  
C A G G A C A T T A G T A A T T A T ;  
SEQ ID NO: 76  
Q D I S N Y ;  
SEQ ID NO: 77  
G A T G C A T C C ;  
SEQ ID NO: 78  
D A S ;  
SEQ ID NO: 79  
C A A C A G T A T A A T A A T C T C C C G C T C A C T ;  
SEQ ID NO: 80  
Q Q Y N N L P L T ;  
SEQ ID NO: 81  
G A A G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C T T G G T A C A G C C T G G C A G G T C C C  
T G A G A C T C T C T G T G C A G T C T C T G G A T T  
C A C C T T T G A T G A T T A T G C C A T G C A C T G G G T C C G G C A A G C T C C A G G G A A G G G C  
C T G G A G T G G G T C T C A G G T A T T A G T T G G A  
A T A G T G G T G A C A T A G A C T A T G C G G A C T C T G T G A A G G G C C G A T T C A C C A T T T C  
C A G A G A C A A C G C C A A G A A C T C C C T G T A T  
C T G C A A A T G A A C A G T C T G A G A G C T G A G G A C A C G G C C T T G T A T T A C T G T G C A A  
A A G A T A C C C T C T C A G G G A C T G G A A C T A C  
G T G G T A C T A T T T T G A C T A C T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T C T C C T C A ;  
SEQ ID NO: 82  
E V Q L V E S G G L V Q P G R S L R L S C A V S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S G I S W  
N S G D I D Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y

LQMNSLRAEDTALYYCAKDTLSGTGTTWYYFDYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 83  
 GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC;  
 SEQ ID NO: 84  
 G F T F D D Y A;  
 SEQ ID NO: 85  
 ATT AGT TGG AAT AGT GGT GAC ATA;  
 SEQ ID NO: 86  
 I S W N S G D I;  
 SEQ ID NO: 87  
 GCA AAA GAT ACC CTC TCA GGG ACT GGA ACT ACG TGG TAC TAT TTT GAC  
 TAC;  
 SEQ ID NO: 88  
 A K D T L S G T G T T W Y Y F D Y;  
 SEQ ID NO: 89  
 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCTGGGCCAGTCA  
 GGGTATTAGCAGTTATTTAATCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCT  
 AAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTT  
 TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATT  
 CACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGTGAATAGTTACCCTCTCACTTT  
 CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA  
 ACGA;  
 SEQ ID NO: 90  
 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWASQGISSYLIWYQQKPGKAPKLLIYAASLQS  
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP  
 EDFATYYCQQVNSYPLTFGGGKVEIKR;  
 SEQ ID NO: 91  
 CAG GGT ATT AGC AGT TAT;  
 SEQ ID NO: 92  
 Q G I S S Y;  
 SEQ ID NO: 93  
 GCT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 94  
 A A S;  
 SEQ ID NO: 95  
 CAA CAG GTG AAT AGT TAC CCT CTC ACT;  
 SEQ ID NO: 96  
 Q Q V N S Y P L T;

SEQ ID NO: 97  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
 CACCTTCAGTAGTTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGA  
 CTGGAGTGGATGGCAGTTATATCATATG  
 ATGGAAGTAATAAATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTC  
 CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAAGACACGGCTGTATATTACTGTGCGC  
 AAGATGGCAGCTCGGCGATTACTATTT  
 CTACGGTATGGACGCTCGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 98  
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWMAVISY  
 DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLF  
 LQMNSLRPEDTAVYYCAQDGSSAIYYFYGMVWVGQTTVTVSS;  
 SEQ ID NO: 99  
 GGA TTC ACC TTC AGT AGT TAT GGC;  
 SEQ ID NO: 100  
 G F T F S S Y G;  
 SEQ ID NO: 101  
 ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA;  
 SEQ ID NO: 102  
 I S Y D G S N K;  
 SEQ ID NO: 103  
 GCG CAA GAT GGC AGC TCG GCG ATT TAC TAT TTC TAC GGT ATG GAC GTC;  
 SEQ ID NO: 104  
 A Q D G S S A I Y Y F Y G M D V;  
 SEQ ID NO: 105  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTATAGGAGACA  
 GAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCA  
 GGACATCAACAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT  
 AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT  
 TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT  
 CACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCT  
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCTTCAGTATAATAGTTACCATCCCCTTT  
 TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA  
 ACGA;  
 SEQ ID NO: 106  
 DIQMTQSPSSLASIGDRVITCRASQDINNYLAWFQKPKGKAPKSLIYAASSLQS  
 GVPSKFSQSGSGTDFLTITSLQP  
 EDFATYYCLQYNSYHPTFGQGTKLEIKR;

SEQ ID NO: 107  
 CAG GAC ATC AAC AAT TAT;  
 SEQ ID NO: 108  
 Q D I N N Y;  
 SEQ ID NO: 109  
 GCT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 110  
 A A S;  
 SEQ ID NO: 111  
 CTT CAG TAT AAT AGT TAC CAT CCC ACT;  
 SEQ ID NO: 112  
 L Q Y N S Y H P T;  
 SEQ ID NO: 113  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT  
 CACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG  
 CTGGAGTGGGTGGCAGCTATATGGTATG  
 ATGGAAGTAATAAATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTC  
 CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGTGCGA  
 GAGGGGAACATTACTATGGTTCGGGGCC  
 GTTCGACCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 114  
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIW  
 YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYFCARGEHYYGSGPFD PWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 115  
 GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC;  
 SEQ ID NO: 116  
 G F T F S S Y G;  
 SEQ ID NO: 117  
 ATA TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA;  
 SEQ ID NO: 118  
 I W Y D G S N K;  
 SEQ ID NO: 119  
 GCG AGA GGG GAA CAT TAC TAT GGT TCG GGG CCG TTC GAC CCC;  
 SEQ ID NO: 120  
 A R G E H Y Y G S G P F D P;  
 SEQ ID NO: 121

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA  
 GAGCATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCT  
 AAGTCCTGATCTTTGCTGCATCCAGTT  
 TACAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATT  
 CACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
 GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCGCTCACTTT  
 CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA  
 ACGA;  
 SEQ ID NO: 122  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISNYLNWYQQKPGKAPKLLIFAASSLQS  
 GVPSRFSGSGTDFTLTISSLQP  
 EDFATYYCQSYSSPLTFGGGKVEIKR;  
 SEQ ID NO: 123  
 CAG AGC ATT AGC AAC TAT;  
 SEQ ID NO: 124  
 Q S I S N Y;  
 SEQ ID NO: 125  
 GCT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 126  
 A A S;  
 SEQ ID NO: 127  
 CAA CAG AGT TAC AGT TCC CCG CTC ACT;  
 SEQ ID NO: 128  
 Q Q S Y S S P L T;  
 SEQ ID NO: 129  
 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCC  
 TGTCCTCACCTGCACTGTCTCAGGTGG  
 CTCCATCAGCAGTTTTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGG  
 AAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCT  
 ATTACAGTGGGAGCATCGACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAATTACCAT  
 ATCAGTCGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
 TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTATTACTGTGC  
 GAGAGAAAGGGACTACGGTGACTACTT  
 TGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 130  
 QQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSFGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYY  
 SGIDYNPSLKSRLTISVDTSKNQF  
 SLKLSSVTAADTAVYYCARERDYGDYFDYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 131

GGT GGC TCC ATC AGC AGT TTT GGT TAC TAC;  
 SEQ ID NO: 132  
 G G S I S S F G Y Y;  
 SEQ ID NO: 133  
 ATC TAT TAC AGT GGG AGC ATC;  
 SEQ ID NO: 134  
 I Y Y S G S I;  
 SEQ ID NO: 135  
 GCG AGA GAA AGG GAC TAC GGT GAC TAC TTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 136  
 A R E R D Y G D Y F D Y;  
 SEQ ID NO: 137  
 GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTCTCTCCAGGGGAAA  
 GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA  
 GAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC  
 AGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCA  
 GGGCCACTGGTGTCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTT  
 CACTCTCACCATCAGCAGTTTGCAGTCT  
 GAGGATTTGCAGTTTATTCCTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCTCACTTT  
 CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA  
 ACGA;  
 SEQ ID NO: 138  
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA  
 TGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQS  
 EDFAVYSCQQYNNWPLTFGGGTKVEIKR;  
 SEQ ID NO: 139  
 CAG AGT GTT AGC AGC AAC;  
 SEQ ID NO: 140  
 Q S V S S N;  
 SEQ ID NO: 141  
 GGT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 142  
 G A S;  
 SEQ ID NO: 143  
 CAG CAG TAT AAT AAC TGG CCT CTC ACT;  
 SEQ ID NO: 144  
 Q Q Y N N W P L T;  
 SEQ ID NO: 145  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT

CACCTTCAGTAGCTATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG  
CTGGAGTGGGTGGCACTTATATGGTATG  
ATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTC  
CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA  
GAGATCAGGATTACTATGGTTCGGGGAG  
TTCCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCA;  
SEQ ID NO: 146  
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGIHWVRQAPGKGLEWVALIWY  
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARDQDYYSYSGSSYGMVWVWGQTTVTVSS;  
SEQ ID NO: 147  
GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC;  
SEQ ID NO: 148  
G F T F S S Y G;  
SEQ ID NO: 149  
ATA TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA;  
SEQ ID NO: 150  
I W Y D G S N K;  
SEQ ID NO: 151  
GCG AGA GAT CAG GAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TCC TAC GGT ATG GAC  
GTC;  
SEQ ID NO: 152  
A R D Q D Y Y G S G S S Y G M D V;  
SEQ ID NO: 153  
GACATCCAGATGACCCAGTCGCCAGCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA  
GAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA  
GAGCATTAGCAGCTATTAAATTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT  
AAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT  
TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT  
CACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTT  
TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA  
ACGA;  
SEQ ID NO: 154  
DIQMTQSPASLSASVDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKRLIYAASSLQS  
GVPSRFSGSGTDFLTISLQP  
EDFATYYCQSYSTPLTFGQGTKLEIKR;  
SEQ ID NO: 155  
CAG AGC ATT AGC AGC TAT;

SEQ ID NO: 156  
 Q S I S S Y;  
 SEQ ID NO: 157  
 G C T G C A T C C;  
 SEQ ID NO: 158  
 A A S;  
 SEQ ID NO: 159  
 C A A C A G A G T T A C A G T A C C C C T C T C A C T;  
 SEQ ID NO: 160  
 Q Q S Y S T P L T;  
 SEQ ID NO: 161  
 C A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C G T G G T C C A G C C T G G G A G G T C C C  
 T G A G A C T C T C C T G T G C A G C G T C T G G A T T  
 C A C C T T C A G T A C C T A T G G C A T G C A C T G G G T C C G C C A G G C T C C A G G C A A G G G G  
 C T G G A G T G G G T G G C A G T T A T A T G G T A T G  
 A T G G A A C T A A T A A A T A C T A T G C A G A C T C C G T G A A G G G C C G A T T C A C C A T C T C  
 C A G A G A C A A T T C C A A G A A C A C G C T G T A T  
 C T G C A A A T G A T C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C G G C T G T G T A T T A C T G T G C G A  
 G A G A C C C C T C A G G T G G G G A C C A C T A C T A  
 T T A C T A C G G T A T G G A C G T C T G G G G C C A A G G G A C C A G G T C A C C G T C T C C T C A;  
 SEQ ID NO: 162  
 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S T Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I W  
 Y D G T N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
 L Q M I S L R A E D T A V Y Y C A R D P S G G D H Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S;  
 SEQ ID NO: 163  
 G G A T T C A C C T T C A G T A C C T A T G G C;  
 SEQ ID NO: 164  
 G F T F S T Y G;  
 SEQ ID NO: 165  
 A T A T G G T A T G A T G G A A C T A A T A A A;  
 SEQ ID NO: 166  
 I W Y D G T N K;  
 SEQ ID NO: 167  
 G C G A G A G A C C C C T C A G G T G G G G A C C A C T A C T A T T A C T A C G G T A T G G A C  
 G T C;  
 SEQ ID NO: 168  
 A R D P S G G D H Y Y Y Y G M D V;  
 SEQ ID NO: 169  
 G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T C T G C A T C T G T A G G A G A C A G  
 A A T C A C C A T C A C T T G C C A G G C G A G T C A

GGACATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCT  
 AACCTCCTGATCTCCGATGCATCCGATT  
 TGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTT  
 TACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT  
 GAAGATTTTGCAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATATAACCGATCACCTT  
 CGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAA  
 ACGA;  
 SEQ ID NO: 170  
 DIQMTQSPSSLASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPNLLISDASDLET  
 GVPSRFSGSGTDFFTISSLQP  
 EDFATYYCQYDNIPITFGQGRLEIKR;  
 SEQ ID NO: 171  
 CAG GAC ATT AGC AAC TAT;  
 SEQ ID NO: 172  
 Q D I S N Y;  
 SEQ ID NO: 173  
 GAT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 174  
 D A S;  
 SEQ ID NO: 175  
 CAA CAG TAT GAT AAT ATA CCG ATC ACC;  
 SEQ ID NO: 176  
 Q Q Y D N I P I T;  
 SEQ ID NO: 177  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC  
 CTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATT  
 CACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG  
 CTGGAGTGGGTGACATTTATATCATTG  
 ATGAAAGGAATAAATACTATGCAGACTCCGTTAAGGGCCGATTCACCATCTC  
 CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTATGTATTACTGTGCGA  
 CGGAAGTCGGGTACAGTTTTGGTCATGA  
 TGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA;  
 SEQ ID NO: 178  
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVTFISFD  
 ERNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAMYCASEVGYSGHDAFDIWGQGMVTVSS;  
 SEQ ID NO: 179  
 GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC;  
 SEQ ID NO: 180

G F T F S S Y G;  
 SEQ ID NO: 181  
 ATA TCA TTT GAT GAA AGG AAT AAA;  
 SEQ ID NO: 182  
 I S F D E R N K;  
 SEQ ID NO: 183  
 GCG AGC GAA GTC GGG TAC AGT TTT GGT CAT GAT GCT TTT GAT ATC;  
 SEQ ID NO: 184  
 A S E V G Y S F G H D A F D I;  
 SEQ ID NO: 185  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCA  
 GGACATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGAAGAAACCAGGGAAAGCCCCT  
 AAACCTCTGATCTACGATGCATCCAATT  
 TGGAAACAGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGGAAGTGGATCTGGGACAGATTT  
 TACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT  
 GAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATTTCCCGCTCACTTT  
 CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA  
 ACGA;  
 SEQ ID NO: 186  
 DIQMTQSPSSLASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQKKPGKAPKLLIYDASNLE  
 TGVPSRFSGSGTDFTFISSLQP  
 EDIATYYCQQYDNFPLTFGGGKVEIKR;  
 SEQ ID NO: 187  
 CAG GAC ATT AGC AAC TAT;  
 SEQ ID NO: 188  
 Q D I S N Y;  
 SEQ ID NO: 189  
 GAT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 190  
 D A S;  
 SEQ ID NO: 191  
 CAA CAG TAT GAT AAT TTC CCG CTC ACT;  
 SEQ ID NO: 192  
 Q Q Y D N F P L T;  
 SEQ ID NO: 193  
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
 CACCTTTAAACAATATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGG  
 CTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTA

GTGGTGATAGCACATACTACTCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC  
 CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA  
 AAGATCAGGGCCTGTATTACTATGGTTC  
 GGGGAGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 194  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMSWVRQAPGRGLEWVSAISG  
 SGDSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCAKDQGLYYYGSGSFDYWQGTLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 195  
 GGA TTC ACC TTT AAC AAC TAT GCC;  
 SEQ ID NO: 196  
 G F T F N N Y A;  
 SEQ ID NO: 197  
 ATT AGT GGT AGT GGT GAT AGC ACA;  
 SEQ ID NO: 198  
 I S G S G D S T;  
 SEQ ID NO: 199  
 GCG AAA GAT CAG GGC CTG TAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 200  
 A K D Q G L Y Y Y G S G S F D Y;  
 SEQ ID NO: 201  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA  
 GAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT  
 AAGCTCCTGATCCAAGCTGCATCCAGTT  
 TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATAT  
 CACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCC  
 GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCATTCACCTT  
 CGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA  
 ACGA;  
 SEQ ID NO: 202  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIQAASSLQS  
 GVPSRFRSGSGTDITLTISSLQP  
 EDFATYYCQSYSTPFTFGPGTKVDIKR;  
 SEQ ID NO: 203  
 CAG AGC ATT AGC AGC TAT;  
 SEQ ID NO: 204  
 Q S I S S Y;  
 SEQ ID NO: 205

GCT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 206  
 A A S;  
 SEQ ID NO: 207  
 CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCA TTC ACT;  
 SEQ ID NO: 208  
 Q Q S Y S T P F T;  
 SEQ ID NO: 209  
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGCAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGTT  
 TGCTTCAGCGACTCTGCTATATACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGG  
 CTGGAGTGGGTTGGCCGCATTAGAAACA  
 AAGCTAATAGGTTCCGCGACAGCATATGGTGCCTCGGTGAAAGGCAGGTTTCCAG  
 CATAACAGAGATGATTCAAAGAACACG  
 GCGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTACT  
 GTGCCAGACATGGACACGATACTTTGAC  
 TGAGGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC  
 TCA;  
 SEQ ID NO: 210  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCAASGFATSDSAIYWVRQASGKGLEWVGRIRNK  
 ANRFATAYGASVKGRFSIHRDSSKNT  
 AYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGHTLTEGYGMDVWQGTTVTVSS;  
 SEQ ID NO: 211  
 GGG TTT GCC TTC AGC GAC TCT GCT;  
 SEQ ID NO: 212  
 G F A F S D S A;  
 SEQ ID NO: 213  
 ATT AGA AAC AAA GCT AAT AGG TTC GCG ACA;  
 SEQ ID NO: 214  
 I R N K A N R F A T;  
 SEQ ID NO: 215  
 GCC AGA CAT GGA CAC GAT ACT TTG ACT GAG GGC TAC GGT ATG GAC  
 GTC;  
 SEQ ID NO: 216  
 A R H G H D T L T E G Y G M D V;  
 Легкая цепь №1 - SEQ ID NO: 217  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA  
 GAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCCCT  
 AAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT

TGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATT  
 CACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
 GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCTCCGATCAC  
 CTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGAT  
 TAAA;  
 Легкая цепь №1-SEQ ID NO: 218  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQS  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP  
 EDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK;  
 SEQ ID NO: 219  
 CAG AGC ATT AGC AGC TAT;  
 SEQ ID NO: 220  
 Q S I S S Y;  
 SEQ ID NO: 221  
 GCT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 222  
 A A S;  
 SEQ ID NO: 223  
 CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CCG ATC ACC;  
 SEQ ID NO: 224  
 Q Q S Y S T P P I T;  
 SEQ ID NO: 225  
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTAAGAACCCTGGGTCCTCGG  
 TGAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGG  
 CACCTTCAGCAGTTATACTATCAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGG  
 CTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTC  
 TCTATGGAACAGCAAACACTACGCACAGAAGTCCAGGCCAGAGTCACGATTC  
 CACGGACGAATCCACGAACACAGCCTAC  
 ATGGAACAGCAACCTGAGATTTGAAGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGA  
 GTACACTGGAACACGGGCTTTTGATGC  
 CTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA;  
 SEQ ID NO: 226  
 QVQLVQSGAEVKNPSSVSKVSKASGGTFSSYTINWVRQAPGQGLEWMGGIPL  
 YGTANYAQKFKARVTISTDESTNTAY  
 MELSNLRFEDTAVYFCASTLELRAFDADFIDWGGTMVTVSS;  
 SEQ ID NO: 227  
 GGA GGC ACC TTC AGC AGT TAT ACT;  
 SEQ ID NO: 228  
 G G T F S S Y T;  
 SEQ ID NO: 229

ATC ATC CCT CTC TAT GGA ACA GCA;  
 SEQ ID NO: 230  
 I I P L Y G T A;  
 SEQ ID NO: 231  
 GCG AGT ACA CTG GAA CTA CGG GCT TTT GAT GCC TTT GAT ATC;  
 SEQ ID NO: 232  
 A S T L E L R A F D A F D I;  
 SEQ ID NO: 233  
 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCC  
 TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGG  
 CTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAAGTGGATCCGCCAGCACCCAGGG  
 AAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCT  
 ATTACAGTGGAAAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCAT  
 ATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
 TCCCTGAAGCTGGGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC  
 GCGAGCTCCTCCTTATAACTGGTTGA  
 CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 234  
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGSISGGYYWNWIRQHPGKLEWIGYIYY  
 SGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQF  
 SLKLGSVTAADTAVYYCARAPPYNWFDYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 235  
 GGT GGC TCC ATC AGC AGT GGT GGT TAC TAC;  
 SEQ ID NO: 236  
 G G S I S S G G Y Y;  
 SEQ ID NO: 237  
 ATC TAT TAC AGT GGA AGC ACC;  
 SEQ ID NO: 238  
 I Y Y S G S T;  
 SEQ ID NO: 239  
 GCG CGA GCT CCT CCT TAT AAC TGG TTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 240  
 A R A P P Y N W F D Y;  
 SEQ ID NO: 241  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
 CACCTTCAGTGACTACTACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG  
 CTGGAATGGGTTTCATACATTAGTAATA  
 GTGGTAATACCAATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC  
 CAGGGACAATGCCAAGAACTCCCTGTTT

CTGCAAATGAACAGCCTGCGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTACGA  
 GAGAGGGACTCGAATATAGCAGCTCGGA  
 GCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 242  
 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYIMNWVRQAPGKGLEWVSYISN  
 SGNLQYYADSVKGRFTISRDNKNSLF  
 LQMNSLRAEDTAVYYCTREGLEYSSEPFDYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 243  
 GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAC TAC;  
 SEQ ID NO: 244  
 G F T F S D Y Y;  
 SEQ ID NO: 245  
 ATT AGT AAT AGT GGT AAT ACC CAA;  
 SEQ ID NO: 246  
 I S N S G N T Q;  
 SEQ ID NO: 247  
 ACG AGA GAG GGA CTC GAA TAT AGC AGC TCG GAG CCC TTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 248  
 T R E G L E Y S S E P F D Y;  
 SEQ ID NO: 249  
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG  
 TGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGATA  
 CACCTTACC GCCTACTACATACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGG  
 CTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTA  
 ACAATGGTGACACAACTATGCACTGAGGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGAC  
 CAGGGACATGTCCATCAACACAGCCTAC  
 ATGGAGCTGCGCGGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTATTATTGTGCGA  
 GAGATGATCTAGCAGCAGCGGGTATCGG  
 CTGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 250  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYFTAYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIN  
 PNNGDTNYALRFQGRVTMTRDMSINTAY  
 MELRGLRSDDTAVYYCARDLAAAGIGWFDSWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 251  
 GGA TAC ACC TTC ACC GCC TAC TAC;  
 SEQ ID NO: 252  
 G Y T F T A Y Y;  
 SEQ ID NO: 253  
 ATC AAC CCT AAC AAT GGT GAC ACA;  
 SEQ ID NO: 254

I N P N N G D T;  
 SEQ ID NO: 255  
 GCG AGA GAT GAT CTA GCA GCA GCG GGT ATC GGC TGG TTC GAC TCC;  
 SEQ ID NO: 256  
 A R D D L A A A G I G W F D S;  
 SEQ ID NO: 257  
 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGCTACAGCCTGGCAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATT  
 CACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGC  
 CTGGAGTGGGTCTCAGGAATTAGTTGGA  
 ATAGTAAAAGTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAGGGGCCGATTACCATTTTC  
 CAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTAT  
 CTCCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAA  
 AAGCCCCGTATAGTGGGACCTACTTCGA  
 ATACTCCGCCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 258  
 EVQLVESGGGLLQPGRSLRLSCVASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW  
 NSESIGYADSVRGRFTISRDNAKNSLY  
 LQMNSLRAEDTALYYCAKAPYSGTYFEYFRHWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 259  
 GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC;  
 SEQ ID NO: 260  
 G F T F D D Y A;  
 SEQ ID NO: 261  
 ATT AGT TGG AAT AGT GAA AGT ATA;  
 SEQ ID NO: 262  
 I S W N S E S I;  
 SEQ ID NO: 263  
 GCA AAA GCC CCG TAT AGT GGG ACC TAC TTC GAA TAC TTC CGC CAC;  
 SEQ ID NO: 264  
 A K A P Y S G T Y F E Y F R H;  
 SEQ ID NO: 265  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
 CACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG  
 CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATG  
 ATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGGCCGATTACCATCTC  
 CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA  
 AAGATGACTGGAACACTACGACGCCTTTGA

TATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA;  
 SEQ ID NO: 266  
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISY  
 DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCAKDDWNYDAFDIWGQGMVTVSS;  
 SEQ ID NO: 267  
 GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC;  
 SEQ ID NO: 268  
 G F T F S S Y G;  
 SEQ ID NO: 269  
 ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA;  
 SEQ ID NO: 270  
 I S Y D G S N K;  
 SEQ ID NO: 271  
 GCG AAA GAT GAC TGG AAC TAC GAC GCC TTT GAT ATC;  
 SEQ ID NO: 272  
 A K D D W N Y D A F D I;  
 SEQ ID NO: 273  
 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCC  
 TGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGG  
 CTCCATCAGCAGTAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGG  
 AGGGGCCCTGGAGTGGATTGGATACATCT  
 ATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCAT  
 ATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
 TCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC  
 GAGAGTGGACTATGGTTCGGGGAGTTC  
 GTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCTCA;  
 SEQ ID NO: 274  
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGYYSWIRQHPGRGLEWIGYIYY  
 SGSTYYNPSLKSRTVTSVDTSKNQF  
 SLKLSVTAADTAVYYCARVDYGSSSFDYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 275  
 GGT GGC TCC ATC AGC AGT AGT GGT TAC TAC;  
 SEQ ID NO: 276  
 G G S I S S S G Y Y;  
 SEQ ID NO: 277  
 ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC;  
 SEQ ID NO: 278  
 I Y Y S G S T;  
 SEQ ID NO: 279

GCG AGA GTG GAC TAT GGT TCG GGG AGT TCG TTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 280  
 A R V D Y G S G S S F D Y;  
 SEQ ID NO: 281  
 CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG  
 TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTA  
 CACCTTTACCAGCTATGGCATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGG  
 CTTGAGTGGCTGGGATGGATCAGCGGTT  
 TCAATGGTAGAACAGACTATACAGAGAAGCTCCAGGACAGAATCACCATGA  
 CCACAGACAGATCCTCGAGCACAGCCTAC  
 ATGGAAGTGGAGCCTGAGATATGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA  
 GAGATGGACTGGAAAACTTGGTGACTA  
 CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 282  
 VQQLVQSGPEVKKPGASVKVSKASGYTFSTYGISWVRQAPGQGLEWLGWISG  
 FNGRFDYTEKLDKDRITMTDRSSSTAY  
 MELRSLRYDDTAVYYCARDGLEKLGDIYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 283  
 GGT TAC ACC TTT ACC AGC TAT GGC;  
 SEQ ID NO: 284  
 G Y T F T S Y G;  
 SEQ ID NO: 285  
 ATC AGC GGT TTC AAT GGT AGA ACA;  
 SEQ ID NO: 286  
 I S G F N G R T;  
 SEQ ID NO: 287  
 GCG AGA GAT GGA CTG GAA AAA CTT GGT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 288  
 A R D G L E K L G D Y;  
 SEQ ID NO: 289  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCGGGGAGGTTCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT  
 CACCTTCAGTAACTCTGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG  
 CTGGAGTGGGTGGCAGGAATATGGCATG  
 ATGGAAGTTATAAATATTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTC  
 CAGAGACAATTCTAAGAACACGCTGTTT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGCGA  
 GAGATGATTACTATGCTTCGGGGACCAG  
 CGTGGACGTATGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 290

QVQLVESGGGVVQPGRFLRLSCAASGFTFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAGIW  
 HDGSYKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLF  
 LQMNSLRAEDTAVYYCARDYYASGTSVDVWGQGTITVTVSS;  
 SEQ ID NO: 291  
 GGA TTC ACC TTC AGT AAC TCT GGC;  
 SEQ ID NO: 292  
 G F T F S N S G;  
 SEQ ID NO: 293  
 ATA TGG CAT GAT GGA AGT TAT AAA;  
 SEQ ID NO: 294  
 I W H D G S Y K;  
 SEQ ID NO: 295  
 GCG AGA GAT GAT TAC TAT GCT TCG GGG ACC AGC GTG GAC GTA;  
 SEQ ID NO: 296  
 A R D D Y Y A S G T S V D V;  
 SEQ ID NO: 297  
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG  
 TGAGGGTCTCTGCATGGCCTCTGGATA  
 CACCTTACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGG  
 CTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTA  
 ACAGTGGTGGCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGAC  
 CAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC  
 ATGGAGCTGAGCAGACTGAGATCTGACGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA  
 GAGAAGAAGTCGACGATTTTTGGAGTGG  
 TTACCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 298  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCMASGYFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWI  
 NPNSGGTKYAQKFQGRVTMTRDTSISTAY  
 MELSRRLSDDTAVYYCAREEVDDFWSGYLDYWGQGLTVTVSS;  
 SEQ ID NO: 299  
 GGA TAC ACC TTC ACC GGC TAC TAT;  
 SEQ ID NO: 300  
 G Y T F T G Y Y;  
 SEQ ID NO: 301  
 ATC AAC CCT AAC AGT GGT GGC ACA;  
 SEQ ID NO: 302  
 I N P N S G G T;  
 SEQ ID NO: 303  
 GCG AGA GAA GAA GTC GAC GAT TTT TGG AGT GGT TAC CTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 304

A R E E V D D F W S G Y L D Y;  
 Легкая цепь №2 - SEQ ID NO: 305  
 GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
 GAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA  
 GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT  
 CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA  
 GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA  
 CTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG  
 CCTGAAGATTTTCAGTGTATTACTGTCCAGCAGTATGGTAGCTCACCTTGGAC  
 GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAAT  
 CAAA;  
 Легкая цепь №2 - SEQ ID NO: 306  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRA  
 TGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLE  
 PEDFAVYYCQYGGSPWTFGQGTKVEIK;  
 SEQ ID NO: 307  
 CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC;  
 SEQ ID NO: 308  
 Q S V S S S Y;  
 SEQ ID NO: 309  
 GGT GCA TCC;  
 SEQ ID NO: 310  
 G A S;  
 SEQ ID NO: 311  
 CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCT TGG ACG;  
 SEQ ID NO: 312  
 Q Q Y G S S P W T;  
 SEQ ID NO: 313  
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGACTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTT  
 CGCCGTCAATGGCGACTATTTAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG  
 CTGGAGTGGATCTCAGTTATTTATAGCA  
 GTGGTAACACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG  
 ACACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT  
 CAAATGAGCAGCCTAAGACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG  
 ACTTCCCTCCAATGTCTGGTGCAGGACTA  
 CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 314  
 EVQLVESGGDLVQPGGSLRSLCAASGFAVNGDYFSWVRQAPGKGLEWISVIYSS  
 GNTYYADSVKGRFTISRHNSKNTLYL

QMSSLRPEDTAVYYCARDFPMSGADYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 315  
 GGG TTC GCC GTC AAT GGC GAC TAT;  
 SEQ ID NO: 316  
 G F A V N G D Y;  
 SEQ ID NO: 317  
 ATT TAT AGC AGT GGT AAC ACA;  
 SEQ ID NO: 318  
 I Y S S G N T;  
 SEQ ID NO: 319  
 GCG AGA GAC TTC CCT CCA ATG TCT GGT GCG GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 320  
 A R D F P P M S G A D Y;  
 SEQ ID NO: 321  
 CAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG  
 TGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGATA  
 CACCCTCACTGAATTGTCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGAAAAGGG  
 CTTGAATGGATGGGAGGTTTIGATCCTG  
 AACATGGTAAAATAATCTACGCACAGAAATCCAGGGCAGAGTCACCATGAC  
 CGAGGACACATCTACAGACACAGCCTAC  
 ATGGAAGTACTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAA  
 CATTTATAACTGGAACCTACTACTT  
 CGGTATGGACGTCTGGGGCCACGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 322  
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWRQAPGKGLEWMGGFD  
 PEHGKIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAY  
 MELSSLRSEDVAVYYCATFYWNWSYYFGMDVWGHGTTVTVSS;  
 SEQ ID NO: 323  
 GGA TAC ACC CTC ACT GAA TTG TCC;  
 SEQ ID NO: 324  
 G Y T L T E L S;  
 SEQ ID NO: 325  
 TTT GAT CCT GAA CAT GGT AAA ATA;  
 SEQ ID NO: 326  
 F D P E H G K I;  
 SEQ ID NO: 327  
 GCA ACA TTT TAT AAC TGG AAC TCC TAC TAC TTC GGT ATG GAC GTC;  
 SEQ ID NO: 328  
 A T F Y N W N S Y Y F G M D V;  
 SEQ ID NO: 329

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC  
 CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
 CACCTTAGCAGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGA  
 CTGGAGTGGGTCTCAGCTGTTAGTGGAA  
 GTGCTGATATCACAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC  
 CAGAGACAATTCCAAACACACGCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA  
 AGGATAAAGTGTATAACTGGAACACGG  
 GATCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC  
 TCA;  
 SEQ ID NO: 330  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAVSG  
 SADITNYADSVKGRFTISRDNKHTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCAKDKVYNWNYGIYYGMDVWGQGTITVTVSS;  
 SEQ ID NO: 331  
 GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT GCC;  
 SEQ ID NO: 332  
 G F T F S S Y A;  
 SEQ ID NO: 333  
 GTT AGT GGA AGT GCT GAT ATC ACA;  
 SEQ ID NO: 334  
 V S G S A D I T;  
 SEQ ID NO: 335  
 GCG AAG GAT AAA GTG TAT AAC TGG AAC TAC GGG ATC TAC TAC GGT  
 ATG GAC GTC;  
 SEQ ID NO: 336  
 A K D K V Y N W N Y G I Y Y G M D V;  
 SEQ ID NO: 337  
 CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC  
 TGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGG  
 CTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGG  
 AAGGGACTAGAGTGGATTGGGAGTATCT  
 ATTATAGTGGGAGCACCTACTACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCAT  
 ATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC  
 TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGC  
 GAGACAAGGGAGGTGGGAGCGAGAAAA  
 CTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 338  
 QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS  
 GSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQF

SLKLSSVTAADTAVYYCARQGRWERENFDYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 339  
 GGT GGC TCC ATC AGC AGT AGT AGT TAC TAC;  
 SEQ ID NO: 340  
 G G S I S S S Y Y;  
 SEQ ID NO: 341  
 ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC;  
 SEQ ID NO: 342  
 I Y Y S G S T;  
 SEQ ID NO: 343  
 GCG AGA CAA GGG AGG TGG GAG CGA GAA AAC TTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 344  
 A R Q G R W E R E N F D Y;  
 SEQ ID NO: 345  
 CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTATTGAAGCCCTTCGGAGACCC  
 TGTCCTCACCTGCGCTGTCTCTGATGA  
 GTCCTTCAGTGATTACTACTGGACCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGG  
 CTGGAGTGGATTGGGAAATTACTCATA  
 GTGGAAGTACCCACTACAACCCGTCCTCAAGAGCCGAGTCACCCTGTCAGT  
 TGACACGTCCAAGAACCCTTCTCCCTG  
 AGCCTCAACTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTATTTACTGTGCGAGAG  
 GCGGTGACTACGGTGGTTTACTTGACTA  
 CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA;  
 SEQ ID NO: 346  
 QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVSDESFSDYYWTWIRQPPGKLEWIGEITHS  
 GSTHYNPSLKSRTLSDVTSKNHFSL  
 SLNSVTAADTAIYYCARGGDYGGLLDYWGQGLVTVSS;  
 SEQ ID NO: 347  
 GAT GAG TCC TTC AGT GAT TAC TAC;  
 SEQ ID NO: 348  
 D E S F S D Y Y;  
 SEQ ID NO: 349  
 ATT ACT CAT AGT GGA AGT ACC;  
 SEQ ID NO: 350  
 I T H S G S T;  
 SEQ ID NO: 351  
 GCG AGA GGC GGT GAC TAC GGT GGT TTA CTT GAC TAC;  
 SEQ ID NO: 352  
 A R G G D Y G G L L D Y;  
 SEQ ID NO: 353

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGGAGACCC  
 TGTCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGG  
 CTCCATCAGCAGTAGGAGTCACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGG  
 AAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCT  
 ATTATAGTGGAGCACCTATTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCAT  
 ATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC  
 TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGAGACACGGCTGTGTATTACTGTGC  
 GAGACTTGGCTGGTACGCAGAGGAGGC  
 TTTTGAAATCTGGGGTCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTCA;  
 SEQ ID NO: 354  
 QLQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSRSHYWGWRQPPGKLEWIGSIYYS  
 GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQF  
 SLKLSVTAADTAVYYCARLGWYAEFAFEIWGQGMVTVSS;  
 SEQ ID NO: 355  
 GGT GGC TCC ATC AGC AGT AGG AGT CAC TAC;  
 SEQ ID NO: 356  
 G G S I S R S H Y;  
 SEQ ID NO: 357  
 ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC;  
 SEQ ID NO: 358  
 I Y Y S G S T;  
 SEQ ID NO: 359  
 GCG AGA CTT GGC TGG TAC GCA GAG GAG GCT TTT GAA ATC;  
 SEQ ID NO: 360  
 A R L G W Y A E E A F E I

Пример 2. Анализ подавления роста для оценки способности анти-PfRH5 антител ингибировать инвазию *in vitro* эритроцитов человека и рост паразитов *P. falciparum*.

В этом примере набор из четырех PfRH5-специфических mAb по данному изобретению тестировали отдельно и в комбинации в стандартном анализе подавления роста с одним штаммом *Plasmodium falciparum* (Dd2).

#### Экспериментальная процедура

Штамм *P. falciparum*, Dd2 (BEI Resources) сначала синхронизировали с 5% D-сорбитом в соответствии со стандартными протоколами при гематокрите 3-5% и паразитемии 1-2% за 20-24 ч до начала анализа. Инфицированные эритроциты человека получали при исходной паразитемии 0,4-0,7% и гематокрите 2%. Инфицированные эритроциты объединяли с PfRH5-специфическими или контрольными антителами, начиная с концентрации 666,67 нМ при последовательном разведении 1:5 для каждого антитела или комбинации антител. Все использованные антитела представляли собой IgG1 человека. Паразитов выращивали в течение 40-48 ч до достижения стадии шизонта (один полный жизненный цикл). Рост паразитов останавливали тремя промывками холодным ФСБ. Окончательную паразитемию определяли путем измерения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита (Miura, H. Zhou, A. Diouf, SE. Moretz, MP. Fay, LH. Miller, LB. Martin, MA. Pierce, RD. Ellis, GED. Mullen, CA. Long. Anti-Apical-Membrane-Antigen-1 antibody is more effective than anti-42-kilodalton-Merozoite-Surface-Protein-1 antibody in inhibiting *Plasmodium falciparum* growth, as determined by the *in vitro* growth inhibition assay. Clin Vaccine Immunol. 16, 963-968 (2009). PMID: PMC2708396). Процент подавления роста выражается по сравнению с неинфицированными эритроцитами.

#### Обобщенные результаты и выводы

PfRH5-специфические антитела получали и тестировали *in vitro* в анализе подавления роста в адаптированном для лаборатории штамме, как описано выше. В табл. 2-1 показан максимальный процент подавления роста для подгруппы PfRH5-специфических антител и комбинаций PfRH5-специфических антител. Индивидуальные антитела и комбинации антител демонстрировали аналогичный процент максимального подавления роста в диапазоне приблизительно 51-69%.

Таблица 2-1. Обобщенные результаты максимальной ингибирующей активности антител против PfRH5 в отношении роста штамма *Plasmodium falciparum* Dd2.\*

mAb/комбинация mAb	Максимальное подавление роста (%)
	Dd2
H1H29127P+H1H29100P	66,33
H1H29127P+H1H29143P	51,37
H1H29127P+H1H29104P	56,96
H1H29100P+H1H29143P	68,70
H1H29100P+H1H29104P	54,04
H1H29143P+H1H29104P	58,54
H1H29100P	65,73
H1H29104P	54,12
H1H29127P	56,87
H1H29143P	56,00
антитело отрицательного контроля IgG1 человека, специфическое к антигену аллергии на кошек - Fel d 1	-0,93

\*Максимальное подавление роста антителами против PfRH5 по сравнению с неинфицированными эритроцитами человека. Анализ подавления роста проводили на эритроцитах, инфицированных *P. falciparum* (зрелый трофозоит или ранний шизонт), при 0,4-0,7% паразитемии. Антитела объединяли с инфицированными эритроцитами.

Паразитов выращивали в течение 40-48 ч (время зависело от штамма паразита) до достижения стадии шизонта. Рост паразитов останавливали тремя промывками холодного PBS. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита измеряли непосредственно после промывки. Процент подавления роста выражали по отношению к неинфицированным эритроцитам. Результаты одного типичного анализа подавления роста показаны выше.

Пример 3. Анализ подавления роста для оценки способности анти-PfRH5 антител подавлять инвазию *in vitro* эритроцитов человека и рост паразитов *P. falciparum* в комбинации с хлорохином.

В этом примере подмножество четырех PfRH5-специфических mAb по данному изобретению тестировали отдельно и в комбинации с хлорохином (CQ), широко распространенным противомаларийным лекарственным препаратом, в стандартном анализе подавления роста с двумя лабораторными штаммами. Один штамм паразита *Plasmodium falciparum*, 3D7, является чувствительным к хлорохину, в то время как штамм 7G8 является устойчивым к этому лекарственному препарату.

#### Экспериментальная процедура

Каждый штамм *P. falciparum* (BEI Resources) сначала синхронизировали с 5% D-сорбитом в соответствии со стандартными протоколами при гематокрите 3-5% и паразитемии 1-2% за 20-24 ч до начала анализа. Инфицированные эритроциты человека получали при исходной паразитемии 0,4-0,7% и гематокрите 2%. Инфицированные эритроциты объединяли с PfRH5-специфическими или контрольными антителами, начиная с концентрации 666,67 нМ при последовательном разведении 1:5 для каждого антитела IgG1 и хлорохина в одной из двух концентраций 4,91 или 6,58 нМ. Две концентрации выбирали на основе IC<sub>25</sub>, 4,91 нМ, и IC<sub>50</sub>, 6,58 нМ хлорохина с чувствительным штаммом 3D7. Паразитов выращивали в течение 40-48 ч до достижения стадии шизонта (один полный жизненный цикл). Рост паразитов останавливали тремя промывками холодного PBS. Окончательную паразитемию определяли путем измерения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита. Процент подавления роста выражали по отношению к неинфицированным эритроцитам.

#### Обобщенные результаты и выводы

В табл. 3-1 показан максимальный процент подавления роста для каждого антитела отдельно и комбинации антитело/хлорохин. Комбинирование хлорохина с PfRH5-специфическими антителами дополнительно увеличивало процент максимального подавления роста, полученного с использованием только антител, в штамме 3D7. Максимальное подавление роста с использованием только антитела составляло приблизительно от 34 до 61%, в то время как добавление 4,81 нМ CQ к mAb приводило к аналогичному максимальному ингибированию роста (от 32 до 51%). Добавление 6,58 нМ CQ к mAb увеличивало диапазон подавления роста по меньшей мере с 20% до 59-75%. С другой стороны, отдельные антитела и комбинации антитело/лекарственный препарат демонстрировали аналогичный процент максимального подавления роста со штаммом 7G8 (только mAb: 47-51%; mAb+4,81 нМ CQ: 44-53%; mAb+6,58 нМ CQ: 30-52%).

Таблица 3-1. Обобщенные результаты максимальной ингибирующей активности антител против PfRH5 в отношении роста различных штаммов *Plasmodium falciparum*. \*

Хлорохина фосфат	mAb	Максимальное подавление роста (%)	
		3D7	7G8
Нет данных	H1H29089P	61,06	51,10
	H1H29100P	58,02	48,85
	H1H29147P2	34,93	47,34
	H1H29187P2	47,58	49,30
4,81 нМ	H1H29089P	51,32	48,69
	H1H29100P	46,64	53,76
	H1H29147P2	31,45	44,22
	H1H29187P2	44,53	48,70
6,58 нМ	H1H29089P	75,59	52,78
	H1H29100P	71,21	50,67
	H1H29147P2	59,11	29,96
	H1H29187P2	71,20	38,95

\*Максимальное подавление роста антителами против PfRH5 по сравнению с неинфицированными эритроцитами человека. Анализ подавления роста проводили на эритроцитах, инфицированных *P. falciparum* (зрелый трофозоит или ранний шизонт), при 0,4-0,7% паразитемии. Антитела объединяли с инфицированными эритроцитами. Паразитов выращивали в течение 40-48 ч (в зависимости от штамма паразита) до достижения стадии шизонта. Рост паразитов останавливали тремя промывками холодного PBS. Активность лактатдегидрогеназы паразита измеряли непосредственно после промывки. Процент подавления роста выражали по отношению к неинфицированным эритроцитам. Результаты одного типичного анализа подавления роста показаны выше.

Пример 4. Анализ подавления роста для оценки способности анти-PfRH5 антител подавлять инвазию *in vitro* эритроцитов человека и рост паразитов *P. falciparum*.

В этом примере набор из 30 PfRH5-специфических mAb по данному изобретению тестировали в стандартном анализе подавления роста против ряда распространенных лабораторных штаммов (как чувствительных, так и устойчивых к различным противомаларийным препаратам) и клинических линий с множественной лекарственной устойчивостью.

#### Экспериментальная процедура

Каждый штамм *P. falciparum* (BEI Resources) сначала синхронизировали с 5% D-сорбитом в соответствии со стандартными протоколами при гематокрите 3-5% и паразитемии 1-2% за 20-24 ч до начала анализа. Инфицированные эритроциты человека получали при исходной паразитемии 0,4-0,7% и гематокрите 2%. Инфицированные эритроциты объединяли с PfRH5-специфическими или контрольными антителами IgG1, начиная с концентрации 666,67 нМ при последовательном разведении 1:5 для каждого антитела. Паразитов выращивали в течение 40-48 ч до достижения стадии шизонта (один полный жизненный цикл). Рост паразитов останавливали тремя промывками холодного PBS. Окончательную паразитемию определяли путем измерения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита (Miura et al., Clin Vaccine Immunol. 16: 963-968 (2009). PMID: PMC2708396). Процент подавления роста выражали по отношению к неинфицированным эритроцитам.

#### Обобщенные результаты и выводы

В табл. 4-1 показан максимальный процент подавления роста для каждого из 30 PfRH5-специфических mAb, тестируемых при 666,67 нМ. Применение нескольких антител приводило к снижению роста во всех тестируемых лабораторно адаптированных и клинических штаммах *P. falciparum*.

Таблица 4-1. Обобщенные результаты максимальной ингибирующей активности антител против PfPRH5 в отношении роста различных штаммов *Plasmodium falciparum*.\*

mAb	Максимальное подавление роста (%)								
	D10	Dd2	7G8	W2-mef	3D7	HB3	FCR-1/FV O	Cam3.1 I	RF7
H1H29089P	82,32	71,29	70,09	66,39	67,59	59,15	65,98	56,16	28,95
H1H29094P	35,86	41,58	29,95	34,94	14,38	45,39	51,23	26,18	15,23
H1H29100P	81,73	64,60	66,40	67,29	61,80	62,61	66,89	52,44	17,02
H1H29104P	55,70	61,31	35,16	47,40	34,42	39,81	67,38	50,02	23,62
H1H29106P	74,86	53,97	55,49	48,93	57,97	48,36	54,28	51,68	27,41
H1H29109P	44,79	42,05	39,04	37,92	32,22	32,24	56,74	35,91	8,24
H1H29125P	75,39	51,39	46,96	64,57	51,14	52,09	67,62	42,69	20,99
H1H29127P	74,44	64,67	61,19	53,61	63,90	59,36	61,13	47,00	25,68
H1H29131P	63,00	68,75	50,30	63,16	50,61	59,45	71,77	50,18	26,66
H1H29134P	50,59	39,99	34,84	26,89	40,72	28,21	41,17	28,53	16,69
H1H29138P	57,06	74,44	57,36	66,44	58,45	51,38	84,07	48,69	51,37
H1H29141P	50,01	65,27	54,63	56,19	48,20	49,98	74,25	49,31	32,06
H1H29143P	79,41	62,70	61,87	58,27	60,27	60,87	67,19	53,25	28,21
H1H29146P2	10,78	26,90	19,07	0,57	8,57	33,87	7,32	8,18	5,97
H1H29147P2	81,44	65,31	65,20	64,71	60,27	64,85	70,32	51,93	31,44
H1H29149P2	66,03	50,32	41,38	42,77	44,15	40,01	57,98	36,22	14,74
H1H29151P2	38,66	57,97	47,52	53,90	35,49	31,74	53,70	26,34	18,26
H1H29163P2	71,83	61,17	62,62	63,66	55,62	56,45	64,52	46,72	10,73
H1H29166P2	70,94	60,02	54,60	61,87	53,11	54,93	69,69	55,90	19,41
H1H29171P2	10,60	7,71	17,03	0,74	4,04	0,52	11,67	5,45	-12,52
H1H29179P2	62,50	13,49	34,11	22,88	24,24	40,86	49,01	33,41	-2,99
H1H29183P2	6,79	0,68	17,83	-0,55	5,68	4,92	16,05	8,66	-6,27
H1H29187P2	79,61	66,02	71,80	67,28	70,71	63,91	72,16	49,22	32,73
H1H29192P2	8,70	-15,16	12,42	4,35	-1,03	5,62	15,10	-3,38	-7,69
H1H29196P2	14,33	-1,65	23,44	17,00	6,72	26,76	21,94	6,09	3,78
H1H29198P2	4,38	10,13	5,31	-3,61	-5,40	15,53	11,08	14,66	1,53
H1H29207P2	73,90	61,30	58,68	65,21	61,84	49,30	69,23	45,30	31,06
H1H29209P2	72,66	38,09	49,89	39,61	48,32	52,40	19,16	47,26	11,91
H1H29214P2	76,52	47,21	56,74	52,72	52,09	59,09	13,05	46,67	11,18
H1H29215P2	35,80	22,79	33,23	37,23	19,97	30,11	54,03	27,22	11,28

Антитело отрицательного контроля IgG1 человека, специфическое к антигену аллергии на кошек - Fel d 1	-1,42	11,02	-11,68	6,66	13,18	27,50	4,04	-0,41	-6,62
--	-------	-------	--------	------	-------	-------	------	-------	-------

\*Максимальное подавление роста антителами против PfrH5 по сравнению с неинфицированными эритроцитами человека. Анализ подавления роста проводили на эритроцитах, инфицированных *P. falciparum* (зрелый трофозоит или ранний шизонт), при 0,4-0,7% паразитемии. Антитела объединяли с инфицированными эритроцитами. Паразитов выращивали в течение 40-48 часов (в зависимости от штамма паразита) до достижения стадии шизонта. Рост паразитов останавливали тремя промывками холодного PBS. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита измеряли непосредственно после промывки. Процент подавления роста выражается по сравнению с неинфицированными эритроцитами. Результаты одного типичного анализа подавления роста для каждого штамма *P. falciparum* показаны выше.

Пример 5. Кинетика связывания согласно Вiasoge для связывания анти-PfrH5 моноклональных антител с PfrH5ΔNL.his при 25 и 37°C.

В этом примере определяли кинетику связывания различных анти-PfrH5 антител по данному изобретению.

Константы равновесной диссоциации ( $K_D$ ) для различных реагентов PfrH5, связывающихся с очищенными анти-PfrH5 моноклональными антителами, определяли с использованием биосенсора Вiasoge T200 на основе поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени. Все исследования связывания выполняли в рабочем буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25 и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Вiasoge CM4 сначала дериватизировали путем иммобилизации по аминогруппе с козьим анти-Fcγ человека специфическим поликлональным антителом (Jackson ImmunoResearch Laboratories, № по каталогу 109-005-098) или кроличьим анти-Fcγ мыши специфическим поликлональным антителом (GE Healthcare № по каталогу BR100838) для захвата анти-PfrH5 моноклональных антител IgG1. Исследования связывания проводили на рекомбинантном PfrH5 с удалением аминоконца M1-Y139 и содержащим остатки K140-Q526, но не имеющим K247-L295, и T216A и T299A экспрессируемыми с помощью С-концевой гексагистидиновой метки (PfrH5ΔNL.6his). Различные концентрации PfrH5ΔNL.6his (3,125-50 нМ; 2-кратное последовательное разведение или 0,48-60 нМ; 5-кратное последовательное разведение) сначала получали в рабочем буфере HBS-ET и вводили над поверхностью анти-Fcγ человека или анти-Fcγ мыши захваченного анти-PfrH5 моноклонального антитела в течение четырех минут при скорости потока 50 мкл/мин, в то время как диссоциацию связанного с моноклональным антителом реагента PfrH5 контролировали в течение десяти минут в рабочем буфере HBS-ET. Константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и скорости диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем подгонки сенсограмм связывания в реальном времени к модели связывания 1:1с ограничением массопереноса с использованием программного обеспечения для построения кривой Scrubber 2.0с. Константу равновесия диссоциации связывания ( $K_D$ ) и период полураспада диссоциации ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали на основе кинетических скоростей как

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Кинетические параметры связывания PfrH5ΔNL.6his с различными анти-PfrH5 моноклональными антителами по данному изобретению при 25°C и 37°C показаны в табл. 5-1-5-2 соответственно.

При 25°C все анти-PfrH5 моноклональные антитела по данному изобретению связывались с PfrH5ΔNL.6his со значениями  $K_D$  в диапазоне от 4,72 пМ до 1,67 нМ, как показано в табл. 5-1. При 37°C все анти-PfrH5 моноклональные антитела по данному изобретению связывались с PfrH5ΔNL.6his со значениями  $K_D$  в диапазоне от 1,10 пМ до 1,10 нМ, как показано в табл. 5-2.

Таблица 5-1. Параметры кинетики связывания для связывания PfRH5ΔNL.6his с анти-PfRH5 моноклональными антителами при 25°C

Антитело	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H1H29141P	62,8±4,0	29,9	2,75E+06	1,30E-05	4,72E-12	888
H1H29209P2	152,6±0,6	79,5	1,54E+06	1,37E-05	9,09E-12	843
H1H29125P	175,4±1,3	88,3	8,10E+05	1,00E-05*	1,23E-11	1155
H1H29138P	118,1±0,4	61,2	1,98E+07	4,04E-04	2,04E-11	28,6
H1H29106P	109,4±4,0	49,3	6,31E+06	9,93E-04	1,57E-10	11,6
H1H29134P	147,7±0,6	68,3	7,98E+05	1,00E-05*	1,25E-11	1155
H1H29109P	70,4±4,4	36,7	2,17E+06	1,01E-03	4,68E-10	11,4
H1H29100P	163,2±1,1	83,3	2,49E+06	1,96E-04	7,87E-11	59,1
H1H29127P	177,5±0,3	88,1	1,91E+06	9,12E-04	4,76E-10	12,7
H1H29089P	180,4±0,9	96	1,46E+06	3,99E-04	2,73E-10	29
H1H29094P	186,1±0,9	87,2	1,07E+06	5,30E-04	4,98E-10	21,8
H1H29179P2	171,7±1,0	66,3	1,83E+06	4,88E-03	2,66E-09	2,4
H1H29214P2	115,5±2,9	59,9	1,71E+06	2,17E-04	1,27E-10	53,3
H1H29131P	103,8±5,1	52,4	3,14E+06	2,23E-03	7,11E-10	5,2
H1H29215P2	74,5±0,4	34,6	1,56E+06	1,52E-03	9,74E-10	7,6
H1H29147P2	91,5±4,5	43,2	3,29E+06	1,67E-03	5,07E-10	6,9
H1H29163P2	93,6±0,2	38	3,02E+06	2,00E-03	6,63E-10	5,8
H1H29187P2	108,1±1,3	53,2	2,18E+06	2,19E-04	1,01E-10	52,8
H1H29149P2	195,6±1,6	82,9	1,51E+06	4,4E-04	2,74E-10	27,9
H1H29207P2	204,0±2,0	104,9	1,68E+06	1,72E-03	1,03E-09	6,7
H1H29104P	139,4±2,6	58,4	1,24E+06	1,30E-03	1,05E-09	8,9
H1H29196P2	138,3±0,9	61	1,22E+06	2,21E-03	1,80E-09	5,2
H1H29183P2	156,6±1,0	23	1,59E+05	1,00E-05*	6,28E-11	1155
H1H29143P	110,8±0,3	53,4	3,41E+06	2,77E-03	8,13E-10	4,2
H1H29166P2	102,5±6,6	28	4,27E+06	3,56E-03	8,34E-10	3,2
H1H29151P2	122,4±0,2	26	1,48E+07	2,47E-02	1,67E-09	0,5
H1H29192P2	148,3±0,6	-0,4	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>
H1H29198P2	121,7±0,3	-0,8	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>
H1H29146P2	143,2±0,4	-1,5	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>
H1H29171P2	144,2±0,4	0,4	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>
Изотипический контроль hIgG1	165,3±0,9	-1,3	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>	C.o. <sup>§</sup>

\* указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях не наблюдали диссоциации PfRH5ΔNL.6his, а значение  $k_d$  фиксировали самостоятельно при 1,00E-05 при подборе данных.

<sup>§</sup> указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях связывания не наблюдали. C.o. означает, что связывание отсутствует.

Таблица 5-2. Параметры кинетики связывания для связывания PфRH5ΔNL.6his с анти-PфRH5 моноклональными антителами при 37°C

Антитело	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ связанного Ag (RU)	$k_d$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H1H29141P	38,8±1,3	18,8	9,11E+06	1,00E-05*	1,10E-12	1155
H1H29209P2	66,7±0,8	28,6	2,11E+06	1,00E-05*	4,74E-12	1155
H1H29125P	65,8±2,6	19,9	1,58E+06	1,00E-05*	6,34E-12	1155
H1H29138P	40,3±0,2	18,7	4,26E+07	6,87E-04	1,61E-11	16,8
H1H29106P	58,6±6,5	17,3	1,60E+07	6,36E-04	3,97E-11	18,2
H1H29134P	58,9±0,6	19,8	2,71E+07	1,18E-03	4,37E-11	9,8
H1H29109P	40,5±8,0	19,7	1,20E+07	5,51E-04	4,58E-11	21
H1H29100P	72,4±1,1	33,2	4,03E+06	2,10E-04	5,21E-11	55
H1H29127P	67,3±0,6	27,3	1,29E+07	7,02E-04	5,46E-11	16,4
H1H29089P	76,0±1,9	32,7	4,04E+06	2,33E-04	5,77E-11	49,5
H1H29094P	72,1±2,1	21,2	2,05E+06	1,19E-04	5,79E-11	97,2
H1H29179P2	79,6±1,1	15,3	2,14E+07	1,26E-03	5,88E-11	9,2
H1H29214P2	59,0±0,7	22,9	2,70E+06	1,63E-04	6,04E-11	70,9
H1H29131P	64,8±0,4	26,6	1,31E+07	8,66E-04	6,61E-11	13,3
H1H29215P2	41,9±3,3	9,9	1,40E+07	1,21E-03	8,64E-11	9,5
H1H29147P2	54,6±1,5	24,9	1,24E+07	1,12E-03	9,01E-11	10,3
H1H29163P2	32,7±0,2	13	1,54E+07	1,68E-03	1,09E-10	6,9
H1H29187P2	76,4±8,6	29	3,19E+06	6,87E-04	2,16E-10	16,8
H1H29149P2	117,5±4,1	33,9	1,49E+06	6,47E-04	4,36E-10	17,9
H1H29207P2	111,6±3,9	40,8	2,61E+06	1,23E-03	4,72E-10	9,4
H1H29104P	110,3±11,5	23	1,91E+06	9,38E-04	4,92E-10	12,3
H1H29196P2	73,6±1,6	14,1	2,50E+06	2,74E-03	1,10E-09	4,2
H1H29183P2	78,4±1,7	3,5	H.o.#	H.o.#	H.o.#	H.o.#
H1H29143P	41,5±0,2	12,3	H.o.#	H.o.#	H.o.#	H.o.#
H1H29166P2	59,0±1,0	23,5	H.o.#	H.o.#	H.o.#	H.o.#
H1H29151P2	45,0±0,2	2,7	C.o.§	C.o.§	C.o.§	C.o.§
H1H29192P2	60,3±0,8	-1,2	C.o.§	C.o.§	C.o.§	C.o.§
H1H29198P2	46,4±1,6	-3,2	C.o.§	C.o.§	C.o.§	C.o.§
H1H29146P2	52,6±0,4	-2,6	C.o.§	C.o.§	C.o.§	C.o.§
H1H29171P2	52,0±0,3	-5,6	C.o.§	C.o.§	C.o.§	C.o.§
Изотипический контроль hIgG1	74,3±1,0	-1,2	C.o.§	C.o.§	C.o.§	C.o.§

\* указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях не наблюдали диссоциации PфRH5ΔNL.6his, а значение  $k_d$  фиксировали самостоятельно при 1,00E-05 при подборе данных.

§ указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях связывания не наблюдали.

\* указывает, что связывание наблюдали в текущих экспериментальных условиях, однако кинетические значения не соответствуют табличным.

H.o. означает неоднозначные результаты.

C.o. означает, что связывание отсутствует.

Пример 6. Перекрестная конкуренция согласно Octet между различными анти-PфRH5 моноклональными антителами

Конкуренцию за связывание между панелью анти-PфRH5 моноклональных антител определяли с помощью анализа безмаркерной биослойной интерферометрии в реальном времени на платформе биосенсора Octet HTX (Pall ForteBio Corp.).

Эксперимент проводили при 25°C в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20 и 1 мг/мл BSA, pH 7,4 (HBS-EBT) с планшетом при встряхивании со скоростью 1000 об./мин. Для оценки того, способны ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание со своими соответствующими эпитопами на рекомбинантном PфRH5 с удалением аминоконца M1-Y139 и содержащим остатки K140-Q526, но не имеющим K247-L295, и T216A и T299A, экспрессированными с C-концевой гексагистиридиновой меткой (PфRH5ΔNL.6his; SEQ ID: 362), примерно 1,4-2,0 нм PфRH5ΔNL.6his сначала захватывали на наконечники биосенсора Octet, покрытые анти-PentaHis антителом (ForteBio Inc, № 18-5122), путем погружения наконечников биосенсора в течение 60 с в лунки, содержащие 20 мкг/мл раствора PфRH5ΔNL.6his. Захваченные антигеном наконечники биосенсора затем насыщали первым анти-PфRH5 моноклональным антителом (впоследствии обозначаемым mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора mAb-1, в течение 3 мин. Используемые антитела представляли собой IgG1. Затем наконечники биосенсора погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго анти-PфRH5 моноклонального антитела (впоследствии обозначаемого mAb-2), в течение 3 мин. Наконечники биосенсора промывали в буфере HBS-ET в промежутке между каждой ста-

дией эксперимента. Реакцию связывания в реальном времени контролировали в течение всего эксперимента, а ответ при связывании в конце каждой стадии фиксировали. Реакцию связывания mAb-2 с PfRH5ΔNL.6h, предварительно образовавшим комплекс с mAb-1, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных анти-PfRH5 моноклональных антител, как показано в табл. 6-1.

Таблица 6-1. Перекрестная конкуренция между анти-PfRH5 моноклональными антителами

mAb-1	mAb-2, которое конкурирует с mAb-1
H1H29127P	H1H29106P
	H1H29134P
H1H29106P	H1H29127P
	H1H29134P
H1H29134P	H1H29106P
	H1H29127P
H1H29143P	H1H29187P2
H1H29187P2	H1H29143P
	H1H29151P2
H1H29183P2	mAb отсутствует
H1H29104P	mAb отсутствует
H1H29207P2	H1H29109P
	H1H29147P2
	H1H29166P2
	H1H29171P2
H1H29109P	H1H29163P2
	H1H29207P2
	H1H29147P2
	H1H29166P2
	H1H29171P2

	H1H29163P2
H1H29147P2	H1H29207P2
	H1H29109P
	H1H29166P2
	H1H29171P2
	H1H29163P2
	H1H29131P
H1H29166P2	H1H29207P2
	H1H29109P
	H1H29147P2
	H1H29171P2
	H1H29163P2
	H1H29131P
H1H29171P2	H1H29207P2
	H1H29109P
	H1H29147P2
	H1H29166P2
	H1H29163P2
	H1H29131P
	H1H29094P
H1H29163P2	H1H29207P2
	H1H29109P
	H1H29147P2
	H1H29166P2
	H1H29171P2
	H1H29131P
	H1H29094P
	H1H29215P2
H1H29131P	H1H29147P2
	H1H29166P2
	H1H29171P2
	H1H29163P2
	H1H29094P
	H1H29215P2
H1H29094P	H1H29171P2
	H1H29163P2

	H1H29131P
	H1H29215P2
	H1H29151P2
	H1H29138P
H1H29215P2	H1H29163P2
	H1H29131P
	H1H29094P
	H1H29151P2
	H1H29125P
H1H29151P2	H1H29187P2
	H1H29094P
	H1H29215P2
	H1H29198P2
H1H29125P	H1H29215P2
H1H29149P2	H1H29100P
	H1H29209P2
	H1H29179P2
	H1H29214P2
	H1H29089P
H1H29100P	H1H29149P2
	H1H29209P2
	H1H29179P2
	H1H29214P2
	H1H29089P
H1H29209P2	H1H29149P2
	H1H29100P
	H1H29179P2
	H1H29214P2
	H1H29089P
H1H29179P2	H1H29149P2
	H1H29100P
	H1H29209P2
	H1H29214P2
	H1H29089P
H1H29214P2	H1H29149P2
	H1H29100P
	H1H29209P2
H1H29089P	H1H29179P2
	H1H29214P2
H1H29138P	H1H29094P
H1H29141P	mAb отсутствует
H1H29196P2	mAb отсутствует
H1H29198P2	H1H29151P2
H1H29146P2	mAb отсутствует

Пример 7. Многоцикловый анализ подавления роста для оценки образующихся паразитов после давления анти-PfRH5 антитела

Специфические к RH5 *Plasmodium falciparum* антитела подавляют инвазию эритроцитов человека в течение нескольких циклов репликации и не вызывают мутации в гене PfRH5. Инвазия эритроцитов хозяина является важным этапом жизненного цикла *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) и патологии малярии. Множественные противомалярийные препараты нацелены на бесполое стадии в кровяном русле, однако их эффективность находится под угрозой из-за появления штаммов, устойчивых к лекарственным препаратам (Arrow et al., Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in the Age of Resistance. National Academies Press (US). 254-266 (2004); Blasco et al., Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. Nature Medicine. 23, 917-928 (2017)). Кроме того, противомалярийные препараты обладают разными фармакокинетическими свойствами. Некоторые противомалярийные препараты, такие как артемизинин и хинин, быстро выводятся из организма в течение одного жизненного цикла паразита. С другой стороны, гидрофобные и липофильные противомалярийные препараты выводятся медленно, но они характеризуются различной скоростью всасывания в зависимости от количества потребляемых жиров (Arrow et al., Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of

Resistance. National Academies Press (US). 254-266 (2004)).

Нацеливание на ретикулоцитсвязывающий белок-гомолог (RH5) с помощью поликлональных (пАт) и моноклональных антител (мАт) эффективно блокирует паразитарную инвазию нескольких штаммов *P. falciparum* в эритроциты человека *in vitro* (Wright et al., Structure of malaria invasion protein RH5 with erythrocyte basigin and blocking antibodies. *Nature*. 515, 427-430 (2014); Galaway et al., PI 13 is a merozoite surface protein that binds the N-terminus of Plasmodium falciparum RH5. *Nature Communications*. 8, 14333 (2017)). Нацеливание на белок RH5 с помощью одного антитела или коктейля антител может быть необходимым для создания противоположного давления отбора на одну и ту же мишень.

Кроме того, антитела могут компенсировать короткий период полувыведения распространенных противомаларийных препаратов.

Наконец, паразит *Plasmodium* разработал способы ускользания иммунного ответа хозяина, который пытается блокировать развитие паразита, такие как полиморфизм генов. Это генетическое разнообразие часто является результатом иммунного давления (Renia и Goh, *Malaria Parasites: The Great Escape*. *Front Immunol*. 7,463 (2016). PMC5098170). Полногеномное секвенирование более 300 клинических изолятов или лабораторных штаммов *P. falciparum* выявило только 15 несинонимичных SNP PfRH5 в пределах возможных эпитопов mAb, что свидетельствует о консервативной природе и важности белка. Иммунное давление на консервативные области белка может ограничивать способность паразита развивать механизмы ускользания (Bustamante et al., A full-length recombinant Plasmodium falciparum PfRH5 protein induces inhibitory antibodies that are effective across common PfRH5 genetic variants, *Vaccine*, 31, 373-9 (2013)).

В этом примере набор из четырех (4) RH5-специфических моноклональных антител, каждое с hlgG1, по данному изобретению тестировали отдельно в анализе ускользающих мутантов с одним штаммом *Plasmodium falciparum* (3D7).

Использовали моноклональные антитела H1H29089P, H1H29100P, H1H29147P2, H1H29187P2 и REGN1932.

Экспериментальная процедура (в том числе описание соответствующих клеточных линий, белков, реагентов, а также типа и модели устройств): штамм 3D7 *P. falciparum* (BEI Resources) выращивали в соответствии со стандартными протоколами при гематокрите 4% и паразитемии 0,5%. Инфицированные эритроциты объединяли с PfRH5-специфическими или контрольными антителами в концентрации, соответствующей их соответствующему значению  $IC_{50}$  в отношении штамма *P. falciparum*, описанного выше. Концентрация антител постепенно увеличивалась каждые 7-14 дней до конечной концентрации, соответствующей 110X их соответствующих значений  $IC_{50}$ . Среда для выращивания, содержащую антитело, обновляли каждые 48 ч, а свежую кровь добавляли в культуру еженедельно.

Каждую неделю РНК паразита экстрагировали путем лизиса инфицированных эритроцитов тризолом и очищали с помощью набора Qiagen RNeasy. Обратную транскрипцию завершали с помощью высокопроизводительного набора для обратной транскрипции кДНК (Applied Biosystems). Амплификацию гена RH5 проводили с использованием PfRH5-специфических праймеров. Продукты ПЦР анализировали на 1,5% агарозном геле и клонировали в клонирующий вектор TOPO TA (Life Technologies). Секвенирование RH5 осуществляли с помощью прямого и обратного праймеров для секвенирования M13.

Обобщенные результаты и выводы Несколько групп сообщили, что нацеливание на ретикулоцитсвязывающий белок-гомолог 5 (PfRH5) может эффективно блокировать паразитарную инвазию в эритроциты человека *in vitro* с участием *P. falciparum*. Постепенное увеличение давления PfRH5-специфических антител на паразитов 3D7 *P. falciparum* не приводило к полиморфизмам PfRH5 по сравнению с давлением антитела изотипического контроля. В табл. 7-1 показан процент показателей идентичности последовательностей PfRH5 каждого образца по сравнению со всеми другими секвенированными образцами через 45 дней постепенного увеличения давления антител (от  $1 \times EC_{50}$  до  $110 \times EC_{50}$ ). Все последовательности были на 100% идентичны на всех участках. На фиг. 1 изображено выравнивание последовательностей PfRH5, соответствующих каждому PfRH5-специфическому антителу, через 45 дней после постепенного увеличения давления антитела (от  $1 \times EC_{50}$  до  $110 \times EC_{50}$ ), показывающее отсутствие различий последовательностей на нуклеотидном уровне.

Таблица 7-1. Процент показателей идентичности последовательностей PfRH5 каждого образца по сравнению со всеми другими секвенированными образцами через 45 дней постепенного увеличения давления антител (от  $1 \times EC_{50}$  до  $110 \times EC_{50}$ )

	Процент показателей идентичности (последовательность <i>PfRH5</i> )					
	Н1Н29089Р	Н1Н29100Р	Н1Н29147Р2	Н1Н29187Р2	REGN1932	Эталонная последовательность (3D7)
Н1Н29089Р	100	100	100	100	100	100
Н1Н29100Р	100	100	100	100	100	100
Н1Н29147Р2	100	100	100	100	100	100
Н1Н29187Р2	100	100	100	100	100	100
REGN1932	100	100	100	100	100	100
Эталонная последовательность (3D7)	100	100	100	100	100	100

Пример 8. Анализ подавления роста для оценки способности анти-PfRH5 антител подавлять инвазию *in vitro* эритроцитов человека и рост паразитов *P. falciparum* в присутствии сыворотки крови

Специфические антитела к RH5 *Plasmodium falciparum* подавляют инвазию эритроцитов человека в анализе подавления роста на основе пЛДГ в присутствии сыворотки крови.

Одна группа предположила, что активация комплемента на поверхности мерозоитов усиливает способность паразита вторгаться в эритроциты (Biryukov et al., Complement and Antibody-mediated Enhancement of Red Blood Cell Invasion and Growth of Malaria Parasites. *EBioMedicine*. 9, 207-216 (2016)). В то же время, другие исследования указывают на то, что присутствие сыворотки крови с активным компонентом приводит к уменьшенному или сопоставимому росту паразитов по сравнению с сывороткой крови с неактивным компонентом (Boyle et al, Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. *Immunity*. 42, 580-90 (2015); Chulay et al., Inhibition of *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* by immune serum from monkeys. *J Infect Dis*. 144, 270-278). Кроме того, во всех случаях вакцинации у людей мерозоитными антигенами (или любыми малярийными антигенами) отсутствуют задокументированные случаи антителозависимого увеличения паразитемии.

В этом примере набор из четырех (4) RH5-специфических mAb (каждое с hlgG1 (обозначено префиксом Н1Н) или hIgG4 (обозначено префиксом Н4Н)) по данному изобретению тестировали отдельно и в комбинации с нормальной сывороткой крови обезьян *Aotus* (ANS), инактивированной нагреванием сывороткой крови обезьян *Aotus* (AHIS), нормальной сывороткой крови человека (HNS) или инактивированной нагреванием сывороткой крови человека (HHIS) в стандартном анализе подавления роста с одним штаммом *Plasmodium falciparum* (FCR-1/FVO).

Применяемые моноклональные антитела были следующими: Н1Н29089Р, Н1Н29100Р, Н1Н29147Р2, Н1Н29187Р2, Н4Н29089Р, Н4Н29100Р, Н4Н29147Р2, Н4Н29187Р2, REGN1932 (анти-Fel d1 (IgG1 человека)) и REGN1945 (анти-Fel d1 (IgG4 человека)).

Экспериментальная процедура (в том числе описание соответствующих клеточных линий, белков, реагентов, а также типа и модели устройств). Штамм FCR-1/FVO *P. falciparum* (BEI Resources) сначала синхронизировали с 5% D-сорбитом в соответствии со стандартными протоколами при гематокрите 3-5% и паразитемии 1-2% за 20-24 ч до начала анализа. Инфицированные эритроциты человека получали при исходной паразитемии 0,4-0,7% и гематокрите 2%. Инфицированные эритроциты объединяли с RH5-специфическими или контрольными антителами в концентрации 6,67 мкМ в присутствии 10% нормальной сыворотки крови *Aotus*, инактивированной нагреванием сыворотки крови *Aotus*, нормальной сыворотки крови человека или инактивированной нагреванием сыворотки крови. Паразитов выращивали в течение 40-48 ч до достижения стадии шизонта (один полный жизненный цикл). Рост паразитов останавливали тремя промывками холодного PBS. Конечную паразитемию определяли путем измерения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита (Miura et al., Anti-Apical-Membrane-Antigen-1 antibody is more effective than anti-42-kilodalton-Merozoite-Surface-Protein-1 antibody in inhibiting *Plasmodium falciparum* growth, as determined by the *in vitro* growth inhibition assay. *Clin Vaccine Immunol*. 16, 963-968 (2009)). Процент подавления роста выражается по сравнению с неинфицированными эритроцитами.

#### Обобщенные результаты и выводы

Нацеливание на ретикулоцитсвязывающий белок-гомолог 5 (RH5) эффективно блокирует паразитарную инвазию эритроцитов человека *in vitro* с участием *P. falciparum*. Были опубликованы противоречивые данные о роли комплемента в инвазии мерозоитов в эритроциты. RH5-специфические антитела получали и тестировали в присутствии *Aotus* или сыворотки крови человека *in vitro* в анализе подавления роста в штамме *P. falciparum*, как описано выше. В табл. 8-1 показан процент максимального подавления

роста для каждого RH5-специфического антитела (оба формата hlgG1 и hlgG4) с активным или неактивным компонентом сыворотки крови. Отдельные антитела и комбинации активной или неактивной сыворотки крови показали аналогичный процент максимального подавления роста, находящийся в диапазоне приблизительно 67-86%.

Таблица 8-1. Обобщенные результаты максимальной активности подавления роста PfRH5-антител в присутствии 10% сыворотки крови Aotus или человека

mAb	Процент максимального подавления роста				
	mAb (6,67 мкМ) + ANS (10%)	mAb (6,67 мкМ) + AHIS (10%)	mAb (6,67 мкМ) + HNS (10%)	mAb (6,67 мкМ) + HHIS (10%)	mAb (6,67 мкМ) + без сыворотки и крови
H1H29089P	75,7	84,3	85,0	85,2	85,3
H1H29100P	73,2	82,5	82,4	81,9	83,9
H1H29147P 2	80,3	86,2	85,6	83,4	84,1
H1H29187P 2	80,1	89,4	85,9	85,4	85,3
H4H29089P	75,7	82,4	85,3	86,2	84,8
H4H29100P	67,7	79,8	75,5	79,6	83,9
H4H29147P 2	67,0	76,8	73,0	75,5	82,4
H4H29187P 2	69,9	82,9	77,0	77,8	84,0
REGN1932	0	0	0	0	0
REGN1945	0	0	0	0	0

Максимальное подавление роста антител против PfRH5 по сравнению с неинфицированными эритроцитами человека. Анализ подавления роста проводили на эритроцитах, инфицированных *P. falciparum* (зрелый трофозоит или ранний шизонт), при 0,4-0,7% паразитемии. Антитела и сыворотки объединяли с инфицированными эритроцитами. Паразитов выращивали в течение 40-48 ч (время зависело от штамма паразита) до достижения стадии шизонта. Рост паразитов останавливали тремя промывками холодного PBS. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) паразита измеряли непосредственно после промывки. Процент подавления роста выражается по сравнению с неинфицированными эритроцитами. Результаты одного типичного анализа подавления роста показаны выше. ANS: нормальная сыворотка крови обезьяны Aotus, AHIS: инактивированная нагреванием сыворотка крови Aotus, HNS: нормальная сыворотка крови человека, HHIS: инактивированная нагреванием сыворотка крови человека.

\*\*\*\*\*

Все цитируемые в данном документе литературные источники включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, запись в базе данных (например, последовательности Genbank или записи GeneID), патентная заявка или патент были явным образом и отдельно указаны для включения посредством ссылки. Указанное заявление о включении посредством ссылки предназначено заявителями для того, чтобы обращаться к каждой отдельной публикации, записи в базе данных (например, последовательностям Genbank или записям GeneID), заявке на патент или патенту, даже если такая ссылка не является непосредственно смежной со специальным заявлением включения посредством ссылки. Включение в описание специальных заявлений о включении посредством ссылки, если таковые имеются, никоим образом не ослабляет указанное общее заявление о включении посредством ссылки. Цитирование литературных источников в данном документе не предназначено в качестве признания того, что литературный источник относится к предшествующему уровню техники, и не является признанием содержания или даты этих публикаций или документов.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с полипептидом ретикулицистсвязывающего белка-гомолога 5 *Plasmodium falciparum* (PfRH5), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарности области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 6 и 8 соответственно, и три определяющих комплементарности области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12, 14 и 16 соответственно.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную после-

довательность SEQ ID NO: 2.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, который является мульти-специфическим.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, который включает одно или несколько из следующих свойств:

подавляет рост *Plasmodium falciparum* в эритроцитах человека;

подавляет рост штаммов *Plasmodium falciparum* D10, Dd2, 7G8, W2-mef, 3D7, HB3, FCR-1/FVO, Cam3.П или RF7 в эритроцитах человека;

связывается с полипептидом PfRH5 или его антигенным фрагментом с  $K_D$  от около 4,72 пМ до около 1,67 нМ при 25°C и/или от около 1,10 пМ до около 1,10 нМ при 37°C при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

блокирует связывание полипептида PfRH5 с полипептидом базигина;

связывается с PfRH5, не имеющим аминоконцевых остатков M1-Y139 и содержащим остатки K140-Q526, но не содержащим K247-L295, и имеющим мутации T216A и T299A; и/или

вызывает максимальное подавление роста *Plasmodium falciparum* в инактивированной нагреванием сыворотке крови человека или обезьяны *Aotus*, которое на около 1-10% выше, чем в неинактивированной нагреванием сыворотке крови человека или обезьяны *Aotus* соответственно;

при воздействии указанного антигенсвязывающего белка не вызывает мутации PfRH5 в *Plasmodium falciparum*.

7. Комплекс, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, связанный с полипептидом ретикулоцитсвязывающего белка-гомолога 5 (PfRH5) *Plasmodium falciparum*.

8. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6, включающий:

(a) введение одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в клетку-хозяина и

(b) культивирование клетки-хозяина в условиях, благоприятных для экспрессии одного или более полинуклеотидов.

9. Способ по п.8, дополнительно включающий (c) выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина и/или среды, в которой выращивается клетка-хозяин.

10. Способ по п.8 или 9, где клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка.

11. Тест-полоска на наличие антигенов для иммунохроматографического анализа, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.

12. Полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.

13. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.12.

14. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.12 или вектор по п.13.

15. Набор, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.

16. Набор по п.15, дополнительно содержащий терапевтический агент.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, дополнительно содержащая терапевтический агент.

19. Композиция или набор по п.16 или 18, где дополнительный терапевтический агент представляет собой противопаразитарное лекарственное средство или вакцину.

20. Композиция или набор по любому из пп.15-19, отличающиеся тем, что дополнительный терапевтический агент является членом, выбранным из группы, состоящей из хлорохина, атоваквона, прогуанила, артемизинина, люмефантрина, мефлохина, хинина, хинидина, доксициклина, клиндамицина, вакцины и противомалярийной вакцины.

21. Сосуд или инъекционное устройство, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 или композицию по любому из пп.17-20.

22. Способ лечения или профилактики инфекции *Plasmodium falciparum* у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по любому из пп.17-20.

23. Способ по п.22, где субъект болен малярией или имеет повышенный риск заражения, или предрасположен к заболеванию малярией.

24. Способ по п.22 или 23, где перед введением антигенсвязывающего белка у субъекта диагностируют наличие инфекции *Plasmodium falciparum*.

25. Способ диагностики инфекции *Plasmodium falciparum* у субъекта, включающий приведение в

контакт антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6 с образцом от указанного субъекта и, если в образце выявлен комплекс между антителом или антигенсвязывающим фрагментом и полипептидом PfRH5, определение того, что субъект инфицирован Plasmodium falciparum.

26. Способ по п.25, где указанный комплекс образуется на тест-полоске для иммунохроматографического анализа, содержащей антигенсвязывающий белок и полипептид PfRH5.

27. Способ введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6 в организм субъекта, включающий инъекцию антитела или антигенсвязывающего фрагмента в организм субъекта.

28. Способ по п.27, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в организм субъекта подкожно, внутривенно или внутримышечно.

Отформатированные участки выравнивания

		ПАНЕЛЬ А	
H1H29089P	{1}	1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
H1H29089P	{2}	1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
H1H29100P	{1}	1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
H1H29100P	{2}	1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
H1H29147P2	{1}	1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
H1H29147P2	{2}	1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
H1H29187P2	{1}	1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
H1H29187P2	{2}	1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
REGN1932		1	ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
Последовательность {3D7}			ATGATAAGAATAAAAAAAAAAATAATTTTGACCATTATATATTCATCTGTTTATATTAATAGAT
} Продолжение на ПАНЕЛИ В			
Продолжение на ПАНЕЛИ С			
		(ПАНЕЛЬ В)	
		151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
H1H29089P	{1}	151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
H1H29089P	{2}	151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
H1H29100P	{1}	151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
H1H29100P	{2}	151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
H1H29147P2	{1}	151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
H1H29147P2	{2}	151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
H1H29187P2	{1}	151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
H1H29187P2	{2}	151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
REGN1932		151	AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
Последовательность {3D7}			AAAGATGATATAAAAAATCGAAAGGATATAAAAAAGCAATTCATAATGATAAAGAGAATATAAAAA
} Продолжение с ПАНЕЛИ А			
		(ПАНЕЛЬ С) Продолжение с ПАНЕЛИ А	
		301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
H1H29089P	{1}	301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
H1H29089P	{2}	301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
H1H29100P	{1}	301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
H1H29100P	{2}	301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
H1H29147P2	{1}	301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
H1H29147P2	{2}	301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
H1H29187P2	{1}	301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
H1H29187P2	{2}	301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
REGN1932		301	CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
Последовательность {3D7}			CCTTCTCATAATTCCTTTTATAAAAAAATTCCTGTATTTAATCAAAATAATGATGGCATGTTATTA
} Продолжение на ПАНЕЛИ D			
		(ПАНЕЛЬ С) Продолжение с ПАНЕЛИ А	
		451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
H1H29089P	{1}	451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
H1H29089P	{2}	451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
H1H29100P	{1}	451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
H1H29100P	{2}	451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
H1H29147P2	{1}	451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
H1H29147P2	{2}	451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
H1H29187P2	{1}	451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
H1H29187P2	{2}	451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
REGN1932		451	GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
Последовательность {3D7}			GAGTTATCAAATATAACATTCGAAATTCATTCGATATTTACAAGAAAAAGAAGGACATTTGGATT
Продолжение на ПАНЕЛИ E			





(ПАНЕЛЬ J) Продолжение с ПАНЕЛИ H

GAATTGAATATCATACAAAAATAAAACGATAAAAATAAAATTCAGACAAAATTAATTAATATATGGAGAACATT 1350  
 ATCATTTAAGACAAAATGTTATATAATACATTCTATTCAAAGAAAAACATTTAAATAATATATTCATCATTTAATTTATGTA 1500  
 ATCATTTAAGACAAAATGTTATATAATACATTCTATTCAAAGAAAAACATTTAAATAATATATTCATCATTTAATTTATGTA 1500

Продолжение на ПАНЕЛИ L

(ПАНЕЛЬ K)

Продолжение с ПАНЕЛИ I

H1H29089P {1}	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
H1H29089P {2}	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
H1H29100P {1}	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
H1H29100P {2}	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
H1H29147P2 {1}	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
H1H29147P2 {2}	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
H1H29187P2 {1}	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
H1H29187P2 {2}	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
REGN1932	1501	CTACAAATGAAGTTC	CAATGATGCCAAAT	AAAAATGGAATATTT	CAACATATAAAAAATAAAC
Последовательность {3D7}		CTACAAATGAAGTTC			

(ПАНЕЛЬ L)

Продолжение с ПАНЕЛИ J

Продолжение с ПАНЕЛИ K	CACTTACACAATGA	1581
	CACTTACAC	1576
	CACTTACACAATGA	1581
CACTTACACAATGA		

