

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046175**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.14

(21) Номер заявки
201990243

(22) Дата подачи заявки
2017.07.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ВЫДЕЛЕННОЕ АНТИТЕЛО ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ, КОТОРЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ЭПИТОПОМ ВИРУСА ЗИКА, ИХ ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) РСТ/ЕР2016/066684

(32) 2016.07.13

(33) EP

(43) 2019.07.31

(86) РСТ/ЕР2017/067581

(87) WO 2018/011283 2018.01.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХУМАБС БИМЕД СА (СН)

(72) Изобретатель:
Корти Давиде (СН)

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

(56) LIANPAN DAI ET AL.: "Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody", CELL HOST & MICROBE, vol. 19, no. 5, 2 May 2016 (2016-05-02), pages 696-704, XP055352074, NL, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/j.chom.2016.04.013, abstract, figure 1, page 697, right-hand column, paragraph 1, page 701, left-hand column, paragraph 2

GIOVANNA BARBA-SPAETH ET AL.: "Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization", NATURE, vol. 536, no. 7614, 23 June 2016 (2016-06-23), pages 48-53, XP055328133, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature18938, abstract, page 48, right-hand column, paragraph 3, page 52, left-hand column, paragraph 2, page 52, right-hand column, paragraph 2, figure 1

Anonymous: "Zika virus antigens and antibodies", amsbio, XP002767868, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.amsbio.com/zika-virus-antigens-antibodies.aspx> [retrieved on 2017-03-07] the whole document

Anonymous: "C01864M datasheet", amsbio 3 May 2016 (2016-05-03), XP002767869, Retrieved

from the Internet: URL: <http://www.amsbio.com/datasheets/C01864M-1.pdf> [retrieved on 2017-03-07] the whole document

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

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

RUDIKOFF S ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979, the whole document

XU Q Y ET AL.: "Isolation of a Bluetongue virus group-specific monoclonal antibody and application to a diagnostic competitive ELISA", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, DE, vol. 99, no. 2, 20 July 2014 (2014-07-20), pages 729-739, XP036127161, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S00253-014-5937-7 [retrieved on 2014-07-20] abstract, page 733, left-hand column, paragraph 3

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

Anonymous: "Choose the best ZIKA virus antibodies", Arigo biolaboratories, XP002767866, Retrieved from the Internet: URL: https://www.arigobio.com/news/view/Zika_Virus [retrieved on 2017-03-07] the whole document

Anonymous: "Mouse anti-ZIKA virus antibodies NS1 antibody", The Native Antigen Company, XP002767867, Retrieved from the Internet: URL: <https://thenativeantigencompany.com/product/mouse-anti-zika-virus-ns1-antibody-b4/> [retrieved on 2017-03-07] the whole document

(57) Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые потенциально нейтрализуют инфекцию ZIKV. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют и иммортализируют В клетки, которые продуцируют такие антитела и фрагменты

046175 B1

046175 B1

антител. Дополнительно изобретение относится к применению антител и фрагментов антител согласно изобретению в способах диагностики, профилактики и лечения инфекции ZIKV.

046175 B1

046175 B1

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются специфически с эпитопами вируса Зика (ZIKV). Такие антитела (I) потенциально нейтрализуют инфекцию, вызванную вирусом Зика (ZIKV), или (II) направлены к NS1 ZIKV и могут использоваться в качестве диагностических средств. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют антитела и иммортализуют В-клетки, которые продуцируют такие антитела и фрагменты антител. Дополнительно, изобретение относится к применению антител и фрагментов антител согласно изобретению в способах диагностики, предотвращения и лечения инфекции ZIKV.

Вирус Зика (ZIKV), передаваемый комарами флавивирус, представляет собою чрезвычайную ситуацию в области здравоохранения. ZIKV впервые был выделен от макак в 1947 году в лесах Зика (Zika) в Уганде (G. W. A. Dick, S.F. Kitchen, A.J. Haddow, Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509-520 (1952)) и первое инфицирование человека было описано в Нигерии в 1954 г. F.N. Macnamara, Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 139-145 (1954)). С того времени, инфекции, вызванные ZIKV, sporadически возникали в Африке и юго-восточной Азии (D. Musso, Van Mai Cao-Lorameau, D.J. Gubler, Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet.* 386, 243-244 (2015)), но эпидемии были описаны в Микронезии в 2007 г. (M.R. Duffy и др., Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 360, 2536-2543 (2009)) и во Французской Полинезии 2013-14 гг., впоследствии вирус распространился в другие страны Океании (V.-M. Cao-Lorameau, D. Musso, Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet.* 384, 1571-1572 (2014); D. Musso, E.J. Nilles, V.-M. Cao-Lorameau, Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 0595-6 (2014)). После его интродукции в Бразилии в 2015 г., ZIKV быстро распространился и в феврале 2016 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) задекларировала это как чрезвычайную ситуацию в области здравоохранения международного значения (L. R. Baden, L.R. Petersen, D.J. Jamieson, A.M. Powers, M.A. Honein, Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374, 1552-1563 (2016); A.S. Fauci, D.M. Morens, Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med*, 160113142101009 (2016); D. L. Heymann и др., Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet.* 387, 719-721 (2016)). Главным путем инфицирования ZIKV являются укусы комаров *Aedes*, но также вирус может передаваться половым путем (D. Musso и др., Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 21, 359-361 (2015)) и передаваться вертикально (J. Mlakar и др., Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 374, 951-958 (2016)). Несмотря на то, что большинство инфекций, вызванных ZIKV, являются асимптоматическими или вызывают только незначительные симптомы, существуют доказательства того, что инфицирование ZIKV может приводить к неврологическим осложнениям, таким как синдром Гиена-Барре у взрослых (V.-M. Cao-Lorameau и др., Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet.* 0 (2016), doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6) и врожденным порокам развития, включая микроцефалию в развивающихся эмбрионах G. Calvet, R.S. Aguiar, A. Melo, S.A. Sampaio, Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* (2016), doi:10.1016/s1473-3099(16)00095-5; J. Mlakar и др., Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 374, 951-958 (2016); E.J. Rubin, M.F. Greene, L.R. Baden, Zika Virus and Microcephaly. *N Engl J Med* (2016), doi:10.1056/NEJMe1601862), возможно, вследствие его способности инфицировать нейральные клетки-предшественники человека (H. Tang и др., Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Stem Cell*, 1-5 (2016)).

ZIKV относится к роду флавивирусов, который также включает вирус лихорадки Западного Нила, вирус денге, вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки, и некоторые другие вирусы, которые могут вызывать энцефалиты. Флавивирусы имеют оболочку, с икосаэдрической и сферической геометрией.

Диаметр составляет приблизительно 50 нм. Геномы представляют собой положительную-смысловую РНК и несегментированы, длиной приблизительно 10-11 тысяч пар оснований. Геном флавивирусов кодирует 3 структурных белка (Капсид, рМ, и Оболочка) и 8 неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 и NS5B).

В то время как белки оболочки флавивирусов (envelope, E) опосредуют слияние и являются основной мишенью нейтрализующих антител, неструктурный белок 1 (NS1) секретируется инфицированными клетками и вовлечен в уклонение от распознавания иммунной системой и патогенезе (D.A. Muller, P.R. Young, The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 98, 192-208 (2013)). Два недавних структурных исследования показали высокий уровень структурного сходства между E белком ZIKV и такими же белками других флавивирусов, таких как вирус денге (DENV), вирус желтой лихорадки (YFV) и вирус лихорадки Западного Нила (WNV), но также обнаружили уникальные характерные особенности, относящиеся к нейротропизму ZIKV (L. Dai и др., Structures of the Zika Virus envelope protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe* (2016), doi:10.1016/j.chom.2016.04.013; D. Sirohi и др., The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, aaf5316 (2016)). Аналогичным образом, структурный анализ ZIKV NS1 обнаружил консервативные особенности NS1, характерные другим флавивирусами, хотя с различными электростатическими характеристиками (J. Kim и др., Zika virus NS1

structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses, 1-6 (2016)).

Феномен, который является характерным для определенных флавивирусов, состоит в активности, усиливающей заболевание, перекрестно-реагирующих антител, выработка которых вызывается предшествующим инфицированием гетерологическими вирусами. В случае вируса денге (DENV), для которого известно 4 серотипа, существует эпидемиологическое подтверждение, что первичное инфицирование защищает от повторной инфекции тем же самым серотипом, но представляет собой фактор риска развития тяжелого заболевания при повторном инфицировании другим серотипом (S.B. Halstead, Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectr.* 2, 249-271 (2014)). Это усугубленное заболевание запускается E и prM-специфическими антителами, которые не могут нейтрализовать входящий вирус, но вместо этого усиливают его захват клетками, экспрессирующими Fc рецептор (FcR⁺), что приводит к усилению вирусной репликации и активации перекрестно-реагирующих Т-клеток памяти. Полагают, что развивающаяся вследствие этого цитокиновый шторм является основой наиболее тяжелой формы заболевания, известной как геморрагическая лихорадка денге/синдром шока денге (S.B. Halstead, Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 60, 421-467 (2003); G. Screaton, J. Mongkolsapaya, S. Yacoub, C. Roberts, New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol.* 15, 745-759 (2015). Роль антител при тяжелых формах денге подтверждается исследованиями, указывающими на то, что затухающие уровни материнских антител у новорожденных являются более высоким фактором риска развития тяжелой болезни денге (S.B. Halstead, Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 60, 421-467 (2003); S. B. Halstead и др., Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerging Infect Dis.* 8, 1474-1479 (2002); T.H. Nguyen и др., Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis.* 189, 221-232 (2004); A.L. Rothman, Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 113, 946-951 (2004)).

В последнее время было показано, что большинство антител, которые реагируют с белком оболочки DENV, также связываются с ZIKV, но те, которые распознают основной линейный эпитоп слияние-петля (FLE), не нейтрализуют ZIKV, а вместо этого способствуют антителозависимому усилению (ADE) инфекции ZIKV (Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, Sakuntabhai A, Cao-Lorreau VM, Malasit P, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR: Denge virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol.* 2016 Jun 23. doi: 10.1038/ni.3515. [предварительная электронная публикация]).

Кроме того, в соответствии с ВОЗ, повышение в последнее время случаев микроцефалии и других неврологических нарушений, связанных с инфекцией, вызванной вирусом Зика, способствует увеличению потребности лабораторного тестирования для обнаружения инфекции, вызванной вирусом Зика. В связи с этим, необходима высокая специфичность антитела для того, чтобы отличить инфекцию, вызванную ZIKV, от инфекции, вызванной другими флавивирусами. Тем не менее, известные антитела к вирусу Зика типично перекрестно реагируют с другими флавивирусами и, следовательно, не пригодны для дифференцировки инфекции, вызванной ZIKV, от инфекции, вызванной другими флавивирусами.

Учитывая вышеизложенное, задачей настоящего изобретения является обеспечение новых антител, которые специфически связываются с эпитопами ZIKV. Также задачей настоящего изобретения является обеспечение эффективно нейтрализующих антител к ZIKV. Такие антитела предпочтительно не способствуют антителозависимому усилению (ADE) инфекции, вызванной вирусом Зика. Также задачей настоящего изобретения является обеспечение высоко специфических антител к ZIKV, пригодных для диагностики и тестирования инфекции ZIKV и способов диагностики, используя такие антитела.

Задача, лежащая в основе настоящего изобретения, решается с помощью объектов, раскрытых в заявляемой формуле изобретения.

Несмотря на то, что настоящее изобретение более подробно описано ниже, подразумевается, что оно не ограничивается конкретными методологиями, протоколами и реагентами, раскрытыми в настоящей заявке, так как они могут изменяться. Также подразумевается, что терминология, используемая в настоящей заявке, не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, которое определяется только пунктами приложенной формулы изобретения. Если специально не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют такие же значения, что и обычно подразумеваются квалифицированным специалистом в данной области техники.

Далее будут описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечислены в специфических вариантах осуществления, тем не менее, следует принять во внимание, что они могут комбинироваться любым образом и в любом количестве. Это описание следует понимать как поддерживающее и охватывающее варианты осуществления, которое объединяет конкретно описанные варианты осуществления с любым количеством описанных и/или предпочтительных элементов. Кроме того, любые перекомпоновки и комбинации всех описанных элементов в настоящей заявке следует считать раскрытыми описанием настоящей заявки, если в контексте не указано другое.

Для всего описания и пунктов приложенной формулы изобретения, если из контекста не следует иначе, термин "содержат", и такие как вариации, как "содержит" и "содержащий", подразумевают включение указанного компонента, целого числа или стадии, но не исключение любого другого компонента,

целого числа или стадии. Термин "состоит из" является конкретным вариантом осуществления термина "содержит", где любой другой неуказанный компонент, целое число или стадия исключены. В контексте настоящего изобретения, термин "содержит" охватывает термин "состоит из". Следовательно, термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий", например, композиция "содержащая" X, может состоять только из X или может включать некоторые дополнительные элементы, например, X+Y.

Термины в единственном числе, используемые в контексте описания изобретения (в особенности в контексте пунктов формулы изобретения) следует рассматривать как охватывающие как единственное число, так и множественное число, если специально не указано иначе в настоящей заявке или очевидно не противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в настоящей заявке только предназначено в качестве сокращенного способа ссылки индивидуально на каждое отдельное значение, подпадающее под указанный диапазон. Если специально не указано иначе в настоящей заявке, то каждое индивидуальное значение включено в описание, таким образом, если бы оно было индивидуально процитировано в настоящей заявке. Никакие слова в описании не должны рассматриваться как указание любого незаявленного элемента, важного для практического осуществления изобретения.

Выражение "по существу" не исключает "полностью" например, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может полностью не содержать Y. При необходимости, выражение "по существу" может быть пропущено из определения согласно изобретению.

Термин "приблизительно" по отношению к числовой величине x обозначает $x \pm 10\%$.

Термин "заболевание", как используется в настоящей заявке, в целом является синонимом и используется взаимозаменяемо с терминами "нарушение" и "состояние" (в качестве медицинского состояния), в том смысле, что все отражают аномальное состояние организма человека или животного или одной из его частей, в которой нарушено нормальное функционирование, типично проявляется отличающимися признаками и симптомами, и вызывает у человека или животного уменьшенную продолжительность или качество жизни.

Как используется в настоящей заявке, ссылка на "лечение" субъекта или пациента включает предотвращение, профилактику, ослабление, облегчение и терапию. Термины "субъект" или "пациент" используются взаимозаменяемо в настоящей заявке для обозначения всех млекопитающих, включая людей. Примеры субъектов включают людей, коров, собак, кошек, лошадей, коз, овец, свиней и кроликов. В одном варианте осуществления, пациентом является человек.

Как используется в настоящей заявке, термины "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент" и "фрагмент антитела" используются взаимозаменяемо по отношению к любому фрагменту антитела согласно изобретению, которое сохраняет антигенсвязывающую активность антитела. Примеры фрагментов антител включают, но, не ограничиваясь только ими, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Кроме того, термин "антитело" как используется в настоящей заявке, включает как антитела, так и их антигенсвязывающие фрагменты.

Как используется в настоящей заявке, термин "антитело" охватывает различные формы антител, включая, но, не ограничиваясь только ими, цельные антитела, фрагменты антител, в особенности антигенсвязывающие фрагменты, человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела и генетически сконструированные антитела (вариантные или мутантные антитела), при условии, что сохраняются все характерные свойства изобретения. Предпочтительными являются человеческие антитела и моноклональные антитела и более предпочтительными являются человеческие моноклональные антитела, в особенности рекомбинантные человеческие моноклональные антитела.

Антитела человека хорошо известны в данной области техники (van Dijk, M.A., и van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Антитела человека также могут быть получены у трансгенных животных (например, мышей), которые способны, при иммунизации, вырабатывать полный набор или определенные антитела человека при отсутствии выработки эндогенного иммуноглобулина. Перенос генетической информации иммуноглобулина зародышевой линии человека в такие мутантные зародышевые линии мышей будет приводить к выработке антитела человека при стимуляции антигеном (см., например, Jakobovits, A., и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., и др., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., и др., *Year Immunol.* 7 (1993) 3340). Антитела человека также могут быть получены методом библиотек фагового дисплея (Hoogenboom, H.R., и Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., и др., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Методы Cole и др. и Boerner и др. также применимы для получения моноклональных антител человека (Cole и др., *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); и Boerner, P., и др., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Предпочтительно, моноклональные антитела человека приготавливают с помощью улучшенной иммортализации EBV-В клеток, как описано в Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med.* 10(8):871-5. Термин "антитело человека", как используется в настоящей заявке, также охватывает такие антитела, которые были модифицированы, например, в варибельном участке, для получения свойства в соответствии с изобретением, как описано в настоящей заявке. Как используется в настоящей заявке, термин "варибельный участок" (варибельный участок легкой цепи (VL), варибельный участок тяжелой цепи (VH)) обозначает каждый

пару легкой и тяжелой цепей, которые непосредственно вовлечены в связывание антитела с антигеном.

Антитела могут представлять собой любой изотип (например, IgA, IgG, IgM, то есть α , γ или μ тяжелую цепь), но предпочтительно представляют собой IgG. В пределах IgG изотипа, антитела могут быть из подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, где предпочтительным является IgG1. Антитела согласно изобретению могут иметь κ или λ легкую цепь.

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

Таким образом, антитела могут представлять собой предпочтительно антитела человека, моноклональные антитела, моноклональные антитела человека, рекомбинантные антитела или очищенные антитела. Изобретение также обеспечивает фрагменты антител согласно изобретению, в особенности фрагменты, которые сохраняют антигенсвязывающую активность антител. Такие фрагменты включают, но, не ограничиваясь только ими, одно-цепочечные антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Тем не менее, в описании, включая пункты формулы изобретения, в некоторых местах, приведены указания на антигенсвязывающий(е) фрагмент(ы), фрагмент(ы) антитела(л), вариант(ы) и/или производное(ые) антител, это обозначает, что термин "антитело" или "антитело согласно изобретению" включает все категории антител, а именно, антигенсвязывающий(ы) фрагмент(ы), фрагмент(ы) антитела(л), вариант(ы) и производное(ые) антител.

Фрагменты антител могут быть получены из антител с помощью методов, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей с помощью химического восстановления. Альтернативно, фрагменты антител могут быть получены путем клонирования и экспрессии части последовательностей тяжелых или легких цепей. "Фрагменты" антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты, одноцепочечные Fv фрагменты (scFv), имеющие происхождение из тяжелых и легких цепей антитела согласно изобретению, например, scFv, содержащие CDR из антитела согласно изобретению, а также мономеры и димеры тяжелых и легких цепей, однодоменную тяжелую цепь антитела, однодоменную легкую цепь антитела, а также одно-цепочечные антитела, например, одноцепочечный Fv, в котором переменные домены тяжелой и легкой цепи соединены пептидным линкером.

Фрагменты антител могут осуществлять моновалентные или мультивалентные взаимодействия и могут содержаться в различных структурах, как описано выше. Например, могут синтезироваться scFv молекулы для создания тривалентного "триатела" или четырехвалентного "тетратела." scFv молекулы включают домен Fc фрагмент, приводящий к образованию двухвалентных минител. Дополнительно, последовательности компонентом мультиспецифических молекул, в которых последовательности нацеливают на соответствующие эпитопы и другие участки молекулы, связывающиеся с другими мишенями. Примеры молекул включают, но, не ограничиваясь только ими, биспецифические Fab2, триспецифические Fab3, биспецифические scFv, и диатела (Holliger и Hudson, 2005, Nature Biotechnology 9: 1126-1136).

Антитела могут быть в очищенной форме. Типично, антитело будет присутствовать в композиции, которая по существу не содержит других полипептидов, например, где меньше, чем 90% (по весу), обычно меньше, чем 60% и более предпочтительно, меньше, чем 50% композиции состоит из других полипептидов.

Антитела могут быть иммуногенными у людей и/или у отличающихся от людей (или гетерологических) хозяев, например, у мышей. Например, антитела могут иметь идиотоп, которые является иммуногенным у хозяев, отличающихся от людей, но не у человека-хозяина. Антитела для применения на человеке включают те антитела, которые не могут быть легко выделены из таких хозяев, как мыши, козы, кролики, крысы, млекопитающие, не являющиеся приматами, и др., и не могут быть в целом получены путем гуманизации или из ксено-мышей.

Как используется в настоящей заявке, "нейтрализующее антитело" представляет собой антитело, которое нейтрализует, то есть, предотвращает, ингибирует, уменьшает, затрудняет или препятствует, способности патогена инициировать и/или закреплять инфекцию в хозяине. Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют", используются взаимозаменяемо в настоящей заявке. Эти антитела могут использоваться отдельно, или в комбинации, в качестве профилактических или терапевтических агентов в подходящих препаратах, в сочетании с активной вакцинацией, в качестве диагностического средства, или в качестве производственного средства, как описано в настоящей заявке.

Дозы часто выражаются по отношению к весу тела. Таким образом, доза, которая выражается в виде [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и т.д.) обычно относится к [г, мг или другая единица] "на кг (или г, мг и др.) веса тела", даже если термин "вес тела" конкретно не указан.

Термин "специфическое связывание" и сходная ссылка не охватывает неспецифическое прилипание.

Термин "вакцина", как используется в настоящей заявке, типично подразумевается как профилактический или терапевтический материал, обеспечивающий по меньшей мере один антиген, предпочтительно иммуноген. Антиген или иммуноген может иметь происхождение из любого материала, который пригоден для вакцинации. Например, антиген или иммуноген может иметь происхождение из патогена,

такого как бактерия или вирусные частицы и др., или из опухолевой или раковой ткани. Антиген или иммуноген стимулирует адаптивную иммунную систему организма обеспечивать адаптивный иммунный ответ. В особенности, "антиген" или "иммуноген" относится типично к веществу, которое может распознаваться иммунной системой, предпочтительно адаптивной иммунной системой, и которое способно запускать антигенспецифический иммунный ответ, например, путем образования антител и/или антигенспецифических Т-клеток в качестве части адаптивного иммунного ответа. Типично, антиген может представлять собой или может содержать пептид или белок, который может презентироваться МНС Т-клеткам.

Как используется в настоящей заявке, "вариант последовательности" (также обозначается как "вариант") относится к любому изменению в последовательности, таким образом, ссылаясь на последовательность представляет собой любую из последовательностей, перечисленных в "Таблице Последовательностей и Номеров SEQ ID" (перечень последовательностей), то есть, SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 407. Таким образом, термин "вариант последовательности" включает варианты нуклеотидных последовательностей и варианты аминокислотных последовательностей. Следует отметить, что варианты последовательностей, указанные в настоящей заявке, представляют собой, в особенности, варианты функциональных последовательностей, то есть, варианты последовательностей, сохраняющие биологическую функцию, например, антитела. В контексте настоящего изобретения, такая биологическая функция представляет собой предпочтительно нейтрализацию инфекции ZIKV, связывание антитела с ZIKV E белком и/или связывание антитела с ZIKV NS1 белком. Таким образом, предпочтительные варианты последовательностей представляют собой варианты функциональных последовательностей, имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей к сравнительной последовательности. Фраза "ее вариант функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей", как используется в настоящей заявке, обозначает (I), что вариант последовательности является функциональным, как описано в настоящей заявке, и (II) более высокий % идентичность последовательностей, тем более предпочтительный вариант последовательности.

Другими словами, фраза "ее вариант функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей", обозначает, в особенности, что вариант функциональной последовательности имеет по меньшей мере 70% идентичность последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 75% идентичность последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 80% идентичность последовательностей, более предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность последовательностей, более предпочтительно по меньшей мере 88% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 92% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 96% идентичность последовательностей, особенно предпочтительно по меньшей мере 97% идентичность последовательностей, особенно предпочтительно по меньшей мере 98% идентичность последовательностей и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичность последовательностей к соответствующей сравнительной последовательности.

Термин "вариант последовательности" включает, в особенности, такие варианты, которые содержат мутации и/или замены по сравнению со сравнительной последовательностью. Типичные варианты последовательности Fc компонента включают, но, не ограничиваясь только ими, те, которые имеют замену L на A в положении CH2 4, CH2 5 или оба.

Идентичность последовательностей обычно рассчитывается по отношению к полной длине последовательности сравнения (то есть последовательности, процитированной в заявке). Процентное значение идентичности, как упоминается в настоящей заявке, может быть определено, например, используя BLAST, используя параметры по умолчанию, указанные NCBI (Национальный центр биотехнологической информации; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 матрица; штраф за открытие гэпа=11 и штраф за продление гэпа=1].

Как используется в настоящей заявке, "вариант нуклеотидной последовательности" имеет измененную последовательность, в которой один или несколько нуклеотидов в сравнительной последовательности делетировано или заменено, или один или несколько нуклеотидов вставлены в последовательность сравнительной нуклеотидной последовательности. Нуклеотиды обозначаются в настоящей заявке с помощью стандартного однобуквенного обозначения (A, C, G, или T). Вследствие вырожденности генетического кода, "вариант нуклеотидной последовательности" может либо привести к изменению в соответствующей сравнительной аминокислотной последовательности, то есть в "варианте аминокислотной по-

следовательности" или нет. Предпочтительные варианты последовательностей представляют собой такие варианты нуклеотидных последовательностей, которые не приводят к вариантам аминокислотных последовательностей (молчащие мутации), но возможны не молчащие мутации, а также мутантные нуклеотидные последовательности, которые приводят к получению аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% последовательности, идентичной сравнительной последовательности.

"Вариант аминокислотной последовательности" имеет измененную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот в сравнительной последовательности делетирована или замещена, или одна или несколько аминокислот вставлены в последовательность сравнительной аминокислотной последовательности. В результате таких изменений, вариант аминокислотной последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична сравнительной последовательности, предпочтительно, по меньшей мере на 90% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 95% идентична, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична сравнительной последовательности. Вариантные последовательности, которые являются идентичными по меньшей мере на 90%, имеют не более чем 10 изменений, то есть любую комбинацию делеций, инсерций или замещений, на 100 аминокислот сравнительной последовательности.

В то время возможны неконсервативные аминокислотные замены, предпочтительно, чтобы замены представляли собой консервативные аминокислотные замены, в которых замененная аминокислота имела сходные структурные или химические свойства с соответствующей аминокислотой в сравнительной последовательности. В качестве примера, консервативные аминокислотные замены включают замену одной из алифатических или гидрофобных аминокислот, например, аланина, валина, лейцина и изолейцина, на другую; замену одной из гидроксилсодержащих аминокислот, например, серина и треонина, на другую; замену одного кислотного остатка, например, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, на другой; замену одного амидсодержащего остатка, например, аспарагина и глутамина, на другой; замену одного ароматического остатка, например, фенилаланина и тирозина, на другой; замену одного щелочного остатка, например, лизина, аргинина и гистидина, на другой и замену одной небольшой аминокислоты, например, аланина, серина, треонина, метионина, и глицина, на другой.

Инсерции аминокислотных последовательностей включают amino- и/или карбоксилконцевые слияния, располагающиеся по длине от одного остатка в полипептидах, состоящих из сотни или более остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или множественных аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают слияния на N- или C-конце аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

Важно, что изменения в вариантах последовательностей не нарушают функциональность соответствующей сравнительной последовательности, в данном случае, например, функциональность последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связываться с тем же самым эпитопом и/или в достаточной нейтрализации инфекции, вызванной ZIKV. Методологические принципы определения того, какие нуклеотиды и аминокислотные остатки, соответственно, могут быть замещены, вставлены или делетированы без нарушения указанной функциональности, можно найти с помощью компьютерных программ, хорошо известных в данной области техники.

Как используется в настоящей заявке, последовательность нуклеиновых кислот или аминокислотная последовательность, "имеющая происхождение из" указанной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, относится к происхождению нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. Предпочтительно, последовательность нуклеиновых кислот или аминокислотная последовательность, которая имеет происхождение из конкретной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична этой последовательности или его части, из которой она происходит, на основании чего "по существу идентичная" включает варианты последовательностей, как определено выше. Предпочтительно, последовательность нуклеиновых кислот или аминокислотная последовательность, которая имеет происхождение из конкретного пептида или белка, имеет происхождение из соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. Таким образом, "соответствующий" относится, в частности, к той же самой функциональности. Например, "внеклеточный домен" соответствует другому "внеклеточному домену" (другого белка), или "трансмембранный домен" соответствует другому "трансмембранному домену" (другого белка). Следовательно, "соответствующие" части пептидов, белков и нуклеиновых кислот легко идентифицируемы для квалифицированного специалиста в данной области техники. Аналогичным образом, последовательности, "имеющие происхождение из другой последовательности, обычно легко идентифицируются квалифицированным специалистом в данной области техники, как имеющие свое происхождение из последовательности.

Предпочтительно, последовательность нуклеиновых кислот или аминокислотная последовательность, имеющая происхождение из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентична исходной нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (из которой она имеет происхождение). Тем не менее, последовательность нуклеиновых кислот или аминокислотная последовательность, имеющая происхождение из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, также может иметь одну или несколько мутаций относительно исходной нуклеиновой кислоты,

пептида, полипептида или белка (из которой она имеет происхождение), в особенности последовательность нуклеиновых кислот или аминокислотная последовательность, имеющая происхождение из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может представлять собой вариант функциональной последовательности, как описано выше, исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которой она имеет происхождение). Например, в пептиде/белка один или несколько аминокислотных остатков могут быть заменены другими аминокислотными остатками или могут происходить инсерции или делеции одного или нескольких аминокислотных остатков.

Как используется в настоящей заявке, термин "мутация" относится к изменению в последовательности нуклеиновых кислот и/или в аминокислотной последовательности по сравнению со сравнительной последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью. Мутация, например, по сравнению с геномной последовательностью, может представляться собой, например, (встречающуюся в природе) соматическую мутацию, самопроизвольную мутацию, индуцированную мутацию, например, индуцированную ферментами, химическими веществами или облучением, или мутацию, полученную путем сайт-направленного мутагенеза (с помощью молекулярно-биологических способов получения специфических и преднамеренных изменений в последовательности нуклеиновых кислот и/или в аминокислотной последовательности). Таким образом, термины "мутация" или "мутирование" должны пониматься как также охватывающие физически осуществление мутации, например, в последовательности нуклеиновых кислот или в аминокислотной последовательности. Мутация включает замену, делецию и инсерцию одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот, а также инсерцию нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Для получения мутации в аминокислотной последовательности, предпочтительно мутация может быть интродуцирована в нуклеотидной последовательности, кодирующей указанную аминокислотную последовательность, для экспрессии (рекомбинантного) мутированного полипептида. Мутация может быть осуществлена, например, путем изменения, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну аминокислоту, с получением кодона, кодирующей другую аминокислоту, или путем синтеза варианта последовательности, например, с известной нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид и путем синтеза молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептид без необходимости мутирования одного или нескольких нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты.

Некоторые документы процитированы в тексте настоящего описания. Каждый из документов, процитированных в настоящей заявке (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителей, инструкции и др.), не независимо от того, ранее или в дальнейшем, таким образом полностью включены в качестве ссылки. Ничто из содержащегося в настоящей заявке не следует рассматривать как допуск того, что изобретение дает право датировать задним числом такой раскрытие, основываясь на более раннем изобретении.

Подразумевается, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящей заявке, так как они могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящей заявке, предназначена только для описания предпочтительных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, так как оно будет ограничиваться только пунктами приложенной формулы изобретения. Если специально не указано иначе, то все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, будут иметь такие же значения, как обычно используются квалифицированным специалистом в данной области техники.

Антитела, эффективно нейтрализующие инфекцию, вызванную вирусом Зика.

Настоящее изобретение основывается, среди других находок, на открытии и выделении антител, которые связываются специфически с эпитопами вируса Зика. Такие антитела либо являются (I) чрезвычайно эффективными для нейтрализации вируса Зика, если нацелены на антигенную детерминанту белка оболочки (E) вируса Зика или на ZIKV четвертичный эпитоп или (II) пригодны для диагностики инфекции, вызванной вирусом Зика, если направлены на NS1 белок вируса Зика. Такие антитела являются желательными, так как только очень небольшие количества антител необходимы для нейтрализации вируса Зика. В особенности, в настоящее время не существует способов предотвращения и лечения инфекции, вызванной вирусом Зика. Антитела в соответствии с настоящим изобретением являются чрезвычайно эффективными для предотвращения, а также для лечения или ослабления инфекции, вызванной вирусом Зика. Кроме того, вследствие специфичности антител к вирусу Зика, они не вызывают ADE, а наоборот блокируют ADE. Для диагностики, специфические антитела к вирусу Зика обеспечивают важные средства для дифференцировки инфекции, вызванной вирусом Зика, от инфекций, вызванных другими флавивирусами, такими как вирус денге.

В первом аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом вируса Зика и нейтрализуют инфекцию, вызванную вирусом Зика, которое содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 (i) в соответствии с SEQ ID NO: 1-5 и 7 или (ii) в соответствии с SEQ ID NO: 1-4 и 6-7. Предпочтительно они ингибируют

этап жизненного цикла вируса после присоединения вируса Зика к клеточной мембране.

Другими словами, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением, уменьшает вирусную инфекционность вируса Зика.

Для изучения и количественного определения вирусной инфекционности (или "нейтрализации") в лаборатории квалифицированный специалист в данной области техники знает различные стандартные "анализы на нейтрализацию". Для анализа на нейтрализацию, вирусы животных типично размножают в клетках и/или клеточных линиях. В контексте настоящего изобретения, предпочтительным является анализ на нейтрализацию, в котором культивированные клетки инкубируют с фиксированным количеством вируса Зика (ZIKV) в присутствии (или отсутствии) тестируемого антитела. Для считывания данных, можно использовать, например, проточную цитометрию. Альтернативно, также возможны другие варианты считывания данных, такие как определение количества неструктурных белков ZIKV (такого как ZIKV NS1), секретируемых в культуральный супернатант. Например, тест (TCID50-ELISA) захвата антигена ZIKV неструктурного белка 1 (NS1) на основании инфицирующей дозы-50 (TCID50) для культивируемой ткани с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), можно использовать в качестве альтернативы стандартному анализу бляшкообразования для титрования вирус Зика - сходным образом, как описано для вируса денге (DENV) авторами Li J, Hu D-M, Ding X-X, Chen Y, Pan Y-X, Qiu L-W, Che X-Y: Enzyme-linked immunosorbent assay - format tissue culture infectious dose-50 test for titrating virus denge. PLoS ONE 2011, 6:e22553. В таком анализе, можно благоприятно использовать, например, ZIKV NS1-связывающие антитела, как описано в настоящей заявке.

Предпочтительно в анализе на нейтрализацию ZIKV культивированные клетки, например, клетки Vero, инкубируют с фиксированным количеством ZIKV в присутствии или отсутствии тестируемого антитела, например, приблизительно в течение четырех дней. После инкубирования, клетки можно промыть и дополнительно культивировать. Для измерения вирусной инфекционности, можно использовать проточную цитометрию. Для этого, клетки можно фиксировать, например, с помощью 2% формальдегида, пермеабиллизировать, например, в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) 1% FCS (фетальная телячья сыворотка) 0,5% сапонин, и окрашивать, например, с помощью мышиного антитела 4G2. После этого клетки можно инкубировать с козым анти-мышиним IgG, конъюгированным с красителем, таким как Alexa Fluor488, и анализировать путем проточной цитометрии. Альтернативно, жизнеспособные клетки можно обнаруживать с помощью проточной цитометрии, используя, например, реагент WST-1 (Roche). Предпочтительный ZIKV штамм, который используют в таком анализе на нейтрализацию, представляет собой ZIKV H/PF/2013.

Описанное в заявке антитело и антигенсвязывающий фрагмент имеют высокую нейтрализующую эффективность. Концентрация антитела, необходимая для нейтрализации вируса Зика на 50% (IC_{50}), по сравнению с контролями без антител, составляет, например, вплоть до приблизительно 3 мкг/мл или вплоть до приблизительно 1 мкг/мл. Предпочтительно, концентрация антитела, необходимая для нейтрализации на 50% ZIKV (IC_{50}), составляет вплоть до приблизительно 500 нг/мл, более предпочтительно концентрация антитела согласно изобретению, необходимая для нейтрализации на 50% ZIKV (IC_{50}), составляет вплоть до приблизительно 250 нг/мл, еще более предпочтительно концентрация антитела согласно изобретению, необходимая для нейтрализации на 50% ZIKV (IC_{50}), составляет вплоть до приблизительно 150 нг/мл. Наиболее предпочтительно, концентрация антитела, необходимая для нейтрализации на 50% ZIKV (IC_{50}), составляет приблизительно 100 нг/мл или меньше, например, приблизительно 90 нг/мл или меньше, приблизительно 80 нг/мл или меньше, приблизительно 70 нг/мл или меньше, приблизительно 60 нг/мл или меньше, приблизительно 50 нг/мл или меньше, приблизительно 45 нг/мл или меньше, приблизительно 40 нг/мл или меньше, приблизительно 35 нг/мл или меньше, приблизительно 30 нг/мл или меньше, приблизительно 25 нг/мл или меньше, приблизительно 20 нг/мл или меньше или, особенно предпочтительно, приблизительно 15 нг/мл или меньше. В особенности, концентрация антитела, необходимая для нейтрализации на 50% ZIKV (IC_{50}), составляет предпочтительно приблизительно 50 нг/мл или меньше. Это обозначает, что только низкие концентрации антитела необходимы для нейтрализации на 50% ZIKV. Концентрация антитела, необходимая для нейтрализации на 50% ZIKV (IC_{50}), может быть измерена с применением стандартных анализов на нейтрализацию, как известно квалифицированному специалисту в данной области техники или, в особенности, как описано выше.

В большинстве случаев, связывание антитела может быть оценено с помощью стандартного ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), который хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области техники. Типичный стандартный ELISA может быть осуществлен следующим образом: ELISA планшеты могут быть покрыты (например, в течение ночи при 4°C) достаточным количеством (например, 1 мкг/мл) белка/комплекса/частицы, с которым связывается тестируемое антитело (например, для связывания DENV, как описано ниже, используют DENV E белки и/или DENV VLP), например, в PBS. После этого планшеты можно блокировать, например, с помощью 1% мас./об. раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS, и инкубировать с тестируемым антителом (например, приблизительно в течение 1,5 часа при комнатной температуре). После промывания, можно определять связывание антитела, например, используя козы анти-человеческие IgG, связанные со щелочной фосфатазой. После этого планшеты можно промывать, можно добавлять необходимый субстрат (например, p-

NPP) и планшеты можно анализировать, например, при 405 нм. Относительные аффинности связывание антитела можно определить путем измерения концентрации mAb (EC_{50}), необходимой для достижения 50% максимального связывания при насыщении. EC_{50} значения можно рассчитать путем интерполяции кривых связывания, подогнанных с помощью нелинейной регрессии по четырем параметрам с изменяемым наклоном.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением по существу не связываются с вирусоподобными частицами денге, и/или с оболочечным белком денге. Таким образом, "по существу не связывается" обозначает, что для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, EC_{50} значений вплоть до 10^2 нг/мл, предпочтительно вплоть до 10^3 нг/мл, более предпочтительно вплоть до 5×10^3 нг/мл, еще более предпочтительно вплоть до 8×10^3 нг/мл, и наиболее предпочтительно вплоть до 10^4 нг/мл может быть определено в стандартном ELISA к частицам, подобным вирусу денге (DENV VLP) и/или к оболочечному белку денге (DENV E белок). Другими словами, концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необходимая для достижения 50% максимального связывания при насыщении (EC_{50}) к частицам, подобным вирусу денге (DENV VLP) и/или к оболочечному белку денге (DENV E белок) в стандартном ELISA типично составляет больше, чем 10^2 нг/мл, предпочтительно больше, чем 10^3 нг/мл, более предпочтительно больше, чем 5×10^3 нг/мл, еще более предпочтительно больше, чем 8×10^3 нг/мл, и наиболее предпочтительно больше, чем 10^4 нг/мл.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением не способствует антителозависимому усилению (ADE) инфекции, вызванной вирусом Зика.

ADE может быть оценено с помощью анализа на основании проточной цитометрии, используя, например, культивированные клетки или клеточные линии, такие как K562 клетки. Например, тестируемые антитела и ZIKV могут быть смешаны в течение 1 ч при 37°C и добавлены к 5000 K562 клеткам/лунку. Через четыре дня, клетки могут быть фиксированы, пермеабиллизированы, и окрашены с помощью m4G2, например, как описано выше для анализов на нейтрализацию. Количество инфицированных клеток определяли путем проточной цитометрии, как описано выше для анализов на нейтрализацию.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело человека.

Предпочтительно, антитело в соответствии с настоящим изобретением, или его антигенсвязывающий фрагмент содержат Fc компонент. Более предпочтительно, Fc компонент.

Как используется в настоящей заявке, термин "Fc компонент" относится к последовательности, имеющей происхождение из участка тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающегося в шарнирной области сразу против хода транскрипции сайта расщепления папаином (например, остаток 216 в нативном IgG, принимая первый остаток константного участка тяжелой цепи за номер 114) и оканчивающийся на C-конце тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, Fc компонент может представлять полный Fc компонент или его часть (например, домен). Полный Fc компонент содержит по меньшей мере шарнирный домен, CH2 домен, и CH3 домен (например, EU положения аминокислот 216-446). Иногда присутствует дополнительный лизиновый остаток (K) в самом C-конце Fc компонента, но часто он отщепляется от зрелого антитела. Каждое из положений аминокислот в пределах Fc компонента было пронумеровано в соответствии с известной в данной области техники EU системой нумерации Кэбота, см., например, Kabat и др., в "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Министерство здравоохранения и социального обеспечения США (U.S. Dept. Health and Human Services), 1983 и 1987.

В контексте настоящего изобретения Fc компонент содержит по меньшей мере один: шарнирный (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домен, CH2 домен, CH3 домен, или его вариант, часть или фрагмент. В предпочтительных вариантах осуществления, Fc компонент содержит по меньшей мере шарнирный домен, CH2 домен или CH3 домен. Более предпочтительно, Fc компонент представляет собой полный Fc компонент. Fc компонент также может содержать одну или несколько аминокислотных инсерций, делеций или замен по сравнению с встречающимся в природе Fc компонентом. Например, по меньшей мере один из шарнирного домена, CH2 домена или CH3 домена (или его часть) может быть делетирован. Например, Fc компонент может содержать или состоять из: (I) шарнирный домен (или его часть), слитый с CH2 доменом (или его частью), (II) шарнирный домен (или его часть), слитый с CH3 доменом (или его частью), (III) CH2 домен (или его часть), слитый с CH3 доменом (или его частью), (IV) шарнирный домен (или его часть), (V) CH2 домен (или его часть), или (VI) CH3 домен или его часть.

Для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятно, что Fc компонент может быть модифицирован таким образом, что он различается по аминокислотной последовательности от полного Fc компонента встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина, при этом сохраняя по меньшей мере одну желательную функцию, предоставляемую встречающимся в природе Fc компонентом. Такие функции включают связывание Fc рецептора (FcR), модуляция периода полужизни антитела, ADCC функцию, связывание белка А, связывание белка G, и связывание комплемента. Части встречающихся в природе Fc компонентов, которые отвечают и/или являются важными для таких функций, хоро-

шо известны квалифицированным специалистам в данной области техники.

Например, для активации каскада реакций комплемента C1q связывается с по меньшей мере двумя молекулами IgG1 или одной молекулой IgM, присоединенной к антигенной мишени (Ward, E.S., и Ghetie, V., *Theor. Immunol.* 2 (1995) 77-94). Burton, D.R., описали (*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206), что участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотные остатки с 318 до 337, вовлечен в фиксацию комплемента. Duncan, A.R., и Winter, G. (*Nature* 332 (1988) 738-740), используя сайт-направленный мутагенез, описали, что Glu318, Lys320 и Lys322 образуют сайт связывания с C1q. Роль Glu318, Lys320 и Lys322 остатков в связывании C1q подтверждается способностью короткого синтетического пептида, содержащего эти остатки, ингибировать лизис, опосредованный комплементом.

Например, FcR связывание может опосредоваться путем взаимодействия Fc компонента (антитела) с Fc рецепторами (FcR), которые представляют собой специализированные рецепторы клеточной поверхности на гемопоэтических клетках. Fc рецепторы относятся к суперсемейству иммуноглобулинов, и известно, что они опосредуют как удаление патогенов, покрытых антителами, путем фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и других различных клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, путем антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC; Van de Winkel, J.G., и Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). FcR определяются по их специфичности для классов иммуноглобулинов; Fc рецепторы для IgG антител обозначаются как FcγR, для IgE как FcεR, для IgA как FcαR и так далее, и неонатальные Fc рецепторы обозначаются как FcRn. Связывание Fc рецептора описано, например, в Ravetch, J.V., и Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., и др., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M., и др., *J Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; и Gessner, J.E., и др., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

Перекрестное связывание рецепторов с помощью Fc домена нативных IgG антител (FcγR) запускает разнообразные эффекторные функции, включая фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность, и высвобождение воспалительных медиаторов, а также клиренс иммунного комплекса и регуляцию продукции антител. Следовательно, предпочтительными являются Fc компоненты, обеспечивающие перекрестное связывание рецепторов (FcγR). У людей, было охарактеризовано три класса FcγR, которые представляют собой: (I) FcγRI (CD64), которые связывают мономерные IgG с высокой аффинностью и экспрессируются на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и эозинофилах; (II) FcγRII (CD32), связывающие комплексные IgG со средней или низкой аффинностью, широко экспрессируются, в особенности, на лейкоцитах, и известно, что они являются ключевым элементом в опосредованной антителами иммуногенности, и они могут быть разделены на FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIC, которые осуществляют различные функции в иммунной системе, но связываются со сходной низкой активностью с IgG-Fc, и эктодомены этих рецепторов являются высоко гомологичными; и (III) FcγRIII (CD16), которые связывают IgG со средней или низкой аффинностью и существуют в виде двух типов: FcγRIIIA, обнаруженные на NK клетках, макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и Т-клетках и опосредующие ADCC и FcγRIIB, которые высоко экспрессируются на нейтрофилах. FcγRIIA были обнаружены на многих клетках, вовлеченных в уничтожение (например, макрофаги, моноциты, нейтрофилы) и полагают, что они способны активировать процесс уничтожения. Полагают, что FcγRIIB принимают участие в ингибирующих процессах, и они были обнаружены на В-клетках, макрофагах и на тучных клетках и эозинофилах. Важно, что 75% всех FcγRIIB было обнаружено в печени (Ganesan, L.P. и др., 2012: FcγRIIB on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Immunology* 189: 4981-4988). FcγRIIB в большом количестве экспрессируется в синусоидальной эндотелии печени, называемом LSEC, и в купферовских клетках в печени и LSEC представляют собой основной сайт клиренса небольших иммунных комплексов (Ganesan, L.P. и др., 2012: FcγRIIB on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Immunology* 189: 4981-4988).

Таким образом, предпочтительными являются такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые способны связываться с FcγRIIB, например, антитела, содержащие Fc компонент для связывания с FcγRIIB, в особенности Fc фрагмент, такие как, например, антитела IgG-типа. Кроме того, представляется возможным конструировать Fc компонент для усиления FcγRIIB связывания путем интродукции мутаций S267E и L328F, как описано Chu, S.Y. и др., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIB with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933. Таким образом, может быть усилен клиренс иммунных комплексов (Chu, S., и др., 2014: Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xmab7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor FcγRIIB. *Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts*). Таким образом, в контексте настоящего изобретения предпочтительными являются такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат сконструированный Fc компонент с мутациями S267E и L328F, в особенности, как описано Chu, S.Y. и др., 2008: Inhibition of B cell receptor - mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIB with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933.

Полагают, что на В-клетках их функция состоит в подавлении дальнейшей продукции иммуногло-

булинов и переключении изотипа, например, на IgE класс. На макрофагах, FcγRIIB действуют путем ингибирования фагоцитоза, что опосредуется с помощью FcγRIIA. На эозинофилах и тучных клетках, b форма может помогать подавлять активацию этих клеток путем IgE связывания с его отдельным рецептором.

При рассмотрении FcγRI связывания, модификация в нативном IgG по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329 уменьшает связывание с FcγRI. IgG2 остатки в положениях 233-236, замещенные в IgG1 и IgG4, уменьшают связывание с FcγRI в 10³-раз и элиминируют ответ моноцитов человека на сенсibilизированные антителами эритроциты (Armour, K.L., и др. *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624). При рассмотрении FcγRII связывания, уменьшенное связывание для FcγRIIA было обнаружено, например, для IgG мутации по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 и K414. При рассмотрении FcγRIII связывания, уменьшенное связывание с FcγRIIA было обнаружено, например, для мутации по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 и D376. Картирование сайтов связывания на IgG1 человека для Fc рецепторов, вышеуказанные сайты мутаций и способы для определения связывания с FcγRI и FcγRIIA описано в Shields, R.L., и др., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604.

При рассмотрении связывания с чрезвычайно важным FcγRII, полагают, что два участка нативного IgG Fc являются ключевыми для взаимодействий FcγRII и IgG, а именно (I) нижний шарнирный сайт IgG Fc, в особенности аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, EU нумерация), и (II) смежный участок CH2 домена IgG Fc, в особенности петля и цепи в верхнем CH2 домене, смежные с нижней шарнирной областью, например, в участке P331 (Wines, B.D., и др., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313-5318). Кроме того, полагают, что FcγRI связывается с тем же самым сайтом на IgG Fc, в то время как FcRn и белок A связываются с другим сайтом на IgG Fc, что, по всей видимости, является на поверхности раздела CH2-CH3 (Wines, B.D., и др., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313-5318).

Например, Fc компонент может содержать или состоять из по меньшей мере части Fc компонента, которая, как известно в данной области, необходима для FcRn связывания или удлинения периода полужизни. Альтернативно или дополнительно, Fc компонент антитела может содержать по меньшей мере часть, которая, как известно в данной области, является необходимой для связывания белка A и/или Fc компонент антитела может содержать по меньшей мере часть Fc молекулы, которая, как известно в данной области, необходима для связывания белка G. Предпочтительно, сохраненная функция представляет собой нейтрализацию инфекции, вызванной вирусом Зика, которая, как полагают, опосредуется связыванием FcγR. Таким образом, предпочтительный Fc компонент может содержать по меньшей мере часть, которая, как известно в данной области, является необходимой для FcγR связывания. Таким образом, как указано выше, предпочтительный Fc компонент может по меньшей мере содержать (I) нижний шарнирный сайт нативного IgG Fc, в особенности аминокислотные остатки L, L, G, G (234-237, EU нумерация), и (II) смежный участок CH2 домена нативного IgG Fc, в особенности петлю и цепи в верхнем CH2 домене, смежные с нижней шарнирной областью, например, в участке P331, например, участок по меньшей мере из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 последовательных аминокислот в верхнем CH2 домене нативного IgG Fc около P331, например, между аминокислотами 320 и 340 (EU нумерация) нативного IgG Fc.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержит Fc фрагмент. Как используется в настоящей заявке, термин "Fc фрагмент" относится к части иммуноглобулина, образованной двумя или более Fc компонентами тяжелых цепей антитела. Например, Fc фрагмент может представлять собой мономерный или "одноцепочечный" Fc фрагмент (то есть, scFc фрагмент). Одноцепочечные Fc фрагменты состоят из Fc компонентов, связанных в пределах одной полипептидной цепи (например, кодируемые в одной непрерывной последовательности нуклеиновых кислот). Типичные scFc фрагменты описаны в WO 2008/143954 A2. Предпочтительно, Fc фрагмент представляет собой димерный Fc фрагмент. "Димерный Fc фрагмент" или "dcFc" относится к димеру, образованному Fc компонентами двух отдельных тяжелых цепей иммуноглобулинов. Димерный Fc фрагмент может представлять собой гомодимер двух идентичных Fc компонентов (например, Fc фрагмент встречающегося в природе иммуноглобулина) или гетеродимер двух неидентичных Fc компонентов.

Fc компоненты Fc фрагмента могут быть из одного и того же или различных классов и/или подклассов. Например, Fc компоненты могут иметь происхождение из иммуноглобулина (например, иммуноглобулина человека) IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 подкласса. Предпочтительно, Fc компоненты Fc фрагмента есть одного и тоже класса и подкласса. Тем не менее, Fc фрагмент (или один или несколько Fc компонентов Fc фрагмента) также может быть химерным, вследствие чего химерный Fc фрагмент может содержать Fc компоненты, имеющие происхождение из различных классов и/или подклассов иммуноглобулинов. Например, по меньшей мере два из Fc компонентов димерного или одноцепочечного Fc фрагмента могут быть из различных классов и/или подклассов иммуноглобулинов. Дополнительно или альтернативно, химерные Fc фрагменты могут содержать один или несколько химерных Fc компонентов. Например, химерный Fc фрагмент или компонент может содержать одну или несколько частей, имеющих происхождение из иммуноглобулина первого подкласса (например, IgG1, IgG2, или IgG3 подкласса), в то время как оставшаяся часть Fc фрагмента или компонента является из другого подкласса. Например, Fc фрагмент или компонент Fc полипептида может содержать CH2 и/или CH3 домены, имеющий

происхождение из иммуноглобулина первого подкласса (например, IgG1, IgG2 или IgG4 подкласса) и шарнирную область из иммуноглобулина второго подкласса (например, IgG3 подкласса). Например, Fc фрагмент или компонент может содержать шарнир и/или CH2 домен, имеющий происхождение из иммуноглобулина первого подкласса (например, IgG4 подкласса) и CH3 домен из иммуноглобулина второго подкласса (например, IgG1, IgG2, или IgG3 подкласса). Например, химерный Fc фрагмент может содержать Fc компонент (например, полный Fc компонент) из иммуноглобулина первого подкласса (например, IgG4 подкласса) и Fc компонент из иммуноглобулина второго подкласса (например, IgG1, IgG2 или IgG3 подкласса). Например, Fc фрагмент или компонент может содержать CH2 домен из IgG4 иммуноглобулина и CH3 домен из IgG1 иммуноглобулина. Например, Fc фрагмент или компонент может содержать CH1 домен и CH2 домен из IgG4 молекулы и CH3 домен из IgG1 молекулы. Например, Fc фрагмент или компонент может содержать часть CH2 домена из предпочтительного подкласса антитела, например, EU положения 292-340 CH2 домена. Например, Fc фрагмент или компонент может содержать аминокислоты в положениях 292-340 CH2, имеющего происхождение из IgG4 компонента, и оставшуюся часть CH2, имеющую происхождение из IgG1 компонента (альтернативно, 292-340 из CH2 могут иметь происхождение из IgG1 компонента и оставшуюся часть CH2, имеющую происхождение из IgG4 компонента).

Кроме того, Fc фрагмент или компонент может содержать (дополнительно или альтернативно) например, химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может иметь происхождение, например, частично, из IgG1, IgG2, или IgG4 молекулы (например, верхней и нижней серединной шарнирной последовательности) и, частично, из IgG3 молекулы (например, серединной шарнирной последовательности). В другом примере, Fc фрагмент или компонент может содержать химерный шарнир, имеющий происхождение, частично, из IgG1 молекулы и, частично, из IgG4 молекулы. В другом примере, химерный шарнир может содержать верхний и нижний шарнирные домены из IgG4 молекулы и серединный шарнирный домен из IgG1 молекулы. Такой химерный шарнир может быть получен, например, путем интродуцирования пролиновой замены (Ser228Pro) в EU положении 228 в серединном шарнирном домене IgG4 шарнирной области. В другом варианте осуществления, химерный шарнир может содержать аминокислоты в EU положениях 233-236 из IgG2 антитела и/или Ser228Pro мутацию, где оставшиеся аминокислоты шарнира имеют происхождение из IgG4 антитела (например, химерный шарнир последовательности ESKYGPPCPPCPAPPVAGP). Другие химерные шарниры, которые могут использоваться в Fc компоненте антитела в соответствии с настоящим изобретением, описаны в US 2005/0163783 A1.

Fc компонент или Fc фрагмент может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, имеющей происхождение из последовательности иммуноглобулина человека (например, из Fc фрагмента или Fc компонента из молекулы IgG человека). Тем не менее, полипептиды могут содержать одну или несколько аминокислот из других видов млекопитающих. Например, Fc компонент примата или сайт связывания примата может быть включен в заявляемые полипептиды. Альтернативно, одна или несколько мышинных аминокислот могут присутствовать в Fc компоненте или в Fc фрагменте.

Предпочтительно, антитело может содержать, в особенности дополнительно к Fc компоненту, как описано выше, другие части, имеющие происхождение из константного участка, в особенности из константного участка IgG, предпочтительно из константного участка IgG1, более предпочтительно из константного участка IgG1 человека. Более предпочтительно, антитело в соответствии может содержать, в особенности дополнительно к Fc компоненту, как описано выше, все другие части константных участков, в особенности все другие части константных участков IgG, предпочтительно все другие части константных участков IgG1, более предпочтительно все другие части константных участков IgG1 человека.

В особенности предпочтительные последовательности константных участков могут представлять собой аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 145-148 (последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 149-152). Предпочтительно, аминокислотная последовательность из IgG1 CH1-CH2-CH3 может представлять собой последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 145 или ее вариант функциональной последовательности. Еще более предпочтительно, аминокислотная последовательность IgG1 CH1-CH2-CH3 может представлять собой последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 146 или ее вариант функциональной последовательности, как описано в настоящей заявке, где поддерживается "LALA" мутация.

Как указано выше, особенно предпочтительное антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит (полный) Fc фрагмент, имеющий происхождение из IgG1 человека. Однако антитело может содержать, в особенности дополнительно к (полному) Fc фрагменту, имеющему происхождение из IgG1 человека, также все другие части константных участков IgG, предпочтительно все другие части константных участков IgG1, более предпочтительно все другие части константных участков IgG1 человека.

Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что антителозависимое усиление (ADE) инфекции, вызванной вирусом Зика, обусловлено, вероятно, связыванием Fc компонента антитела, в особенности, Fc компонента тяжелой цепи молекулы IgG, с Fc рецептором, например, Fcγ рецептором на клетке-хозяине. Таким образом, является предпочтительным, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать одну или несколько мутаций в Fc компоненте. Мутация(и) может(гут) представлять собой любую мутацию, которая уменьшает связывание антитела с Fc рецептором (FcR). Таким образом, предпочтительно, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать одну

или несколько мутаций в Fc компоненте, которая(ые) (I) уменьшает(ют) связывание антитела с Fc γ рецептором, но не нарушает(ют) взаимодействие с FcRn. Одним из примеров такой мутации является "LA-LA" мутация, описанная ниже.

Как правило, связывание антитела с Fc рецептором может быть оценено с помощью различных способов, известных квалифицированному специалисту в данной области техники, таких как ELISA (Hessell AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CEG, Beurskens FJ, Bakker JM, Lanigan CMS, Landucci G, Forthall DN, Parren PWHI, и др.: Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. Nature 2007, 449:101-104; Grevys A, Bern M, Foss S, Bratlie DB, Moen A, Gunnarsen KS, Aase A, Michaelsen TE, Sandlie I, Andersen JT: Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions. 2015, 194:5497-5508) или проточной цитометрии (Perez LG, Costa MR, Todd CA, Haynes BF, Montefiori DC: Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. J Virol 2009, 83:7397-7410; Piccoli L, Campo I, Fregni CS, Rodriguez BMF, Minola A, Sallusto F, Luisetti M, Corti D, Lanzavecchia A: Neutralization and clearance of GM-CSF by autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis. Nat Commun 2015, 6:1-9).

Антитело может быть гликозилированным. N-связанные гликаны, присоединенные к CH2 домену тяжелой цепи, например, могут оказывать влияние на C1q и FcR связывание, с агликозилированными антителами, имеющими более низкую аффинность к этим рецепторам. Таким образом, CH2 домен Fc компонента антитела может содержать одну или несколько мутаций, в которых гликозилированный остаток заменен на негликозилированный остаток. Структура гликана также может оказывать влияние на активность, например, можно наблюдать различия в комплементопосредованной клеточной гибели в зависимости от количества галактозных сахаров (0, 1 или 2) на концах двухантенной цепи гликана. Предпочтительно, гликаны антител не приводят к иммуногенным ответным реакциям у человека после введения.

Кроме того, антитело в соответствии с настоящим изобретением может быть модифицировано путем интродуцирования случайных аминокислотных мутаций в конкретный участок CH2 домена тяжелой цепи для изменения их аффинности связывания для FcR и/или их времени полужизни в сыворотке крови по сравнению с немодифицированными антителами.

Особенно предпочтительно, Fc компонент антитела может содержать замену в положениях CH2 4, CH2 5, или обоих. Как правило, аминокислота в положениях 4 и 5 CH2 дикого типа IgG1 и IgG3 представляет собой лейцин ("L"). Предпочтительно, антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит обе, CH2 L4A и CH2 L5A замены. Такие антитела обозначаются в настоящей заявке как "LALA" вариант. Чрезвычайно интересен тот факт, что такая "LALA" мутация в Fc компоненте не только приводит к отсутствию вклада соответствующего антитела в антителозависимое усиление (ADE) инфекции, вызванной вирусом Зика, но также блокирует антителозависимое усиление (ADE) инфекции, вызванной вирусом Зика. Типичная аминокислотная последовательность IgG1 CH1-CH2-CH3, содержащая "LALA" мутацию, представляет собой последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 146. Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII, также обозначается как "DIII"). Другими словами, предпочтительно, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков домена III белка оболочки вируса Зика (EDIII). ZIKV включает нуклеокапсидное ядро, которое содержит одноцепочечную РНК, обернутую ядерными белками. Нуклеокапсидное ядро инкапсулировано липидной двухслойной мембраной с "мембранными белками" и "оболочечными белками". Белок оболочки ZIKV (Е белок) представляет собой доминантный антиген. Эктодомен белка оболочки содержит три различных домена: домен I Е белка (EDI), домен II Е белка (EDII), и домен III Е белка (EDIII). EDIII является высоко консервативным среди различных ZIKV штаммов (см. фиг. 12 относительно выравнивания аминокислотных последовательностей EDIII различных штаммов ZIKV).

Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент более предпочтительно связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII) с EDIII, имеющим следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 401):

TAAFFTFKXPAEXXHGTVTVEXQYXGXDGPCKXPXQMAVDXQTLTPVGRLITA

NPVITEXTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGXGXXKITHHWHR

где X может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту.

Также является предпочтительным, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII) с EDIII, имеющим следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 407):

X₁GX₂X₃YSLCTAAFTFTKX₄PAEX₅X₆HGTVTVEX₇QYX₈GX₉DGPCKX₁₀PX₁₁QM

AVDX₁₂QTLTPVGRLITANPVITEX₁₃TX₁₄NSKMMLELDPPFGDSYIVIGX₁₅GX₁₆

X₁₇KITHHWHRSG

где X₁ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочти-

тельно К, А, или Е;

X₂ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно V, F, или L;

X₃ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно S или F;

X₄ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно I или V;

X₅ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно T или V;

X₆ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно L или D;

X₇ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно V или G;

X₈ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно или G;

X₉ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, за исключением R, предпочтительно T или A;

X₁₀ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно V или I;

X₁₁ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно или V;

X₁₂ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно M или T;

X₁₃ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно S или G;

X₁₄ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно E или K;

X₁₅ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно V или I;

X₁₆ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно E, A, K, или D; и

X₁₇ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно E, A, или K, более предпочтительно K или A.

Например, EDIII простирается от аминокислоты 309 до аминокислоты 403 E белка ZIKV штамма ZIKV H/PF/2013 (номер доступа Genbank KJ776791). Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент наиболее предпочтительно связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII) с EDIII, имеющим следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 402):

TAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLTA

NPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHR.

Неожиданно, изобретателями настоящего изобретения было обнаружено, что связывание антитела с доменом III белка оболочки вируса Зика (EDIII) проявляет (I) повышенную нейтрализацию ZIKV и (II) сниженную перекрестную реакционную способность с DENV (в особенности по существу отсутствие перекрестной реакционной способности с DENV), по сравнению со связыванием антитела с доменом I/II белка оболочки вируса Зика (EDI/II).

Более предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков латерального гребня (LR) в EDIII и/или один или несколько аминокислотных остатков EDI-EDIII шарнирной области. EDIII латеральный гребень и EDI-EDIII шарнирная область известны квалифицированному специалисту в данной области техники и описаны, например, в Zhao, H., Fernandez, E., Dowd, K.A., Speer, S.D., Platt, D.J., Gorman, M.J., Govero, J., Nelson, C.A., Pierson, T.C., Diamond, M.S., и др. (2016). Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. Cell 166(4): 1016-27 и в Kostyuchenko VA, Lim EX, Zhang S, Fibriansah G, Ng TS, Ooi JS, Shi J, Lok SM. Structure of the thermally stable Zika virus. Nature. 2016 May 19;533(7603):425-8. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что (I) связывание с LR может ингибировать слияние путем задержки переходного состояния слияния вируса и (II) связывание с EDI-EDIII шарниром и EDIII может препятствовать движению EDIII с образованием трехмерной структуры после слияния, останавливая таким образом мембранный синтез.

Таким образом, заявленное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (способны) ингибировать этап после присоединения ZIKV). "После присоединения" типично относится к любому этапу инфекции ZIKV после присоединения ZIKV к клеточной мембране (клетки, на которую нацелен ZIKV). Например, они предпочтительно способны предотвращать мембранный синтез. Кроме того, пред-

почтительно описанные в заявке антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны вызывать агрегацию ZIKV (частиц), а также ингибировать этап после присоединения ZIKV и (II) вызывать агрегацию ZIKV (частиц).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также могут связываться с четвертичным эпитопом, представленным на ZIKV инфекционном вирионе. Несмотря на значительную нейтрализующую активность, такие антитела проявляют типично не обнаруживаемое связывание с рекомбинатным E белком ZIKV или с ZIKV EDIII в стандартном ELISA (как описано выше), то есть, при тестировании в условиях *in vitro*, в особенности в очищенной форме (то есть E белок ZIKV "за пределами/без" вириона, вирусоподобной частицы или др.). Таким образом, "не обнаруживаемое связывание" типично обозначает, что EC₅₀ вплоть до 10000 нг/мл не обнаруживается в стандартном ELISA. Другими словами, если EC₅₀, обнаруживаемое в стандартном ELISA, составляет выше 10000 нг/мл, то это обозначается как "не обнаруживаемое связывание".

Таким образом, такие антитела также обозначаются в настоящей заявке как "нейтрализующие, но не связывающие E" (NNB) антитела. Четвертичный эпитоп, экспонированный на инфекционном вирионе ZIKV, типично представляет собой конформационный эпитоп. Например, четвертичный эпитоп, экспонированный на инфекционном вирионе ZIKV, может быть образован на поверхности раздела мономеров двух оболочечных белков, образуя димер ("оболочечный димерный эпитоп"; EDE) или он может быть образован в пределах соседних димеров ("эпитоп по типу "елочки").

Как правило, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно содержать (по меньшей мере) три участка, определяющие комплементарность (CDR) на тяжелой цепи и (по меньшей мере) три CDR на легкой цепи. Как правило, участки, определяющие комплементарность (CDR) представляют собой гипервариабельные участки, присутствующие на вариабельных доменах тяжелой цепи и вариабельных доменах легкой цепи. Типично, CDR тяжелой цепи и связанной легкой цепи антитела совместно образуют антигенный рецептор. Обычно, три CDR (CDR1, CDR2, и CDR3) расположены последовательно в вариабельном домене. Поскольку антигенные рецепторы типично состоят из двух вариабельных доменов (на двух различных полипептидных цепях, то есть тяжелой и легкой цепи), существует шесть CDR для каждого антигенного рецептора (тяжелая цепь: CDRH1, CDRH2, и CDRH3; легкая цепь: CDRL1, CDRL2, и CDRL3). Единичная молекула антитела обычно имеет два антигенных рецептора и, следовательно, содержит двенадцать CDR. CDR на тяжелой и/или легкой цепи могут быть разделены каркасными участками, тем самым каркасный участок (FR) представляет собой участок в вариабельном домене, который является менее "вариабельным", чем CDR. Например, цепь (или каждая цепь, соответственно) может состоять из четырех каркасных участков, разделенных тремя CDR.

Последовательности тяжелых цепей и легких цепей типичных антител, содержащие три различные CDR на тяжелой цепи и три различные CDR на легкой цепи, были определены. Положения аминокислот CDR определены в соответствии с системой нумерации IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>; cf. Lefranc, M.-P. и др. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37, D1006-D1012).

В табл. 1 представлены SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR тяжелых цепей (CDRH1, CDRH2, и CDRH3) и вариабельного участка тяжелой цепи (обозначаемого как "VH") типичных антител в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 1

Название антитела	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
ZKA190	1	2	3	8
ZKA185	19	20	21	26
ZKA230	37	38	39	44
ZKA78	55	56	57	62
ZKA64	73	74	75	80
ZKA3	237	238	239	240
ZKA4	241	242	243	244
ZKA5	245	246	247	248
ZKA6	249	250	251	252
ZKA7	253	254	255	256
ZKA8	257	258	259	260
ZKA76	261	262	263	264
ZKA117	265	266	267	268
ZKB27	269	270	271	272
ZKB29	273	274	275	276
ZKB34	277	278	279	280
ZKB39	281	282	283	284
ZKB46	285	286	287	288
ZKB53	289	290	291	292
ZKC26	293	294	295	296
ZKD5	297	298	299	300

ZKD7	301	302	303	304
ZKD8	305	306	307	308
ZKD15	309	310	311	312
ZKD16	313	314	315	316
ZKD17	317	318	319	320
ZKD20	321	322	323	324
ZKA134	325	326	327	328
ZKA246	329	330	331	332
ZKA256	333	334	335	336
ZKB42	337	338	339	340
ZKB85	341	342	343	344
ZKB47	345	346	347	348
ZKC6	349	350	351	352
ZKA160	353	354	355	356
ZKA172	357	358	359	360
ZKA174	361	362	363	364
ZKA189	365	366	367	368
ZKA195	369	370	371	372
ZKA215	373	374	375	376
ZKA218	377	378	379	380
ZKB75	381	382	383	384
ZKB83	385	386	387	388
ZKC3	389	390	391	392
ZKC18	393	394	395	396
ZKD1	397	398	399	400

В табл. 2 ниже представлены SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR легких цепей (CDRL1, CDRL2, и CDRL3) и варибельного участка легкой цепи (обозначаемого как "VL") типичных антител в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 2

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

Таким образом, предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержат варибельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей и/или варибельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 9 или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут также содержать тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один CDRH1, по меньшей мере один CDRH2 и по меньшей мере один CDRH3 и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один CDRL1, по меньшей мере один CDRL2 и по меньшей мере один CDRL3, где по меньшей мере один CDR, предпочтительно по меньшей мере один CDRH3 тяжелой цепи, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, как указано в любой из SEQ

меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей и/или вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 45 или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей и/или вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 9 или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой gZKA190, gZKA64, gZKA230, gZKA185 или gZKA78.

Изобретатели настоящего изобретения выделили моноклональные антитела (mAb), которые обозначаются в настоящей заявке как ZKA190, ZKA64, ZKA230, ZKA185 и ZKA78 (см. табл. 1 и 2, Пример 1). На основании этих антител, в особенности на VH и VL генах этих антител, термины "gZKA190", "gZKA64", "gZKA230", "gZKA185" и "gZKA78", как используется в настоящей заявке, относятся к соответствующим "родовым" антителам или их антигенсвязывающим фрагментам.

А именно, "gZKA190" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему CDRH1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, CDRH2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2, CDRH3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3, CDRL1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4, CDRL2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5 или 6, и CDRL3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7. Вариабельный участок тяжелой цепи (VH) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8 и вариабельный участок легкой цепи (VL) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9.

"gZKA64" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему CDRH1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 73, CDRH2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 74, CDRH3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 75, CDRL1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 76, CDRL2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 77 или 78, и CDRL3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 79. Вариабельный участок тяжелой цепи (VH) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 80 и вариабельный участок легкой цепи (VL) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 81.

"gZKA230" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему CDRH1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 37, CDRH2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 38, CDRH3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 39, CDRL1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 40, CDRL2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 41 или 42, и CDRL3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 43. Вариабельный участок тяжелой цепи (VH) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 44 и вариабельный участок легкой цепи (VL) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 45.

"gZKA185" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему CDRH1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19, CDRH2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20, CDRH3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 21, CDRL1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22, CDRL2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 23 или 24, и CDRL3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25. Вариабельный участок тяжелой цепи (VH) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26 и вариабельный участок легкой цепи (VL) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 27.

"gZKA78" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему CDRH1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55, CDRH2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, CDRH3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57, CDRL1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58, CDRL2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 59 или 60, и CDRL3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 61. Варибельный участок тяжелой цепи (VH) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 62 и варибельный участок легкой цепи (VL) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63.

Как уже отмечалось, предпочтительно антитело согласно изобретению представляет собой одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

Вторым объектом данного изобретения является применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика. Предпочтительно у субъектов с диагностированной инфекцией, вызванной вирусом Зика, или у субъектов, проявляющих симптомы инфекции Зика или у субъекта, не проявляющего симптомов инфекции Зика. Предпочтительно субъектом может быть беременная женщина.

Третьим объектом данного изобретения является применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению для мониторинга качества вакцины против вируса Зика путем проверки, что антиген указанной вакцины содержит специфический эпитоп в правильной конформации.

Молекула нуклеиновой кислоты.

В другом аспекте, изобретение также обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше.

Примеры молекул нуклеиновых кислот и/или полинуклеотидов включают, например, рекомбинантный полинуклеотид, вектор, олигонуклеотид, молекулу РНК, такую как рРНК, мРНК, микроРНК, миРНК, или тРНК, или молекулу ДНК, такую как кДНК. Предпочтительными являются последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие части или все легкие и тяжелые цепи и CDR антител согласно настоящему изобретению.

Предпочтительна молекула нуклеиновой кислоты, полинуклеотидная последовательность которой содержит или состоит из последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с любой из SEQ ID NO: 10-18, 28-36, 46-54, 64-72, и 82-90; или вариант ее функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

Таким образом, предпочтительно в настоящей заявке обеспечиваются последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие части или все легкие и тяжелые цепи, в особенности VH и VL последовательности и CDR типичных антител согласно изобретению. В табл. 1 и 2 представлены номера SEQ ID для аминокислотных последовательностей CDR и VH и VL описанных в заявке антител.

В табл. 3 ниже представлены номера SEQ ID последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CDR и VH и VL раскрытых в заявке антител.

Молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, содержащую, предпочтительно состоящую из компонентов нуклеиновых кислот. Термин молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно относится к молекулам ДНК и РНК. В особенности, он используется синонимично с термином "полинуклеотид". Предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полимер, содержащий или состоящий из нуклеотидных мономеров, которые ковалентно связаны друг с другом с помощью фосфодиэфирных связей сахарофосфатного остова. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" также охватывает модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, такие как молекулы ДНК или РНК с модифицированными основаниями, модифицированными сахарами или модифицированным остовом, и т.д.

В табл. 3 представлены типичные последовательности нуклеиновых кислот CDR и варибельного участка тяжелой цепи (VH) и варибельного участка легкой цепи (VL) пяти типичных антител в соответствии с настоящим изобретением ("ZKA190", "ZKA64", "ZKA230", "ZKA185", "ZKA78").

Таблица 3

ZKA190	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	10	ggattcaccttcagtaaatatggc
CDRH2	11	atatcatatgagggagtaataaa
CDRH3	12	gcgaaatcggggacccaatactatgatactactggttatgagtatagg ggtttggaaactttggctac
CDRL1	13	cagagtgttagtagcagttac
CDRL2	14	gatgcatcc
CDRL2 длинный	15	ctcatctat gatgcatcc agcagggcc
CDRL3	16	cagcagtatggtaggtcaagggtggaca
VH	17	caggtgcagctgggtgagctctgggggagggcgtggccagcctgggagg tccttgagactctcctgtgagcctct ggattcaccttcagtaaatat ggc atgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtg gcagttat atcatatgagggagtaataaa tattatgcagactccgtg aagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgcgtgat ctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggcagtgattactgt gcgaaatcggggacccaatactatgatactactggttatgagtatagg ggtttggaaactttggctact ggggccagggaaccctggtcaccgctc tcctcag
VL	18	gaaattgtgttgacgcagctctccaggcaccctgtctttgtctccaggg gaaagagccaccctctcctgcagggccagtc cagagtgttagtagcagt tact ttagcctgggtaccagcagaaaacgtggccaggctcccaggetcctc atctat gatgcatcc agcagggccactggcatcccagacaggttcagt ggcagtggtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagactggag cctgaagattttgcagtgattactgt cagcagtatggtaggtcaagg tggaca ttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaac
ZKA185	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	28	ggatatagttttaccagttactgg
CDRH2	29	tttgatcctagtgactctcaaac
CDRH3	30	gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggacaat
CDRL1	31	gcattgcaataaattt
CDRL2	32	gaggacaac
CDRL2 длинный	33	gtcatctat gaggacaac aaacgacc
CDRL3	34	tactcaacagacagcagttctaatcccctgggagta
VH	35	gaagtgcagctgggtgcagtcctggagcagaggtgaaaaagcccggggag tctctgaggatctcctgtaagggttct ggata tagttttaccagttac tgg atcacctgggtgcgccagatgccgggaaaggcctggagtggatg gcgaagt ttgatcctagtgactctcaaac caactacagcccgtccttc caaggccagtcaccatctcagttgacaagtcacatcagcactgcctac ttgcagtgagcagcctgaaggcctcgacaccgccatgtattactgt gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggacaat ggggc

		cagggaaacctgggtcaccatcttctcag
VL	36	tcctatgagctgacacagccaccctcgggtgcagtggtccccaggacaa acggccaggatcacctgctctggagatg cattgccaataaattt gct tattggtaccggcagaagtcaggccaggccccctgttctggtcatctat gaggacaac aaacgaccctccgggatccctgagagattctctggctcc agctcagggacaatggccaccttgactatcagtggggcccagggtggag gatgaagctgactaccactgt tactcaacagacagcagttcta atccc ctgggagta ttcggcggaggggaccaagctgaccgtcctag
ZKA230	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	46	ggtggctccatcagtagtgactac
CDRH2	47	atctattacagtgggagcacc
CDRH3	48	gcgaggaggaggaagtatgattccctttggggagttttgcttttgat atc
CDRL1	49	agctccaacatcggaggtattat
CDRL2	50	attaatgat
CDRL2 длинный	51	ctcatctgt attaatgat caccggccc
CDRL3	52	gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta
VH	53	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggcctggggaagccttcggag accctgtccctcacctgcgagctctct ggtggctccatcagtagtgac tact ggagctggatccggcagccccagggaagggactggagtgatt gggtata tctattacagtgggagcacc aactacaacccctccctcaag agtcgagtcaccatcagtagacacgtccaagaaccacttctccctg aagctgaactctgtgacogctgcgacacggccgtgtattactgt gcg aggaggaggaagtatgattccctttggggagttttgcttttgat atc tggggccaagggacaatgggtcaccgtctcttcag
VL	54	cagtcctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggaccccgggag agggtcaccatctctgttctggaagc agctccaacatcggaggtaat ta tgtatactggtagcagctcccaggaacggccccaaactcctc atctgt attaatgat caccggccctcaggggtccctgaccgattctct ggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccag tccgaggatgaggctgattattactgt gcaacatgggatgacagcctg ggtggccttgta ttcggcggaggggaccaagctgaccgtcctag

ZKA78	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	64	ggcttcacttttagtaactatgca
CDRH2	65	atcgggcgcaacggggactctatc
CDRH3	66	gtgaaagatctggccatccccgagtctctacagaattgaagetgattat
CDRL1	67	cagtcctgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac
CDRL2	68	tgggcttca
CDRL2 длинный	69	ctgatctat tgggcttca acccgggaa
CDRL3	70	cagcagtactattctagtcctcgaact
VH	71	gaggtgcagctggcagaatcaggcgggggactggccagcctggcggc agcctgacactgtctctgcagtgatc aggcttcacttttagtaactat gcaatggtgtgggcaaggcaggctcctgggaagggactggagtatgtc tctggca tggggcgcaacggggactctatc tactatactgatagtgtg aagggccggttcaccatcagcagagacaatagcaaatccatgggtgtac ctgcagatgagctccctgcgaaccgaagacacagcagtgactattgc gtgaaagatctggccatccccgagtctctacagaattgaagetgattat tggggacagggcacccctggtcacgtgagcgcg
VL	72	gacatcgtgatgacacagctctccagatagtctggcagtcagtcctgggg gagagggccactattaaactgcaagagctccc cagtcctgtgctgtaccgc tctaacaacaagaattac ctgtcttggtatcagcagaagccggacag ccccctaactgctgatctat tgggcttca acccgggaaagcggcgctc ccagacagattctcaggcagcgggtccggaacagacttcaccctgaca attagccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactattgt cagcag tactattctagtcctcgaact ttcggccaggggaccaaggtggaaatc aaac
ZKA64	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	82	ggctacacottcacagggtatcac
CDRH2	83	attaaccctaattctggcgggacc
CDRH3	84	gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatcat
CDRL1	85	cagtcctgtgctgattaac
CDRL2	86	ggagcatcc

CDRL2 длинный	87	ctgatctat ggagcatcct ccaggct
CDRL3	88	cagcagtacaatgattggcccc tatcaca
VH	89	caggtgcagctggtccagagcggagcagaggtgaagaaaccggcgcc tcagtgaaggctcagctgcaaagcttcc ggctacaccttcacagggtat cac atcgactgggtgagggcaggcaagaggacaggactggaatggatg ggacgg attaaccetaattctggcgggacc aactacgcccagaagttt cagggccgagtgactatgaccagagacaccagcatctccacagcttat atgcagctgtcccggctgagatctgacgatagtgccgtctactattgt gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatcaat tgggggcagggga aactggtgactgtcagttcag
VL	90	gagatcgtgatgactcagctccagccaccctgtcagtcagcccagga gaacgggcaaccctgtcttgacagagcctcc cagtcctgtgctgattaac ctggccttggtaccagcagaagccaggccaggcaccgccgactgctgatc tat ggagcatcct ccagggctaccggcattctgcacgcttcagtgga tcaggaagcggaaacagagtttacctgacaatctctagctctcagttcc gaagacttcgctgtctactattgt cagcagtcacaatgattggccccct atcaca tttggccaggggactagactggagatcaagc

Итак, последовательность молекулы нуклеиновой кислоты может содержать или состоять из последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с любой из SEQ ID NO: 10-18, 28-36, 46-54, 64-72, и 82-90; или ее вариант функциональной последовательности.

Также последовательности нуклеиновых кислот могут включать последовательности нуклеиновых кислот, имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность по отношению к нуклеиновой кислоте, кодирующей CDR, VH последовательность и/или VL последовательность, используемой в (типичном) антителе, например, в последовательностях, представленных в табл. 3.

В целом, с молекулой нуклеиновой кислоты можно манипулировать для инсерции, делеции или изменения определенных последовательностей нуклеиновых кислот. Изменения при такой манипуляции включают, но, не ограничиваясь только ими, изменения для интродуцирования сайтов рестрикции, для изменения частоты используемого кодона, для добавления или оптимизации транскрипции и/или трансляции регуляторных последовательностей и др. Также представляется возможным изменять нуклеиновую кислоту для изменения кодируемых аминокислот. Например, может быть полезным интродуцировать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т.д.) аминокислотных замен, делеций и/или инсерций в аминокислотную последовательность антитела. Такие точечные мутации могут модифицировать эффекторные функции, аффинность связывания антигена, посттрансляционные модификации, иммуногенность, и т.д., могут интродуцировать аминокислоты для присоединения ковалентных групп (например, меток) или могут интродуцировать хвосты (например, для очистки). Мутации можно интродуцировать в специфические сайты или можно интродуцировать случайно, с последующей селекцией (например, молекулярная эволюция). Например, одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих CDR участки, VH последовательность и/или VL последовательность (типичного) антитела можно случайно или направленно изменять для интродуцирования различных свойств в кодируемые аминокислоты. Такие изменения могут приводить к итеративному процессу, в котором сохраняются исходные изменения и новые изменения в другие нуклеотидные положения интродуцируются. Более того, изменения, осуществляемые на независимых этапах, можно комбинировать. Различные свойства, интродуцируемые в кодируемые аминокислоты, могут включать, но, не ограничиваясь только ими, измененную аффинность.

Вектор.

Еще одним объектом настоящего изобретения является экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, то есть молекуле нуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе. Вектор в контексте настоящего изобретения является подходящим для инкорпорирования или заякоривания желательной последовательности нуклеиновых кислот. Такие векторы могут представлять собой векторы для хранения, экспрессионные векторы, клонирующие векторы, трансферные векторы и др. Вектор для хранения представляет собой вектор, который предоставляет возможность подходящего хра-

нения молекулы нуклеиновой кислоты. Таким образом, вектор может содержать последовательность, соответствующую, например, желательному антителу или его фрагменту антитела. Экспрессионный вектор может использоваться для получения продуктов экспрессии, таких как РНК, например, мРНК, или пептиды, полипептиды или белки. Например, экспрессионный вектор может содержать последовательности, необходимые для транскрипции последовательности, такие как промоторная последовательность. Клонированный вектор типично представляет собой вектор, содержащий клонирующий сайт, который может использоваться для инкорпорации последовательностей нуклеиновых кислот в вектор. Клонированный вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор или бактериофаговый вектор. Трансферный вектор может представлять собой вектор, который пригоден для переноса молекул нуклеиновых кислот в клетки или организмы, например, вирусные векторы. Вектор в контексте настоящего изобретения может представлять собой, например, РНК вектор или ДНК вектор. Предпочтительно, вектор представляет собой молекулу ДНК. Например, вектор в контексте настоящей заявки содержит сайт клонирования, селективируемый маркер, такой как фактор резистентности к антибиотику, и последовательность, подходящую для размножения вектора, такую как точка начала репликации. Предпочтительно, вектор в контексте настоящей заявки представляет собой плазмидный вектор.

Клетки.

Наконец, настоящее изобретение также относится к клетке, экспрессирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением; и содержащей вектор в соответствии с настоящим изобретением.

Примеры таких клеток включают, но, не ограничиваясь только ими, эукариотические клетки, например, клетки дрожжей, клетки животных или клетки растений. Предпочтительно, клетки представляют собой клетки млекопитающих, более предпочтительно клеточную линию млекопитающих. Предпочтительные примеры включают клетки человека, CHO клетки, HEK293T клетки, PER.C6 клетки, NS0 клетки, клетки печени человека, миеломные клетки или гибридомные клетки.

В особенности, клетка может быть трансфектирована экспрессионным вектором в соответствии с настоящим изобретением. Термин "трансфекция" относится к интродукции молекул нуклеиновой кислоты, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки. В контексте настоящего изобретения, термин "трансфекция" охватывает любой способ, известный квалифицированному специалисту для интродукции молекул нуклеиновой кислоты в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки, например, в клетки млекопитающих. Такие способы охватывают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основании катионных липидов и/или липосом, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию на основании наночастиц, трансфекцию на основании вирусных, или трансфекцию на основании катионных полимеров, такие как DEAE-декстран или полиэтиленмин и др. Предпочтительно, интродукция является невирусной.

Клетки могут быть трансфектированы стабильно или временно вектором в соответствии с настоящим изобретением, например, для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, клетки стабильно трансфектируют вектором, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Альтернативно, также является предпочтительным, что клетки временно трансфектируют вектором в, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Необязательные дополнительные характерные особенности антител.

Антитела могут быть связаны, например, с лекарственным средством для доставки в сайт лечения или связаны с обнаруживаемой меткой для облегчения визуализации сайта, содержащего клетки, представляющие интерес. Способы связывания антител с лекарственными средствами и обнаруживаемыми метками хорошо известны в данной области техники, также как и способы визуализации, используя обнаруживаемые метки. Меченые антитела могут применяться в различных анализах, используя разнообразные метки. Обнаружение образования комплекса антитело-антиген между антителом и эпитопом, представляющим интерес, может быть облегчено путем присоединения обнаруживаемого вещества к антителу. Подходящее обнаружение обозначает включение применения меток, таких как радионуклиды, ферменты, коферменты, флуоресцентные вещества, хемилюминесцентные вещества, хромогены, субстраты ферментов или кофакторы, ингибиторы ферментов, простетические группы комплексов, свободные радикалы, частицы, красители и другие. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих простетических групп комплексов включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; примером люминесцентного материала является люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин, и экворин; и примеры подходящих радиоактивных материалов включают ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, или ³H. Такие меченые реагенты могут использоваться в различных хорошо известных исследованиях, таких как радиоиммунологические анализы, иммуноферментные анализы, например, ELISA, флуоресцентные иммуноанализы, и др. Следовательно, меченые антитела могут использоваться в таких анализах, например, как описано в US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837; и US 4,233,402.

Антитело может быть конъюгировано с терапевтическим компонентом, таким как цитотоксин, терапевтическое средство, или радиоактивный ион металла или радиоактивный изотоп. Примеры радиоактивных изотопов включают, но, не ограничиваясь только ими, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111, и др. Такие конъюгаты антител можно использовать для модификации данной биологической ответной реакции; лекарственный компонент не следует рассматривать как ограниченный только классическими химическими терапевтическими средствами. Например, лекарственный компонент может представлять собой белок или полипептид, обладающий желательной биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки, или дифтерийный токсин.

Технологии конъюгирования такого терапевтического компонента к антителам хорошо известны. См., например, Arnon и др. (1985) (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," в *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, под ред. Reisfeld и др. (Alan R. Liss, Inc.), сс. 243-256; под ред. Hellstrom и др. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," в *Controlled Drug Delivery*, под ред. Robinson и др. (2-ое изд.; Marcel Dekker, Inc.), сс. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," в *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, под ред. Pinchera и др. сс. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," в *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, под ред. Baldwin и др. (Academic Press, New York, 1985), сс. 303-316; и Thorpe и др. (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-158.

Альтернативно, антитело или его фрагмент антитела могут быть конъюгированы со вторым антителом или его фрагментом антитела, с образованием гетероконъюгата антитела, как описано в US 4,676,980. Дополнительно, можно использовать линкеры между метками и антителами согласно изобретению, например, как описано в US 4,831,175. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть непосредственно мечены радиоактивным йодом, индием, иттрием или другой радиоактивной частицей, известной в данной области техники, например, как описано в US 5,595,721. Лечение может состоять из комбинации лечения с применением конъюгированных и неконъюгированных антител, вводимых одновременно или последовательно, например, как описано в WO 00/52031; WO 00/52473.

Антитела также могут быть присоединены к твердой подложке. Дополнительно, антитела согласно изобретению или их функциональные фрагменты антител, могут быть химически модифицированы путем ковалентного конъюгирования с полимером, например, повышая их циркулирующий период полужизни. Примеры полимеров и способы их присоединения к пептидам представлены в US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 и US 4,609,546. В некоторых вариантах осуществления, полимеры могут быть выбраны из полиоксиэтилированных полиолов и полиэтиленгликоля (PEG). PEG растворим в воде при комнатной температуре, и имеет общую формулу: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R может представлять собой водород или защитную группу, такую как алкильная или алканольная группа. Предпочтительно, защитная группа может иметь от 1 и 8 углеродов. Например, защитная группа представляет собой метил. Символ n представляет собой положительное целое число. В одном варианте осуществления n находится в диапазоне от 1 до 1000. В другом варианте осуществления n находится в диапазоне от 2 до 500. Предпочтительно, PEG имеет средний молекулярный вес в диапазоне от 1000 до 40000, более предпочтительно PEG имеет молекулярный вес в диапазоне от 2000 до 20000, еще более предпочтительно PEG имеет молекулярный вес в диапазоне от 3000 до 12000. Кроме того, PEG может иметь по меньшей мере одну гидроксильную группу, например, PEG может иметь концевую гидроксильную группу. Например, она представляет собой концевую гидроксильную группу, которая активируется для реакции со свободной аминогруппой на ингибиторе. Тем не менее, следует принять во внимание, что тип и количество реакционно-способных групп может изменяться для достижения ковалентного конъюгированного PEG/антитела.

Водорастворимые полиоксиэтилированные полиолы в данном случае также пригодны. Они включают полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу, полиоксиэтилированный глицерин (POG), и др. В одном варианте осуществления, используют POG. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, поскольку глицериновый остов полиоксиэтилированного глицерина представляет собой такой же остов, что и встречающийся в природе, например, у животных и людей в моно-, ди-, триглицеридах, то это разветвление не следует рассматривать как чужеродный агент в организме. POG может иметь молекулярный вес в таком же диапазоне, что и PEG. Другая система для доставки лекарственного средства, которая может использоваться для повышения циркулирующего периода полужизни, представляет собой липосому. Способы приготовления липосомных систем доставки известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Другие системы доставки лекарственных средств известны в данной области и описаны, например, в ссылках в Poznansky и др. (1980) и Poznansky (1984).

Предпочтительно антитела согласно изобретению могут быть в очищенной форме. Типично, антитело будет присутствовать в композиции, когда они по существу не содержат других полипептидов, например, где меньше, чем 90% (по весу), обычно меньше, чем 60% и более предпочтительно меньше, чем 50% композиции состоит из других полипептидов.

Антитела могут быть иммуногенными у хозяев, отличающихся от людей (или гетерологичных), например, у мышей. В особенности, антитела могут иметь идиотоп, который является иммуногенным у

хозяев, отличающихся от людей, но не у человека-хозяина. В особенности, антитела включают те антитела, которые не могут быть легко выделены из таких хозяев, как мыши, козы, кролики, крысы, млекопитающие, отличающиеся от приматов, и др., и обычно не могут быть получены путем гуманизации или из ксено-мышей.

Получение антител.

Антитела могут быть получены с помощью любого способа, известного в данной области техники. Например, обычная методология получения моноклональных антител с применением гибридомной технологии хорошо известна (Kohler, G. и Milstein, C., 1975; Kozbar и др. 1983). Можно также использовать альтернативный способ EBV иммортализации, описанный в WO 2004/076677.

Предпочтительный способ описан в WO 2004/076677. В этом способе В-клетки, продуцирующие антитело, трансформируют с помощью EBV и поликлонального активатора В-клеток. Дополнительные стимуляторы клеточного роста и дифференциации необязательно можно добавлять на этапе трансформации для усиления эффективности. Эти стимуляторы могут представлять собой цитокины, такие как IL-2 и IL-15. В одном аспекте, IL-2 добавляют во время стадии иммортализации для дальнейшего улучшения эффективности иммортализации, но их применение не является существенным. После этого иммортализованные В-клетки, полученные с использованием этих способов, можно культивировать с помощью методов, известных в данной области техники и на основании этого выделять антитела.

Другой предпочтительный способ описан в WO 2010/046775. В этом способе плазматические клетки культивируют в ограниченных количествах, или в виде единичных плазматических клеток в микролуночных культуральных планшетах. Антитела могут быть выделены из культуры плазматических клеток. Кроме того, из культур плазматических клеток, может быть экстрагирована РНК и может быть осуществлена ПЦР с применением способов, известных в данной области техники. VH и VL участки антител могут быть амплифицированы с помощью ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскриптазой), секвенированы, и клонированы в экспрессионном векторе, который затем трансфектируют в НЕК293Т клетки или другие клетки-хозяева. Клонирование нуклеиновой кислоты в экспрессионных векторах, трансфекция клеток-хозяев, культивирование трансфектированных клеток-хозяев и выделение продуцированного антитела может быть осуществлено с использованием любых способов, известных квалифицированному специалисту в данной области техники.

Антитела могут быть дополнительно очищены, при необходимости, используя фильтрацию, центрифугирование и различные хроматографические методы, такие как ВЭЖХ или аффинная хроматография. Технологии очистки антител, например, моноклональных антител, включая технологии получения антител фармацевтической степени чистоты, хорошо известны в данной области техники.

Фрагменты антител могут быть получены из антител с помощью способов, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей путем химического восстановления. Альтернативно, фрагменты антител могут быть получены путем клонирования и экспрессирования части последовательностей тяжелых или легких цепей. Фрагменты антитела согласно изобретению предпочтительно включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты. Одноцепочечные Fv фрагменты - scFv, могут содержать CDR антитела. В уровне техники также описаны мономеры и димеры тяжелых и легких цепей, однодоменная тяжелая цепь антитела, однодоменная легкая цепь антитела, а также одно-цепочечные антитела, например, одноцепочечный Fv, в котором переменные домены тяжелой и легкой цепи соединены пептидным линкером.

Фрагменты антител могут передавать моновалентные или мультивалентные взаимодействия и держаться в различных структурах, как описано выше. Например, могут быть синтезированы scFv молекулы для создания трехвалентного "триатела" или четырехвалентного "тетратела." scFv молекулы могут включать домен Fc фрагмента, что приводит к получению двухвалентных минител. Дополнительно, последовательности могут быть компонентом мультиспецифических молекул, в которых последовательности нацеливают эпитопы и другие участки молекулы на связывание с другими мишенями. Типичные молекулы включают, но, не ограничиваясь только ими, биспецифические Fab2, триспецифические Fab3, биспецифические scFv, и диатела (Holliger и Hudson, 2005, Nature Biotechnology 9: 1126-1136).

Стандартные методики молекулярной биологии можно использовать для приготовления ДНК последовательностей, кодирующих антитела или фрагменты антител. Желательные ДНК последовательности могут быть синтезированы полностью или частично, используя методики олигонуклеотидного синтеза. В качестве подходящих можно использовать методики сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Любую подходящую систему клетка-хозяин/вектор можно использовать для экспрессии ДНК последовательностей, кодирующих молекулы антитела или их фрагменты. Бактериальные, например, E. coli, и другие микробные системы можно использовать, в частности, для экспрессии фрагментов антител, таких как Fab и F(ab')₂ фрагменты, и в особенности Fv фрагменты и одноцепочечные фрагменты антител, например, одноцепочечные Fv. Экспрессионные системы на основании эукариотических, например, млекопитающих, клеток-хозяев, можно использовать для получения больших молекул антител, включая полные молекулы антител. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают, но, не ограничиваясь только ими, CHO, НЕК293Т, PER.C6, NS0, миеломные или гибридомные клетки.

Способ получения молекулы антитела включает культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту в условиях, подходящих для экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела, и выделения молекулы антитела.

Молекула антитела может содержать только полипептид тяжелой и легкой цепи, в этом случае только последовательность, кодирующую полипептид тяжелой цепи или легкой цепи, необходимо использовать для трансфекции клеток-хозяев. Для получения продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, клеточную линию можно трансфектировать двумя векторами, первым вектором, кодирующим полипептид легкой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, можно использовать единственный вектор, который включает последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Альтернативно, антитела могут быть получены путем (I) экспрессии последовательности нуклеиновых кислот в клетке-хозяине, например, путем применения вектора, и (II) выделения экспрессируемого продукта антитела. Дополнительно, способ может включать (III) очистку выделенного антитела. Трансформированные В-клетки и культивируемые плазматические клетки можно подвергать скринингу для обнаружения тех, которые продуцируют антитела с желательной специфичностью или функцией.

Стадию скрининга можно осуществлять путем иммунологического анализа, например, ELISA, путем окрашивания тканей или клеток (включая трансфектированные клетки), путем анализа на нейтрализацию или с помощью одного из различных других способов, известных в данной области техники для идентификации желательной специфичности или функции. Анализ можно выбирать на основании простого распознавания одного или нескольких антигенов, или можно выбрать на основании желательной функции, например, для выбора нейтрализующих антител, которые не только связываются с антигеном, для выбора антител, которые могут изменять характеристики целевых клеток, такие как их каскады передачи сигналов, их форму, их скорость роста, их способность оказывать влияние на другие клетки, их ответную реакцию на воздействие других клеток или других реагентов или на изменение условий, их дифференцированные состояния, и т.д.

После этого можно получать индивидуальные трансформированные клоны В-клеток из положительно трансформированной культуры В-клеток. Этап клонирования для разделения индивидуальных клонов из смеси положительных клеток можно осуществлять с использованием серийного разведения, микроманипуляции, депонирования единичной клетки путем сортировки клеток или другого способа, известного в данной области техники.

Нуклеиновую кислоту из культивируемых плазматических клеток можно выделять, клонировать и экспрессировать в НЕК293Т клетках или других известных клетках-хозяевах, используя способы, известные в данной области техники.

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

Возможно получение композиции, содержащей иммортализованные В-клетки памяти или трансфектированные клетки-хозяева, которые продуцируют антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Иммортализованный клон В-клеток или культивируемые плазматические клетки также можно использовать в качестве источника нуклеиновой кислоты для клонирования генов антител для последующей рекомбинантной экспрессии. Экспрессия из рекомбинантных источников является более распространенной для фармацевтических целей, чем экспрессия из В-клеток или гибридом, например, по соображениям стабильности, воспроизводимости, простоты культивирования и т.д.

Таким образом, способ получения рекомбинантной клетки может включать этапы: (I) получения одной или нескольких нуклеиновых кислот (например, мРНК тяжелой и/или легкой цепи) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которые кодируют антитело, представляющее интерес; (II) инсертирования нуклеиновой кислоты в экспрессионный вектор и (III) трансфекции вектора в клетку-хозяина для разрешения экспрессии антитела, представляющего интерес, в этой клетке-хозяине.

Аналогичным образом, способ получения рекомбинантной клетки может включать этапы: (I) секвенирования нуклеиновой(ых) кислоты (кислот) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которые кодируют антитело, представляющее интерес; и (II) использования информации последовательности со стадии (I) для приготовления нуклеиновой(ых) кислоты (кислот) для инсерции в клетку-хозяина для разрешения экспрессии антитела, представляющего интерес, в этой клетке-хозяине. Нуклеиновую кислоту можно, но не обязательно, подвергать манипуляциям между этапами (I) и (II) для интродукции рестрикционных сайтов, для изменения частоты использования кодона, и/или для оптимизации транскрипции и/или трансляции регуляторных последовательностей.

Кроме того, способ получения трансфектированной клетки-хозяина может включать этап трансфекции клетки-хозяина одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, которые кодируют антитело, представляющее интерес, где нуклеиновые кислоты представляют собой нуклеиновые кислоты, которые имеют происхождение из клона иммортализованных В-клеток или культивируемых плазматических клеток согласно изобретению. Таким образом, процедуры для первого приготовления нуклеиновой(ых) ки-

слоты(т) и последующего использования ее для трансфекции клетки-хозяина, можно осуществлять в различное время различными людьми в различных местах (например, в различных странах).

Затем эти рекомбинантные клетки можно использовать для экспрессии и культивирования. Они в особенности пригодны для экспрессии антител для фармацевтического получения в промышленном масштабе. Также их можно использовать в качестве активного компонента фармацевтической композиции. Можно использовать любую подходящую методику культивирования, включая, но, не ограничиваясь только ими, статическую культуру, культуру во вращающемся флаконе, асцитной жидкости, картридж биореактора по типу полых волокон, модульный миниферментер, смесительный бак, культуру на микроносителе, перфузию керамического стержня и др.

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

Трансфектированная клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, включая клетки дрожжей и животных, в особенности клетки млекопитающих (например, CHO клетки, NS0 клетки, клетки человека, такие как PER.C6 или НКВ-11 клетки, миеломные клетки, или клетку печени человека), а также клетки растений, при этом предпочтительными являются клетки млекопитающих. Предпочтительные хозяева для экспрессии могут гликозилировать антитело, в особенности с углеводными структурами, которые сами не являются иммуногенными для людей. В одном варианте осуществления трансфектированная клетка-хозяин способна расти в бессывороточной среде. В дальнейшем варианте осуществления трансфектированная клетка-хозяин способна расти без присутствия продуктов, имеющих происхождение из животных. Трансфектированная клетка-хозяин также может культивироваться с получением клеточной линии.

Способ получения одной или нескольких молекул нуклеиновых кислот (например, генов тяжелой и легкой цепей), которые кодируют антитело, представляющее интерес может содержать этапы: (I) приготовления иммортализованного клона В-клеток или культивирование плазматических клеток; (II) получения из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, представляющее интерес. Кроме того, способ получения последовательности нуклеиновых кислот, которая кодирует антитело, представляющее интерес, может включать этапы: (I) приготовления иммортализованного клона В-клеток или культивирование плазматических клеток в соответствии с изобретением; (II) секвенирования нуклеиновой кислоты из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, которые продуцируют антитело, представляющее интерес.

Способ получения молекулы нуклеиновой(ых) кислоты(т), которая(ые) кодирует антитело, представляющее интерес, может включать стадию получения нуклеиновой кислоты из трансформированного клона В-клеток или культивированных плазматических клеток. Таким образом, процедуры получения сначала клона В-клеток или культивируемой плазматической клетки, а затем получения нуклеиновой(ых) кислоты(т) из клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток можно осуществлять в различное время различными людьми в различных местах (например, в различных странах).

Способ получения антитела (например, для фармацевтического применения), может включать этапы: (I) получения и/или секвенирование одной или нескольких нуклеиновых кислот (например, генов тяжелой и легкой цепи) из выбранного клона В-клеток или культивируемых плазматических клеток, экспрессирующих антитело, представляющее интерес; (II) инсертирования нуклеиновой(ых) кислоты (кислот) в или использования последовательности(ей) нуклеиновой(ых) кислоты (кислот) для приготовления экспрессионного вектора; (III) трансфектирования клетки-хозяина, которая может экспрессировать антитело, представляющее интерес; (IV) культивирования или суб-культивирование трансфектированных клеток-хозяев в условиях, в которых экспрессируется антитело, представляющее интерес; и, необязательно, (V) очистку антитела, представляющего интерес.

Способ получения антитела может включать этапы: культивирования или субкультивирование трансфектированной популяции клеток-хозяев, например, стабильно трансфектированной популяции клеток-хозяев, в условиях, в которых экспрессируется антитело, представляющее интерес, и, необязательно, очистку антитела, представляющего интерес, где указанная трансфектированная популяция клеток-хозяев была получена с помощью (I) обеспечения нуклеиновой(ых) кислоты(т), кодирующей(их) выбранное антитело, представляющее интерес, которое продуцируется клоном В-клеток или культивируемых плазматических клеток, приготовленных, как описано выше, (II) инсертирования нуклеиновой(ых) кислоты(т) в экспрессионный вектор, (III) трансфектирования вектора в клетку-хозяин, которая может экспрессировать антитело, представляющее интерес, и (IV) культивирования или субкультивирования трансфектированной клетки-хозяина, содержащей инсертированные нуклеиновые кислоты для получения антитела, представляющего интерес. Таким образом, процедуры приготовления сначала рекомбинантной клетки-хозяина и последующего ее культивирования для экспрессии антитела можно осуществлять в самое различное время различными людьми в различных местах (например, в различных странах).

Фармацевтическая композиция.

Объектом настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция, содержащая:

- (I) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением;
- (II) нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий в соответствии с настоящим изобретением;
- (III) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением; или
- (IV) клетку, экспрессирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением или содержащую вектор в соответствии с настоящим изобретением;
- (V) фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

Несмотря на то, что носитель или наполнитель могут облегчать введение, он не должен собственно индуцировать продукцию антител, вредных для индивидуума, получающего композицию. Также он не должен быть токсичным. Подходящие носители могут представлять собой большие, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и инактивированные вирусные частицы. В целом, фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции могут представлять собой активные компоненты или неактивные компоненты. Предпочтительно, фармацевтически приемлемый носитель в фармацевтической композиции представляет собой неактивный компонент по отношению к инфекции, вызванной вирусом Зика.

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

Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, солевой раствор, глицерин и этанол. Дополнительно, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты или pH-буферные вещества. Такие носители предоставляют возможность приготавливать фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий, для проглатывания субъектом.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в различных формах. Например, композиции могут быть приготовлены в виде препаратов для инъекций, либо в виде жидких растворов или суспензий. Также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для превращения в раствор или в суспензию в жидких наполнителях перед инъекцией (например, лиофилизированная композиция, подобная Synagis™ и Herceptin™, для восстановления стерильной водой, содержащая консервант). Композиция может быть приготовлена для местного введения, например, в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть приготовлена для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея или в виде сиропа (необязательно ароматизированного). Композиция может быть приготовлена для легочного введения, например, в виде ингалятора, используя тонкоизмельченный порошок или спрей. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория или пессария. Композиция может быть приготовлена для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Композиция может быть в форме набора, созданного таким образом, чтобы комбинированная композиция восстанавливалась только перед введением субъекту. Например, лиофилизированное антитело может обеспечиваться в форме набора со стерильной водой или стерильным буфером.

Если активный компонент в композиции представляет собой молекулу антитела, фрагмент антитела или их варианты и производные, то он чувствителен к деградации в желудочно-кишечном тракте. Следовательно, если композицию вводят путем с использованием желудочно-кишечного тракта, то композиция может содержать агенты, которые защищают антитело от разложения, но которые высвобождают антитело после того, как оно было абсорбировано из желудочно-кишечного тракта.

Всестороннее обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20-ое изд., ISBN: 0683306472.

Фармацевтические композиции обычно имеют значение pH в диапазоне от 5,5 до 8,5, в некоторых вариантах осуществления оно может составлять от 6 до 8, и в других вариантах осуществления приблизительно 7. pH может поддерживаться путем применения буфера. Композиция может быть стерильной и/или апиrogenной. Композиция может быть изотонической по отношению к людям. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции согласно изобретению поставляются в герметически запечатанных контейнерах.

Композиции могут быть представлены в различных формах введения; формы включают, но, не ограничиваясь только ими, те формы, которые пригодны для парентерального введения, например, путем инъекции или инфузии, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Если продукт предназначен для инъекции или инфузии, то он может находиться в форме суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе, и он может содержать вспомогательные агенты для приготовления препаратов, такие как суспендирующие, консервирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, молекула антитела может быть в безводной форме, для восстановления перед применением с подходящей стерильной жидкостью. Под наполнителем типично понимают материал, который является подходящим для хранения, транспортировки и/или введения соединения, такого

как фармацевтически активное соединение, в особенности антитела в соответствии с настоящим изобретением. Например, наполнитель может представлять собой физиологически приемлемую жидкость, которая пригодна для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтически активного соединения, в особенности антитела. После приготовления, композиции могут вводить непосредственно субъекту. В одном варианте осуществления композиции адаптированы для введения млекопитающим, например, субъектам-людям.

Фармацевтические композиции могут вводить различными путями, включая, но, не ограничиваясь только ими, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, костномозговой, внутрибрюшинный, интраокулярный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный, местный, подкожный, интраназальный, энтеральный, сублингвальный, интравагинальный или ректальный пути. Безигольные шприцы также можно использовать для введения фармацевтических композиций. Предпочтительно, фармацевтическая композиция может быть приготовлена для парентерального введения, например, в виде таблеток, капсул и др., для местного введения, или в виде инъекционных препаратов, например, в виде жидких растворов или суспензий, при этом является особенно предпочтительным, когда фармацевтическая композиция представляет собой инъекционный препарат. Также предпочтительными являются твердые формы, подходящие для приготовления раствора или суспензии в жидких носителях перед инъекцией, например, когда фармацевтическая композиция представлена в лиофилизированной форме.

Для инъекции, например, внутривенной, кожной или подкожной инъекции, или инъекции в участок заболевания, активный компонент предпочтительно будет находиться в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апирогенным и имеет подходящее значение pH, изотоничность и стабильность. Квалифицированные специалисты в данной области техники могут приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические наполнители, таких как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактатный раствор Рингера для инъекций, При необходимости, можно добавлять консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие вспомогательные вещества. Независимо от того, полипептид, пептид или молекула нуклеиновой кислоты, или другое фармацевтически пригодное соединение, которое будет вводиться индивидууму, введение предпочтительно осуществлять в "профилактически эффективном количестве" или "терапевтически эффективном количестве" (в зависимости от определенной ситуации), которого достаточно для проявления преимущества у индивидуума. Действительное вводимое количество, и скорость и динамика введения во времени, будут зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. Для инъекции, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержаться, например, в предварительно заполненном шприце.

Фармацевтическая композиция может вводиться перорально в любой перорально приемлемой дозированной форме, включая, но, не ограничиваясь только ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения, носители, которые обычно используются, включают лактозу и кукурузный крахмал. Также типично добавляют смазывающие вещества, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы, пригодный разбавитель включает лактозу и безводный кукурузный крахмал. Когда для перорального введения необходимы водные суспензии, то транспортную карго-конъюгированную молекулу комбинируют с эмульгирующими и суспендирующими средствами. При необходимости, также можно добавлять определенные подсластители, ароматизаторы или красители.

Фармацевтическая композиция также могут вводить местно, в особенности, если цель лечения включает области или органы, достижимые местным введением, например, включая заболевания кожи или любой другой достижимой эпителиальной ткани. Подходящие местные препараты легко приготавливают для каждой из этих областей или органов. Для местных применений, фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде подходящей мази, содержащей фармацевтическую композицию, в особенности ее компоненты, как определено выше, суспендированные или растворенные в одном или нескольких носителях. Носители для местного введения включают, но, не ограничиваясь только ими, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, полиоксипропиленовое соединение, эмульгирующий воск и воск. Альтернативно, фармацевтическая композиция может быть приготовлена в подходящем лосьоне или креме. Подходящие носители включают, но, не ограничиваясь только ими, минеральное масло, сорбитан моностеарат, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и вода.

Дозовое лечение может представлять собой схему с единичными дозами или схему с множественными дозами. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой продукт в виде одной дозы. Предпочтительно, количество антитела в такой фармацевтической композиции не превышает 500 мг.

Например, фармацевтическая композиция может вводиться каждый день, например, один или несколько раз в сутки, например, один, два, три или четыре раза в сутки, предпочтительно один или два раза в сутки, более предпочтительно один раз в сутки, в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 или больше дней, например, каждый день в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 месяцев. Предпочтительно, фармацевтическая композиция может вводиться каждую неделю, например, один или

два раза в неделю, в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 или больше недель, например, каждую неделю в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или каждую неделю в течение 2, 3, 4 или 5 лет. Кроме того, фармацевтическая композиция предпочтительно может вводиться каждый месяц, например, один раз в месяц или, более предпочтительно, раз в два месяца в течение 1, 2, 3, 4 или 5 или больше лет. Также является предпочтительным, что введение продолжается в течение периода жизни. Дополнительно, также предусмотрено только одно однократное введение, в особенности в отношении определенных показаний, например, для предотвращения инфекции, вызванной вирусом Зика, в случае случайного воздействия, например, у неиммунизированных субъектов. Тем не менее, наиболее предпочтительная схема лечения представляет собой постконтактную профилактику (PEP), где одну или несколько однократных доз вводят максимально быстро, насколько это возможно, после инфицирования вирусом Зика. Также предпочтительной является профилактическая схема, где одну или несколько однократных доз вводят для предотвращения инфицирования вирусом Зика (то есть перед инфицированием вирусом Зика, в особенности у субъектов, не иммунизированных к вирусу Зика).

В особенности, является предпочтительным, что для однократной дозы, например, ежедневной, еженедельной или ежемесячной дозы, предпочтительно для еженедельной дозы, количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в фармацевтической композиции может не превышать 1 г, предпочтительно не превышает 500 мг, более предпочтительно не превышает 200 мг, еще более предпочтительно не превышает 100 мг, и особенно предпочтительно не превышает 50 мг.

Фармацевтические композиции типично включают "эффективное" количество одного или нескольких антител, то есть количество, которого достаточно для лечения, облегчения, ослабления или предотвращения желательного заболевания или состояния, или для проявления обнаруживаемого терапевтического эффекта. Терапевтические эффекты также включают уменьшение или ослабление патогенной силы или физических симптомов. Точное эффективное количество для любого конкретного субъекта будет зависеть от их размера, веса и состояния здоровья, природы и распространения состояния, и лекарственных средств или комбинации лекарственных средств, выбранных для введения. Эффективное количество для данной ситуации определяется обычными экспериментами и находится в компетенции лечащего врача. Эффективная доза обычно будет составлять от приблизительно 0,005 до приблизительно 100 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0,0075 до приблизительно 50 мг/кг, более предпочтительно от приблизительно 0,01 - приблизительно 10 мг/кг, и еще более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 5 мг/кг, антитела настоящего изобретения (например, количество антитела в фармацевтической композиции) по отношению к весу тела (например, в кг) индивидуума, которому ее вводят.

Кроме того, фармацевтическая композиция также может содержать дополнительный активный компонент, который может представлять собой дополнительное антитело или компонент, который не представляет собой антитело. Дополнительный активный компонент предпочтительно представляет собой ингибитор контрольных точек. Также является предпочтительным, что ZIKV нейтрализующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно комбинировать с ZIKV NS1-связывающим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в качестве дополнительного активного компонента (соагента). Таким образом, может блокироваться патогенная роль NS1, дополнительно к нейтрализации ZIKV. Фармацевтическая композиция может содержать один или несколько дополнительных активных компонентов, например, как описано ниже, в качестве коагентов в контексте комбинированной терапии.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может присутствовать либо в той же самой фармацевтической композиции в качестве дополнительного активного компонента или, предпочтительно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляют первую фармацевтическую композицию, а дополнительный активный компонент составляет вторую фармацевтическую композицию, отличающуюся от первой фармацевтической композиции. Таким образом, если предусматривается больше одного дополнительного активного компонента, то каждый дополнительный активный компонент и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно, составляют другую фармацевтическую композицию. Такие разные фармацевтические композиции могут вводиться либо комбинированно/одновременно или в разные периоды времени или в разные расположения (например, разделенные части тела).

Предпочтительно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный активный компонент обеспечивают аддитивный терапевтический эффект или, предпочтительно, синергический терапевтический эффект. Термин "синергия" используется для описания комбинированного эффекта двух или более активных агентов, который больше, чем сумма индивидуальных эффектов каждого соответствующего активного агента. Таким образом, если комбинированный эффект двух или более агентов приводит к "синергическому ингибированию" активности или процесса, то это обозначает, что ингибирование активности или процесса больше, чем сумма ингибирующих эффектов каждого соответствующего активного агента. Термин "синергический терапевтический эффект" относится к терапевтическому эффекту, наблюдаемому при комбинировании двух или более терапий, где терапевтический эффект (как измеряется с помощью любого из различных параметров) больше, чем сумма индивидуальных терапевтических эффектов, наблюдаемых при соответствующих индивидуальных терапиях.

Фармацевтическая композиция может содержать антитело в соответствии с gZKA190, gZKA64, gZKA230, gZKA185, gZKA78 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый

носитель.

Композиция может включать антитела, где антитела могут составлять по меньшей мере 50% по весу (например, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) общего белка в композиции. В такой композиции, антитела предпочтительно находятся в очищенной форме.

Способ приготовления фармацевтической композиции может включать этапы: (I) приготовления антитела; и (II) смешивания очищенного антитела с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

Способ получения фармацевтической композиции также может включать стадии: смешивания антитела с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, где антитело представляет собой моноклональное антитело, которое получают из трансформированной В-клетки или культивируемой плазматической клетки согласно изобретению.

В качестве альтернативы доставки антител или В-клеток для терапевтических целей, представляется возможным доставлять нуклеиновую кислоту (типично ДНК), которая кодирует представляющее интерес моноклональное антитело (или его активный фрагмент), имеющее происхождение из В-клетки или культивируемых плазматических клеток субъекту, таким образом, что нуклеиновая кислота может экспрессироваться у субъектов *in situ*, обеспечивая желательный терапевтический эффект. Подходящая генная терапия и векторы для доставки нуклеиновых кислот известны в данной области техники.

Фармацевтические композиции могут включать антимикробное средство, в особенности, если упакованы в формат с многократными дозами. Они могут содержать детергент, например, Tween (полисорбат), такой как Tween 80. Детергенты обычно присутствуют в низких количествах, например, меньше, чем 0,01%. Композиции также могут включать соли натрия (например, хлорид натрия) для придания тоничности. Например, типичной является концентрация 10 ± 2 мг/мл NaCl.

Кроме того, фармацевтические композиции могут содержать сахарный спирт (например, маннит) или дисахарид (например, сахарозу или трегалозу) например, в количестве около 15-30 мг/мл (например, 25 мг/мл), в особенности, если они будут лиофилизированы или если они включают материал, который восстанавливают из лиофилизованного материала. Значение pH композиции для лиофилизации можно доводить в диапазоне от 5 до 8, или в диапазоне от 5,5 до 7, или приблизительно 6,1 перед лиофилизацией.

Композиции также могут содержать один или несколько иммунорегулирующих агентов в частности, один или несколько иммунорегулирующих агентов включает(ют) адьювант.

Медицинские лечения, наборы и применения.

Медицинские лечения.

Еще одним объектом настоящего изобретения является способ предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, у субъекта, предусматривающий введение ему антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора в соответствии с настоящим изобретением, клетки или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением.

А также изобретение относится к такому объекту, как применение нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, клетки согласно изобретению и фармацевтической композиции согласно изобретению для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика.

Кроме того, объектом данного является применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению и нуклеиновой кислоты согласно изобретению для диагностики инфекции, вызванной вирусом Зика.

Способы диагностики могут включать контактирование антитела или фрагмента антитела с образцом. Такие образцы могут быть выделены из субъекта, например, выделенный образец ткани, взятый из, например, носовых ходов, полостей придаточных пазух носа, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, головного мозга, кожи или крови, предпочтительно плазмы или сыворотки. Способы диагностики также могут включать обнаружение комплекса антиген/антитело, в особенности после контактирования антитела или фрагмента антитела с образцом. Такую стадию обнаружения типично осуществляют в лаборатории, то есть без какого-либо контактирования с организмом человека или животного. Примеры способов обнаружения хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники и включают, например, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Предотвращение инфекции, вызванной вирусом Зика, относится в особенности к профилактическим установкам, где у субъекта не была диагностирована инфекция, вызванная вирусом Зика, (либо не осуществлялась диагностика или результаты диагностики были отрицательными) и/или у субъекта не проявляются симптомы инфекции, вызванной вирусом Зика. Таким образом, предотвращение инфекции, вызванной вирусом Зика, включает "постконтактную профилактику" (PEP), то есть превентивное лечение после возможной инфекции, вызванная вирусом Зика, например, после укуса комара в области, пораженной вирусом Зика. Предпочтительно предотвращение инфекции, вызванной вирусом Зика, для субъектов с высоким риском, таких как беременные женщины.

В отличие от этого, при терапевтических установках, субъект типично инфицирован вирусом Зика, у него диагностирована инфекция, вызванная вирусом Зика, и/или проявляются симптомы инфекции,

вызванной вирусом Зика. Несомненно, термины "лечение" и "терапия"/"терапевтический" инфекции ZIKV включают (полное) лечение, а также ослабление инфекции ZIKV.

Предпочтительные способы диагностики инфекции, вызванной вирусом Зика, представляют собой способы диагностики, такие как например, предполагающие использование нейтрализующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или ZIKV NS1-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, вектор в соответствии с настоящим изобретением, клетку в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно применяют для лечения инфекции, вызванной вирусом Зика у субъектов у субъектов, проявляющих симптомы инфекции Зика.

Также предпочтительно, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, вектор в соответствии с настоящим изобретением, клетку в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением применяют для предотвращения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика у субъектов без симптомов. У этих субъектов может быть диагностирована или не диагностирована инфекция, вызванная вирусом Зика.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, вектор в соответствии с настоящим изобретением, клетку в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением применяют для предотвращения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика у беременных женщин, в особенности для предотвращения внутриутробной инфекции. Например, это может быть осуществлено сходным образом, как для предотвращения внутриутробной инфекции HCMV, как описано в Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM, Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group: Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection; N Engl J Med 2005, 353:1350-1362.

Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением может проходить через плаценту путем взаимодействия с FcRn при введении беременной женщине, например, путем (в/в) инъекции или другим путем введения. Важно то, что взаимодействие "LALA" вариантов антител с FcRn не нарушается. Полагают, что FcRn уже экспрессируются в первом триместре в плаценте.

Альтернативно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также можно вводить в экстраэмбриотическое пространство.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию можно применять для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, путем введения вплоть до семи дней после (возможного) инфицирования вирусом Зика, предпочтительно вплоть до пяти дней после (возможного) инфицирования вирусом Зика, более предпочтительно вплоть до четырех дней после (возможного) инфицирования вирусом Зика, еще более предпочтительно вплоть до трех дней после (возможного) инфицирования вирусом Зика, и наиболее предпочтительно вплоть до одного дня после (возможного) инфицирования вирусом Зика. Такая схема лечения может быть пригодной в терапевтических установках, а также в профилактических установках, в особенности для постконтактной профилактики (PEP).

При PEP типично первое введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции следует осуществлять максимально быстро, насколько это возможно, после возможного инфицирования ZIKV, например, после укуса комара на территории, пораженной ZIKV. Таким образом, при PEP первое введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции типично можно осуществлять вплоть в течение одного или нескольких дней после (возможного) инфицирования ZIKV, как описано выше.

Также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию для предотвращения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, можно вводить вплоть до трех месяцев перед (возможной) инфекцией, вызванной вирусом Зика, предпочтительно вплоть до одного месяца перед (возможной) инфекцией, вызванной вирусом Зика, более предпочтительно вплоть до двух недель перед (возможной) инфекцией, вызванной вирусом Зика, еще более предпочтительно вплоть до одной недели перед (возможной) инфекцией, вызванной вирусом Зика, и наиболее предпочтительно вплоть до одного дня перед (возможной) инфекцией, вызванной вирусом Зика. Такая схема лечения относится в особенности к профилактическим установкам.

В целом - и в особенности при PEP - после первого введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновую кислоту, вектора, клетки или фармацевтической композиции, затем можно осуществлять одно или несколько последующих введений, предпочтительно однократной дозы в сутки или через день в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 21 дней. Также после первого введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, век-

тора, клетки или фармацевтической композиции, затем можно осуществлять одно или несколько последующих введений, предпочтительно однократной дозы один или два раза в неделю в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 недели. После первого введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции, затем можно осуществлять одно или несколько последующих введений, предпочтительно однократной дозы каждые 2 или 4 недели в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 недель. Также после первого введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции, затем можно осуществлять одно или несколько последующих введений, предпочтительно однократной дозы каждые два или четыре месяца в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 1, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 21 месяца. Также после первого введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции, затем можно осуществлять одно или несколько последующих введений, предпочтительно однократной дозы один раз или два раза в год 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 лет.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, нуклеиновую кислоту согласно изобретению, вектор согласно изобретению, клетку согласно изобретению или фармацевтическую композицию согласно изобретению вводят вплоть до семи дней после (возможного) инфицирования вирусом Зика., Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, вектор в соответствии с настоящим изобретением, клетку в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением вводят в (единичной) дозе от 0,005 до 100 мг/кг веса тела.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию можно вводить любым из возможных различных путей, таким как пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, костномозговой, внутрибрюшинный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, транскожный, местный, подкожный, интраназальный, энтеральный, сублингвальный, интравагинальный или ректальный пути. Предпочтительным является внутривенное введение, или подкожное введение или внутримышечное введение и более предпочтительным является внутривенное введение или подкожное введение.

Беременным женщинам антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также можно вводить интра- или экстра-амниотически, например, путем инъекции.

Комбинированная терапия.

Введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции в способах и применениях можно осуществлять отдельно или в комбинации с коагентом (также обозначаемым как "дополнительный активный компонент" в настоящей заявке), который особенно пригоден для предотвращения и/или лечения инфекции ZIKV.

Антитело или его Антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию, можно вводить субъекту перед, одновременно или последовательно с другими терапевтическими схемами или коагентами, пригодными для лечения и/или предотвращения инфекции ZIKV. Указанное антитело, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию, которую вводят одновременно с указанными коагентами, можно вводить в одной и той же или различных композициях и одним и тем же или различными путями введения.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения коагенты могут представлять собой, например, ингибиторы контрольных точек.

Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию можно вводить в комбинации с ингибитором контрольных точек для (медицинских) применений как описано в настоящей заявке.

Ингибиторы контрольных точек направлены на блокаду PD-1/PD-L1 и/или CTLA4 и, следовательно, включают анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела и анти-CTLA4 антитела.

ZIKV нейтрализующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно комбинировать с ZIKV NS1-связывающим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в качестве дополнительного активного компонента (коагента). Таким образом, может блокироваться патогенная роль NS1, дополнительно к нейтрализации ZIKV. Таким образом, ZIKV NS1-связывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может служить предпочтительным дополнительным активным компонентом (коагентом).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может присутствовать либо в той же самой фармацевтической композиции в качестве дополнительного активного компонента (коагента) или, предпочтительно, антитело, или антигенсвязывающий фрагмент составляют первую фармацевтическую композицию, а дополнительный активный компонент (коагент) составляет вторую фармацевтическую композицию, отличающуюся от первой фармацевтической композиции. Таким образом, если предусматривается больше одного дополнительного активного компонента (коагента), то каждый дополнительный активный компонент (коагент) и антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляют другую фармацевтическую композицию. Такие фармацевтические композиции могут вводиться либо комбинирован-

но/одновременно или в разное время или в разные локализации (например, разделенные части организма).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный активный компонент (коагент) могут обеспечивать аддитивный терапевтический эффект или, предпочтительно, синергический терапевтический эффект. Термин "синергия" используется для описания комбинированного эффекта двух или более активных агентов, который больше, чем сумма индивидуальных эффектов каждого соответствующего активного агента. Таким образом, если комбинированный эффект двух или более агентов приводит к "синергическому ингибированию" активности или процесса, то это обозначает, что ингибирование активности или процесса больше, чем сумма ингибирующих эффектов каждого соответствующего активного агента. Термин "синергический терапевтический эффект" относится к терапевтическому эффекту, наблюдаемому при комбинировании двух или более терапий, где терапевтический эффект (как измеряется с помощью любого из различных параметров) больше, чем сумма индивидуальных терапевтических эффектов, наблюдаемых при соответствующих индивидуальных терапиях.

Дополнительное применение и наборы.

Как уже отмечалось, еще одним объектом данного изобретения является применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора в соответствии с настоящим изобретением, клетки или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением для мониторинга качества вакцины против вируса Зика путем проверки, что антиген указанной вакцины содержит специфический эпитоп в правильной конформации. Вакцина против вируса Зика подлежит проверке, включает ли она ZIKV белок оболочки или любую другую молекулу/комплекс, содержащий или состоящий из (I) домена III E белка ZIKV (EDIII), как описано выше или (II) четвертичного ZIKV эпитопа, как описано выше.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением для диагностики инфекции, вызванной вирусом Зика.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновая кислота, вектор, клетка или фармацевтическая композиция могут также использоваться для определения того, является ли выделенный образец крови (например, цельная кровь, сыворотка и/или плазма) инфицирован вирусом Зика.

Как описано выше, способы диагностики могут включать контактирование антитела или фрагмента антитела с образцом. Такие образцы могут быть выделены из субъекта, например, выделенный образец ткани, взятый из, например, носовых ходов, полостей придаточных пазух носа, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, головного мозга, кожи или крови, предпочтительно плазмы или сыворотки. Способы диагностики также могут включать обнаружение комплекса антиген/антитело, в особенности после контактирования антитела или фрагмента антитела с образцом. Такую стадию обнаружения типично осуществляют в лаборатории, то есть без какого-либо контактирования с организмом человека или животного. Примеры способов обнаружения хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники и включают, например, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Последним объектом настоящим изобретением является набор для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, содержащий по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, по меньшей мере один вектор в соответствии с настоящим изобретением, по меньшей мере одну клетку в соответствии с настоящим изобретением или по меньшей мере одну фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением и инструкцию по их применению. Дополнительно, набор может содержать средства для введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции, такие как шприц или флакон, листок-вкладыш и/или коагент для введения, как описано выше.

Антитела, специфически связывающиеся с NS1 белком вируса Зика.

Описанное в заявке выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV).

ZIKV NS1 белок (неструктурный белок 1) встречается внутриклеточно, секретируется и связанные на клеточной поверхности и в особенности, секретируемый ZIKV NS1 белок типично обнаруживается в жидкостях организма, таких как сыворотка, слюна, моча и др., субъектов, инфицированных ZIKV. Секретируемые и ассоциированные на клеточной поверхности NS1 являются чрезвычайно иммуногенными и вызывают образование антител. Известно, что NS1 является важным биомаркером для ранней диагностики инфекции ZIKV. Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), пригодны, например, для диагностики инфекции ZIKV.

В целом, связывание может быть оценено с помощью стандартного ELISA, как известно специалисту в данной области техники и как описано выше. Таким образом, относительные аффинности связывания антитела можно определить путем измерения концентрации антитела (EC_{50}), необходимой для достижения 50% максимального связывания при насыщении. Предпочтительно, EC_{50} антитела или его анти-

генсвязывающего фрагмента к NS1 белку ZIKV составляет не более, чем 50 нг/мл, предпочтительно указанная EC_{50} составляет не более, чем 25 нг/мл, более предпочтительно указанная EC_{50} составляет не более чем 15 нг/мл, еще более предпочтительно указанная EC_{50} составляет не более, чем 10 нг/мл, и наиболее предпочтительно указанная EC_{50} составляет не более, чем 5 нг/мл, такая как, например, приблизительно 2 или 3 нг/мл.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), по существу не связывается с NS1 белком вируса денге (DENV). Таким образом, "по существу нет связывания" обозначает, что для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нет EC_{50} -значения вплоть до 10^2 нг/мл, предпочтительно вплоть до 10^3 нг/мл, более предпочтительно вплоть до 5×10^3 нг/мл, еще более предпочтительно вплоть до 8×10^3 нг/мл, и наиболее предпочтительно вплоть до 10^4 нг/мл, что может быть определено в стандартном ELISA к NS1 белку вируса денге (DENV). Другими словами, концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необходимая для достижения 50% максимального связывания при насыщении (EC_{50}) к NS1 белку вируса денге (DENV) в стандартном ELISA типично составляет больше, чем 10^2 нг/мл, предпочтительно больше, чем 10^3 нг/мл, более предпочтительно больше, чем 5×10^3 нг/мл, еще более предпочтительно больше, чем 8×10^3 нг/мл, и наиболее предпочтительно больше, чем 10^4 нг/мл.

Также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), по существу не связываются с NS1 белком вируса желтой лихорадки (YFV), NS1 белком вируса лихорадки Западного Нила (WNV), NS1 белком вируса японского энцефалита (JEV) и/или NS1 белком вируса клещевого энцефалита (TBEV). Таким образом, "по существу нет связывания" обозначает, что для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нет EC_{50} -значения вплоть до 10^2 нг/мл, предпочтительно вплоть до 10^3 нг/мл, более предпочтительно вплоть до 5×10^3 нг/мл, еще более предпочтительно вплоть до 8×10^3 нг/мл, и наиболее предпочтительно вплоть до 10^4 нг/мл, что может быть определено в стандартном ELISA к NS1 белку вируса желтой лихорадки (YFV), NS1 белку вируса лихорадки Западного Нила (WNV), NS1 белку вируса японского энцефалита (JEV) и/или NS1 белку вируса клещевого энцефалита (TBEV). Другими словами, концентрация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необходимая для достижения 50% максимального связывания при насыщении (EC_{50}) к NS1 белку вируса желтой лихорадки (YFV), NS1 белку вируса лихорадки Западного Нила (WNV), NS1 белку вируса японского энцефалита (JEV) и/или NS1 белку вируса клещевого энцефалита (TBEV) в стандартном ELISA типично составляет больше, чем 10^2 нг/мл, предпочтительно больше, чем 10^3 нг/мл, более предпочтительно больше, чем 5×10^3 нг/мл, еще более предпочтительно больше, чем 8×10^3 нг/мл, и наиболее предпочтительно больше, чем 10^4 нг/мл.

Предпочтительно, антитело, которое специфически связывается с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), представляет собой антитело человека. Антитело, которое специфически связывается с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), может быть моноклональным антителом, предпочтительно моноклональным антителом человека. Кроме того, антитело которое специфически связывается с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV) может быть рекомбинантным антителом.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), могут содержать Fc компонент. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), кроме того, могут содержать CH2 L4A мутацию, CH2 L5A мутацию, или обе.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), могут не содержать Fc компонент. Предпочтительно антитело в соответствии с настоящим изобретением или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), представляют собой очищенное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), можно метить например, биотинилировать Fab, Fab' или F(ab')₂ фрагменты.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), могут связываться с антигенной детерминантой S1 и/или с антигенной детерминантой S2 NS1 белка вируса Зика. Изобретатели настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что антитела к NS1 ZIKV, связывающиеся с антигенной детерминантой S1 и/или с антигенной детерминантой S2 для NS1 белка ZIKV, перекрестно не реагируют с NS1 белком вируса денге (DENV NS1). Анти- ZIKV NS1 антитела, которые не связываются ни с антигенной детерминантой S1, ни с антигенной детерминантой S2 для NS1 белка ZIKV, в отличие от этого, типично перекрестно реагируют с DENV NS1. Это неожиданное обнаружение указывает на то, что антигенные детерминанты S1 и S2 на ZIKV NS1 можно использовать для различения ZIKV NS1-специфических антител от антител, перекрестно реагирующих с DENV NS1.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с NS1 белком вируса ЗИКА (ZIKV), могут связываться с антигенной детерминантой S2 NS1 белка вируса Зика. Антигенная детерминанта S2 является высоко консервативной во множественных линиях ZIKV, но не

является гомологичной по последовательности и структуре с соответствующим сайтом NS1 других флавириусов, таким образом, обеспечивая уникальную специфичность для ZIKV.

Антигенные детерминанты S1 и S2 NS1 белка ZIKV были идентифицированы изобретателями настоящего изобретения, как описано в примере 3, фиг. 6. Независимо от того, связывается ли антитело с антигенной детерминантой S1 и/или S2, оно легко может быть идентифицировано специалистом в данной области техники, используя исследования перекрестной конкуренции, например, как описано ниже или в Примере 3, где S1-специфическое антитело с соответствием с gZKA15 (SEQ ID NO: 91-99) и/или S2-специфическое антитело с соответствием с gZKA35 (SEQ ID NO: 127-135) можно использовать в качестве "второго антитела". В таком конкурентном анализе, наличие любой конкуренции (полной или частичной) с gZKA15 и/или gZKA35 указывает на то, что тестируемое антитело связывается с антигенной детерминантой S1 и/или с антигенной детерминантой S2, соответственно.

В целом, для конкурентного анализа можно использовать коммерчески доступные системы для характеристики белок-белкового связывания, такие как, например, "Octet® RED96 System", поставляемую FortéBio, в частности, согласно инструкциям производителя.

В типичном конкурентном анализе, например, используя "Octet® RED96 System", поставляемую FortéBio, ZIKV-NS1 белок (например, разведенный до 2,5 мкг/мл в PBS) можно иммобилизовать (например, в течение 7-9 мин) на поверхности APS покрытого сенсорного типа. После этого покрытие биосенсоры можно помещать в лунки, содержащие блокирующий буфер (например, 0,1% BSA в PBS; например, в течение 6 мин) для блокирования свободных сайтов связывания Biosensor. После этого покрытие Biosensors можно инкубировать (например, в течение 8 мин) с антителом/тестируемыми антителами (например, разведенными в блокирующем буфере, например, при 10 мкг/мл). После связывания тестируемых антител (этап 1), Biosensors передвигали на лунки, содержащие "вторые антитела", например, gZKA15 и/или gZKA35 (например, в течение 8 мин) (этап 2). Таким образом, можно определить конкуренцию, частичную конкуренцию или отсутствие конкуренции на этапе 2, в зависимости от того, что было обнаружено: отсутствие ассоциации (конкуренция), низкая ассоциация (частичная конкуренция) или (сильная) ассоциация (отсутствие конкуренции).

Как описано выше, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно содержат (по меньшей мере) три участка, определяющих комплементарность (CDR) на тяжелой цепи и (по меньшей мере) три CDR на легкой цепи. В целом, участки, определяющие комплементарность (CDR), представляют собой гипервариабельные участки, присутствующие в вариабельных доменах тяжелой цепи и вариабельных доменах легкой цепи. Типично, CDR тяжелой цепи и связанная легкая цепь антитела совместно образуют антигенный рецептор. Обычно, три CDR (CDR1, CDR2, и CDR3) расположены не последовательно в вариабельном домене. Поскольку антигенные рецепторы типично состоят из двух вариабельных доменов (на двух различных полипептидных цепях, то есть тяжелой и легкой цепи), существует шесть CDR для каждого антигенного рецептора (тяжелая цепь: CDRH1, CDRH2, и CDRH3; легкая цепь: CDRL1, CDRL2, и CDRL3). Единичная молекула антитела обычно имеет два антигенных рецептора и, следовательно, содержит двенадцать CDR. CDR на тяжелой и/или легкой цепи могут быть разделены каркасными участками, в соответствии с чем каркасный участок (FR) представляет собой участок в вариабельном домене, который является менее "вариабельным", чем CDR. Например, цепь (или каждая цепь, соответственно) может состоять из четырех каркасных участков, разделенных тремя CDR.

Заявителем были определены последовательности тяжелых цепей и легких цепей пяти типичных антител, содержащие три различные CDR на тяжелой цепи и три различные CDR на легкой цепи. Положения аминокислот CDR определены в соответствии с системой нумерации IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>; cf. Lefranc, M.-P. и др. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37, D1006-D1012).

В табл. 4 представлены SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR тяжелых цепей (CDRH1, CDRH2, и CDRH3) и вариабельного участка тяжелой цепи (обозначаемого как "VH") типичных антител в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 4

Название антитела	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
ZKA15	91	92	93	98
ZKA25	109	110	111	116
ZKA35	127	128	129	134
ZKA10	153	154	155	156
ZKA18	157	158	159	160
ZKA28	161	162	163	164
ZKA29	165	166	167	168
ZKA33	169	170	171	172
ZKA39	173	174	175	176
ZKA43	177	178	179	180
ZKA44	181	182	183	184
ZKA46	185	186	187	188
ZKA50	189	190	191	192
ZKA54	193	194	195	196
ZKB18	197	198	199	200
ZKB20	201	202	203	204
ZKB21	205	206	207	208
ZKB23	209	210	211	212
ZKC29	213	214	215	216
ZKC31	217	218	219	220
ZKC32	221	222	223	224
ZKC33	225	226	227	228
ZKC34	229	230	231	232
ZKD25	233	234	235	236

В табл. 5 ниже представлены SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR легких цепей (CDRL1, CDRL2, и CDRL3) и варибельного участка легкой цепи (обозначаемого как "VL") типичных антител в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 5

Название антитела	CDRL1	CDRL2	CDRL2 длинный	CDRL3	VL
ZKA15	94	95	96	97	99
ZKA25	112	113	114	115	116
ZKA35	130	131	132	133	135

Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность к по меньшей мере одной из последовательностей CDR, VH последовательности и/или VL последовательности, представленных в табл. 4 и/или в табл. 5.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один CDRH1, по меньшей мере один CDRH2 и по меньшей мере один CDRH3 и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один CDRL1, по меньшей мере один CDRL2 и по меньшей мере один CDRL3, где по меньшей мере один CDR, предпочтительно по меньшей мере один CDRH3 тяжелой цепи, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, как указано в любой из SEQ ID NO: 93, 111, 129, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, и 235; или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере

116 и вариабельный участок легкой цепи (VL) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 117.

"gZKA35" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему CDRH1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 127, CDRH2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 128, CDRH3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 129, CDRL1 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 130, CDRL2 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 131 или 132, и CDRL3 аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 133. Вариабельный участок тяжелой цепи (VH) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 134 и вариабельный участок легкой цепи (VL) имеет предпочтительно аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135.

Подробное описание, приведенное выше, озаглавленное как "получение антител" (раздел выше "получение антител") и "необязательные дополнительные характерные особенности антител" (раздел выше "необязательные дополнительные характерные особенности антител") применяются ко всем антителам, и их антигенсвязывающим фрагментам, как описано в настоящей заявке - то есть эти разделы применяются не только к нейтрализующим антителам, и их антигенсвязывающим фрагментам, но также и к антителам, связывающим NS1-белок, и их антиген-связывающим фрагментам.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть меченым, например, биотинилированным.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно конъюгировать с ферментом, таким как пероксидаза хрена (HRP). Конъюгирование антител с HRP описано, например, в Wisdom GB. Conjugation antibodies to horseradish peroxidase. *Methods Mol Biol.* 2005;295:127-30 или в *Antibodies - a laboratory manual*. Под ред. Edward A. Greenfield, второе издание 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN: 9781936113811.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, могут быть связаны с обнаруживаемой меткой, например, для обеспечения возможности измерения, например, для количественного определения или для облегчения визуализации. Меченые антитела можно применять в разнообразных анализах, в особенности в иммунологических анализах, применяя большое количество меток. Предпочтительные метки включают радионуклиды, ферменты, коферменты, флуоресцентные вещества, хемилюминесцентные вещества, хромогены, субстраты ферментов или кофакторы, ингибиторы ферментов, простетические группы комплексов, свободные радикалы, частицы, красители (например, флуоресцентные красители, тандемные красители), и др. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих простетических групп комплексов включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; примером люминесцентного материала является люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин, и экворин; и примеры подходящих радиоактивных материалов включают 125I, 131I, 35S, или 3H. Такие меченые реагенты могут использоваться в различных хорошо известных исследованиях, таких как радиоиммунологические анализы, иммуноферментные анализы, например, ELISA, флуоресцентные иммуноанализы, и др, предпочтительно в ELISA. Следовательно, меченые антитела в соответствии с настоящим изобретением могут использоваться в таких анализах, например, как описано в US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837; и US 4,233,402.

Предпочтительные метки включают (I) ферменты, как описано выше, например, пероксидазу хрена (HRP) или щелочную фосфатазу, в особенности в анализе блокировки связывания, вестерн-блоттинге, ELISA и иммуногистохимии; (II) простетические группы комплексов, как описано выше, например, стрептавидин/биотин и авидин/биотин, в особенности в ELISA и иммуногистохимии; (III) флуоресцентные вещества, как описано выше, такие как флуоресцентные красители и флуоресцентные белки (например, (усиленный) зеленый флуоресцентный белок (EGFP); TagBFP, Turquoise, Venus, KO2, Cherry, Apple, Kate2), в особенности в иммунофлуоресценции и проточной цитометрии; и (IV) тандемные красители в проточной цитометрии.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть биотинилированными. Биотинилирование является быстрым, специфическим и, вряд ли нарушает естественную функцию молекулы вследствие небольшого размера биотина ($MW = 244,31$ г/моль). Биотин связывается со стрептавидином и авидином с чрезвычайно высокой аффинностью, с быстрой скоростью прямой реакции и высокой специфичностью. Связывание биотина со стрептавидином и авидином резистентно к чрезмерному нагреванию, pH и протеолизу, что делает возможным захват биотинилированных молекул в разнообразных условиях. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть биотинилированы химически или ферментативно. В химическом биотинилировании используют различные конъюгационные химические взаимодействия для получения неспецифического биотинилирования аминов (например, NHS-связывание обеспечивает биотинилирование любых первичных аминов в антителе, см. ниже). Ферментативное биотинилирование приводит к биотинилированию специфического лизина с пределах определенной последова-

тельности путем применения бактериальной биотинлигазы.

Антитело или его фрагмент, также можно использовать в качестве метки. В этом случае, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгируют со вторым антителом или его фрагментом антитела, с образованием гетероконъюгата антитела, как описано, например, в US 4,676,980. В этом случае, второе антитело необязательно может быть мечено.

Способы для связывания антител с метками хорошо известны в данной области техники. Например, в антителе или в его антигенсвязывающем фрагменте, боковую цепь лизина, которая оканчивается на первичный амин (-NH₂), можно использовать для ковалентного присоединения меток к антителу или в его антигенсвязывающий фрагмент. Различные варианты процедур мечения описаны в литературе. Например, подходящий подход для введения метки может быть выбран из группы, включающей NHS сложные эфиры, гетеробифункциональные реагенты, карбодиимиды и перйодат натрия.

NHS сложные эфиры можно использовать особенно в случае меток флуоресцентными красителями. Метку с флуоресцентным красителем можно закупать в активированной форме метки с встроенным NHS сложным эфиром (также называемый 'сукцинимидильный сложный эфир'). Активированный краситель можно подвергать реакции в подходящих условиях с антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом (например, посредством лизиновой группы). Избыток реакционного красителя можно удалить (например, путем колоночной хроматографии) перед тем, как меченое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будут использовать в иммунологическом анализе.

Гетеробифункциональные реагенты можно использовать в том случае, если метка представляет собой белковую молекулу (например, HRP, щелочная фосфатаза или фикоэритрин). В этом случае, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и метка могут иметь множественные амины. В этой ситуации, некоторые из лизинов в одной молекуле (например, на антителе или на его антигенсвязывающем фрагменте) можно модифицировать для создания новой реакционноспособной группы (X) и лизина на метке для создания другой реакционноспособной группы (Y) (или наоборот). После этого 'гетеробифункциональный реагент' используют для интродуцирования Y групп, которые впоследствии реагируют с X группами при смешивании антитела и метки, создавая, таким образом, гетеродимерные конъюгаты.

Карбодиимиды, такие как EDC, особенно можно использовать для создания ковалентных связей между амин- и карбоксил-содержащими молекулами. Карбодиимиды активируют карбоксильные группы, и затем активированное промежуточное соединение атакуется амином (например, обеспечиваемым лизиновым остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте). Карбодиимиды особенно можно использовать для конъюгирования антител с карбоксилированными частицам (например, латексными частицам, магнитными шарикам), и с другими карбоксилированными поверхностям, таким как микролуночные планшеты или поверхности чипов. Карбодиимиды также можно использоваться для присоединения красителей или белковых меток к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам.

Перйодат натрия можно использовать в особенности для мечения с помощью пероксидазы хрена (HRP). Перйодат активирует углеводные цепи на молекуле HRP с созданием альдегидных групп, которые способны реагировать с лизинами на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте. Поскольку HRP сама имеет только немного лизинов, то относительно легко создать конъюгаты антитело-HRP без существенной HRP полимеризации.

Линкеры, необязательно, можно использовать между метками и антителами согласно изобретению, например, как описано в US 4,831,175. Антитела или их антиген-связывающие фрагменты можно непосредственно метить с помощью радиоактивного йода, индия, иттрия или других радиоактивных частиц, известных в данной области техники, например, как описано в US 5,595,721.

Таким образом, можно получать комплекс, содержащий

- (I) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением; и
- (II) метку, как описано выше.

Такой комплекс предпочтительно с помощью метки конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Предпочтительно, метка и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ковалентно связаны.

Например, комплекс может представлять собой слитый белок, содержащий (I) антитело в соответствии с настоящим изобретением и (II) метку, которая представляет собой пептид или белок, такой как флуоресцентный пептид или белок, например, EGFP.

Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или комплекс могут представлять собой слитый белок.

Примеры молекул нуклеиновых кислот и/или полинуклеотидов включают, например, рекомбинантный полинуклеотид, вектор, олигонуклеотид, молекулу РНК, такую как рРНК, мРНК, микроРНК, миРНК, или тРНК, или молекулу ДНК, такую как кДНК.

В табл. 4 и 5 представлены номера SEQ ID для аминокислотных последовательностей для CDR и VH и VL типичных антител.

В табл. 6 ниже представлены номера SEQ ID для типичных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CDR и VH и VL типичных антител.

Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу, содержащую, предпочти-

тельно состоящую из компонентов нуклеиновых кислот. Термин молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно относится к молекулам ДНК и РНК. В особенности, он используется синонимично с термином "полинуклеотид". Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой полимер, содержащий или состоящий из нуклеотидных мономеров, которые ковалентно связаны друг с другом с помощью фосфодиэфирных связей сахарофосфатного остова. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" также охватывает модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, такие как молекулы ДНК или РНК с модифицированными основаниями, модифицированными сахарами или модифицированным остовом, и т.д.

В табл. 6 представлены типичные последовательности нуклеиновых кислот CDR и переменного участка тяжелой цепи (VH) и переменного участка легкой цепи (VL) трех типичных антител в соответствии с настоящим изобретением ("ZKA15", "ZKA25", "ZKA35").

Таблица 6

ZKA15	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	100	Ggtggcttcatcaatagttactac
CDRH2	101	Atctataaaaagtgggagcacc
CDRH3	102	Gcgagagatccctacggtgactacgttaaggcttttgatatt
CDRL1	103	Cagagcctcctgcatagtaatggatacaactat
CDRL2	104	Ttgggttct
CDRL2 длинный	105	Ctgatctat ttgggttct aatcgggcc

CDRL3	106	Atgcaagctctacaaactgtcact
VH	107	caggtgcagctgcaggagtccggggccaggactggtgaagccttcggaga ccctgtccctcacctgcactgtctcc ggtggcttcatcaatagttacta ctggagctggatccggcagcccgcgggaagggactggagtggattggg cgta tctataaaaagtgggagcacc aactacaaccctccctcaagagtc gagtcaccatgtcactagacacgtccaagtaccagttctccctgaagct gaggtctgtgaccgcccgtgacacggccgtgtattactgt gcgagagat ccctaoggtgactacgttaaggcttttgatattt ggggccaagggacaa tggtcacccgtctcttcag
VL	108	gatattgtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcaccctggag agccggcctccatctcctgcaggtctagt cagagcctcctgcatagtaa tgatatacaactattt gaattggtacctgcagaagccaggcagtcctca cagctcctgatctat ttgggttct aatcgggctccggggtccctgaca ggttcagtggcagtgatcaggecacagattttactgaaaatcagcag agtggaggctgaggtggtggggtttattactg catgcaagctctacaa actgtcact ttcggcctgggaccaaagtggatatcaaac
ZKA25	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	118	Ggattcacctttagaagtcattgg
CDRH2	119	Ataaaggaagatggatatgagaaa
CDRH3	120	Gcgagagatttgagggtatatagtgggagaggtttcgacccc
CDRL1	121	Aaattgggggataaaat
CDRL2	122	Caagatagc
CDRL2 длинный	123	Gtcatctat caagatagc aagcggccc
CDRL3	124	Caggcgtgggacagcagcactgtggta
VH	125	gaggtgcagttggtggagtctgggggaggcttggtccggcctggggggt ccctgagactctcctgtgcagcctct ggattcacctttagaagtcattg gatgagttgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtgggtggcc aac ataaaggaagatggatatgagaaa tactatgtggactctgtgaagg gccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgca aatgaagagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgt gcgaga gatttgagggtatatagtgggagaggtttcgacccc tggggccagggaa ccctggtcaccgtctcctcag
VL	126	tcctatgagctgactcagccaccctcactgtccgtgtcccagacaga cagccagcatcacctgctctggagat aaattgggggataaaat tgcttg ctggtatcagcagaagccaggccagtcaccctgtgttggtcatctat caa

		gatagca aagcggccctcagggatccctgcgcgattctctggctccaact ctgggaacacagccactctgaccatcagcgggaccaggctatggatga ggctgactattactgt caggcgtgggacagcagcactgtggta ttcggg ggagggaccaagctgaccgtcctag
ZKA35	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	136	Ggtggctccatcagcactgggtggttactac
CDRH2	137	Atctattacagtgggaacacc
CDRH3	138	Gcgaaaggaggagggagggagcgcaccctttgactac
CDRL1	139	Agctccaacatcggaaagaattat
CDRL2	140	Aggaataat
CDRL2 длинный	141	Ctcatctat aggaataat cagcggccc
CDRL3	142	Gtagcatgggatgacagccggagtggttttgtggta
VH	143	caggtgcagctgcaggagtccgggccaggaactggtgaagccttcacaga ccctgtccctcacctgcactgtctct ggtggctccatcagcactgggtgg ttactact ggagctggatccgccagcaccagggaaggcctggagtgg attggttacatct attacagtgggaacacc tactacaaccctccctca agagtcgagttaccatatacagttgacacctctaagaagcagttctccct gaagctgagctctgtgactgcccggacacggccgtgtattactgt gcg aaaggaggagggagggagcaccctttgactact ggggccagggaacc tggtcaccgtctcctcag
VL	144	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcaga gggtcaccatctcttgttctggaagc agctccaacatcggaaagaatta t gtagactggtaccagcaactcccaggaaaggccccaaactcctcatc tat aggaataat cagcggccctcaggggtccctgagcgattctctggct ccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccgggtccga ggatgaggctgattactgt gtagcatgggatgacagccggagtgggt tttgtggta ttcggcggagggaccaaggtgaccgtcctag

Последовательность молекулы нуклеиновой кислоты может содержать или состоять из последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с любой из SEQ ID NO: 100-108, 118-126, и 136-144.

Также последовательности нуклеиновых кислот могут включать последовательности нуклеиновых кислот, имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность по отношению к нуклеиновой кислоте, кодирующей CDR, VH последовательность и/или VL последовательность, используемой в (типичном) антителе например, к последовательностям, представленным в табл. 6.

В целом, с молекулой нуклеиновой кислоты можно манипулировать для инсерции, делеции или изменения определенных последовательностей нуклеиновых кислот. Изменения при такой манипуляции включают, но, не ограничиваясь только ими, изменения для интродуцирования сайтов рестрикции, для изменения частоты используемого кодона, для добавления или оптимизации транскрипции и/или трансляции регуляторных последовательностей и др. Также представляется возможным изменять нуклеиновую кислоту для изменения кодируемых аминокислот. Например, может быть полезным интродуцировать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т.д.) аминокислотных замен, делеций и/или инсерций в аминокислотную последовательность антитела. Такие точечные мутации могут модифицировать эффекторные функции, аффинность связывания антигена, посттрансляционные модификации, иммуногенность, и т.д., могут интродуцировать аминокислоты для присоединения ковалентных групп (например, меток) или могут интродуцировать хвосты (например, для очистки). Мутации можно

интродуцировать в специфические сайты или можно интродуцировать случайно, с последующей селекцией (например, молекулярная эволюция). Например, одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих CDR участки, VH последовательность и/или VL последовательность (типичного) антитела согласно изобретению можно случайно или направленно мутировать для интродуцирования различных свойств в кодируемые аминокислоты. Такие изменения могут приводить к итеративному процессу, в котором сохраняются исходные замены, а новые замены интродуцируются в другие нуклеотидные положения. Более того, замены, осуществляемые на независимых этапах, можно комбинировать. Различные свойства, интродуцируемые в кодируемые аминокислоты, могут включать, но, не ограничиваясь только ими, измененную аффинность.

Также изобретение относится к экспрессионным векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, то есть молекуле нуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе. Вектор в контексте настоящего изобретения является подходящим для инкорпорирования или заякоривания желательной последовательности нуклеиновых кислот. Такие векторы могут представлять собой векторы для хранения, экспрессионные векторы, клонирующие векторы, трансферные векторы и др. Вектор для хранения представляет собой вектор, который предоставляет возможность подходящего хранения молекулы нуклеиновой кислоты. Таким образом, вектор может содержать последовательность, соответствующую, например, желательному антителу или его фрагменту. Экспрессионный вектор может использоваться для получения продуктов экспрессии, таких как РНК, например, мРНК, или пептиды, полипептиды или белки. Например, экспрессионный вектор может содержать последовательности, необходимые для транскрипции последовательности сильнее вектора, такой как промоторная последовательность. Клонированный вектор типично представляет собой вектор, содержащий клонирующий сайт, который может использоваться для инкорпорации последовательностей нуклеиновых кислот в вектор. Клонированный вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор или бактериофаговый вектор. Трансферный вектор может представлять собой вектор, который пригоден для переноса молекул нуклеиновых кислот в клетки или организмы, например, вирусные векторы. Вектор в контексте настоящего изобретения может представлять собой, например, РНК вектор или ДНК вектор. Предпочтительно, вектор представляет собой молекулу ДНК. Например, вектор в контексте настоящей заявки содержит сайт клонирования, селектируемый маркер, такой как фактор резистентности к антибиотику, и последовательность, подходящую для размножения вектора, такую как точка начала репликации.

Предпочтительно, вектор в контексте настоящей заявки представляет собой плазмидный вектор.

Изобретение также относится к клетке, экспрессирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением; и содержащей вектор в соответствии с настоящим изобретением.

Примеры таких клеток включают, но, не ограничиваясь только ими, эукариотические клетки, например, клетки дрожжей, клетки животных или клетки растений. Предпочтительно, клетки представляют собой клетки млекопитающих, более предпочтительно клеточную линию млекопитающих. Предпочтительные примеры включают клетки человека, CHO клетки, HEK293T клетки, PER.C6 клетки, NS0 клетки, клетки печени человека, миеломные клетки или гибридные клетки.

В особенности, клетка может быть трансфектирована экспрессионным вектором. Термин "трансфекция" относится к интродукции молекул нуклеиновой кислоты, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки. В контексте настоящего изобретения, термин "трансфекция" охватывает любой способ, известный квалифицированному специалисту для интродукции молекул нуклеиновой кислоты в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки, например, в клетки млекопитающих. Такие способы охватывают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основании катионных липидов и/или липосом, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию на основании наночастиц, трансфекцию на основании вирусов, или трансфекцию на основании катионных полимеров, такие как DEAE-декстран или полиэтиленмин и др. Предпочтительно, интродукция является невирусной.

Клетки могут быть трансфектированы стабильно или временно вектором, например, для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Клетки можно стабильно трансфектировать вектором, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Альтернативно, клетки можно временно трансфектировать вектором, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Также изобретение относится к фармацевтической композиции, как описано выше в контексте нейтрализующих антител, при этом подробное описание, как описано выше, применяется таким образом к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с NS1 белком ZIKV. Тем не менее, композицию также можно использовать для нефармацевтических целей, таких как для диагностики (инфекции ZIKV) или для аналитических целей.

Предпочтительно, композиция может быть представлена в жидкой форме, например, для обеспечения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в жидкости, например, в диагностическом анализе. Жидкость (носитель) может быть выбран в соответствии с целью, например, в зависимости от анали-

за. Предпочтительно, композиция может содержать PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) или другой буфер. Такие буферы предпочтительно представляют собой биологические буферы, и, следовательно, композиция может содержать любой из MES, BIS-TRIS, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BIS-TRIS пропана, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, Trizma, POPSO, HEPES, TRICINE, Gly-Gly, BICINE, HEPBS, TAPS, AMPD, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS и CABS. Также композиция может содержать раствор Рингера. Дополнительно, композиция также может содержать Tris, например, Tris-HCl.

Композиция также может содержать детергент, например, Tween (полисорбат), такой как Tween 20 или Tween 80. Детергенты предпочтительно присутствуют в низких количествах, например, меньше, чем 0,01%. Композиция также может включать соли натрия (например, хлорид натрия) для придания тоничности. Например, типичная концентрация NaCl составляет 10 ± 2 мг/мл.

Дополнительно, композиция необязательно может содержать стабилизатор белка, BSA (бычий сывороточный альбумин) или HSA (сывороточный альбумин человека). Другими примерами стабилизаторов белков, которые необязательно могут быть включены в композицию, включают буферы, например, как описано выше; соли, такие как хлорид натрия; аминокислоты, такие как гистидин, глицин и аргинин; полиолы/дисахариды/полисахариды, такие как трегалоза и сахароза (дисахариды), маннит и сорбит (сахароспирты); поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, и белки, такие как HSA или BSA; полимеры, такие как декстран и полиэтиленгликоль; и антиоксиданты.

Кроме того, композиция необязательно может содержать консервант, такой как азид натрия. Консерванты типично используют для предотвращения загрязнения микроорганизмами.

Изобретение также относится к набору, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, он необязательно может содержать один или несколько следующих компонентов:

(I) один или несколько растворов, например, для применения в диагностическом анализе, например, для разведения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(II) листок-вкладыш, например, с инструкциями по применению;

(III) метку, как описано выше и, необязательно, растворы и/или другие компоненты, необходимые для мечения; и/или

(IV) флаконы или устройства, например, пригодные для диагностического анализа, например, один или несколько планшетов ELISA.

Предпочтительно, набор, как описано выше, также может содержать субстрат для проявления цвета. Примеры такого субстрата включают p-NPP, в особенности, в случае обнаружения с помощью щелочной фосфатазы; или фермент, такой как ABTS, TMB или OPD, в особенности, в случае применения пероксидазы хрена (HRP). Необязательно, субстрат может быть разведен в подходящем буфере, например, буфере, как описано выше в контексте композиции в соответствии с настоящим изобретением. Альтернативно, субстрат и буфер могут быть представлены в качестве отдельных компонентов в наборе.

Что касается метки, то набор также может содержать фермент, конъюгированный со стрептавидином, или другую систему для обнаружения связывания зондового антитела. Например, зондовое антитело может быть приготовлено в мышиной форме и в этом случае связывание может быть обнаружено с помощью антимишиного вторичного антитела - без необходимости биотинилирования. Антимишиное вторичное антитело представляет собой типично поликлональное и/или перекрестно-абсорбируемое для того, чтобы не реагировать с антителами человека.

Кроме того, набор может содержать один или несколько планшетов ELISA. Более предпочтительно, эти планшеты ELISA предварительно покрыты ZIKV-NS1 белком. Необязательно, такие предварительно покрытые ELISA-планшеты могут быть предварительно заблокированы.

Диагностика инфекции, вызванной вирусом Зика.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с NS1 белком ZIKV, набор или композиция могут использоваться для диагностики инфекции, вызванной вирусом Зика (ZIKV).

Диагностику инфекции, вызванной вирусом Зика (ZIKV), типично осуществляют *in vitro*, например, в выделенном образце субъекта, подлежащего диагностике. Предпочтительные выделенные образцы субъекта включают образцы жидкости организма и образцы тканей. Более предпочтительным является образец жидкости организма. Предпочтительные жидкости организма для диагностики инфекции ZIKV включают кровь (например, цельная кровь, плазма, сыворотка), слюна и моча. Наиболее предпочтительной является кровь, в особенности плазма или сыворотка.

Таким образом, применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с NS1 белком ZIKV, комплекса, композиции или набора позволяет определить, является ли выделенный образец (жидкости организма), такой как выделенный образец крови, инфицирован вирусом Зика, как описано выше. Предпочтительные жидкости организма для диагностики инфекции ZIKV включают кровь (например, цельная кровь, плазма, сыворотка), слюна и моча. Наиболее предпочтительной является кровь, в особенности плазма или сыворотка.

Для диагностики инфекции, вызванной вирусом Зика, можно применять различные диагностические анализы. Предпочтительные диагностические анализы представляют собой иммунологические анализы. Предпочтительные примеры иммунологических анализов включают ELISA, иммунофлуоресценцию, иммуногистохимию и проточную цитометрию. Предпочтительно, диагностика включает ELISA.

Например, можно использовать стандартный ELISA, сэндвич-ELISA или анализ блокады связывания.

Предпочтительно, диагностический анализ обнаруживает

(I) (наличие) самого NS1 белка ZIKV; и/или

(II) (наличие) анти-ZIKV NS1 антитела в (выделенном) образце субъекта, подлежащего диагностике.

Предпочтительно, используют анализ блокировки связывания. В этом анализе, выделенный образец от субъекта, подлежащего диагностике, (например, образец жидкости организма, такой как кровь (например, цельная кровь, плазма, сыворотка), слюна и моча) добавляют в планшет ELISA, покрытый NS1 белком ZIKV, и инкубируют (например, в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут или по меньшей мере приблизительно одного часа) для предоставления возможности связывания. После этого, добавляют антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (в качестве "зондового антитела"), которые предпочтительно метят, например, биотинилируют или конъюгируют с пероксидазой хрена (HRP). После дополнительного времени инкубирования (например, по меньшей мере приблизительно 1 мин, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 3 мин, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 5 мин, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10 мин, наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 15 мин), может быть определено ингибирование связывания антитела или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением.

В целом, ингибирование связывания показывает наличие анти-ZIKV NS1 антител в образце субъекта, таким образом, указывая на инфицирование субъекта ZIKV. В отличие от этого, в образцах неинфицированных субъектов типично не предполагают ингибирования связывания. Важным является тот факт, что такой анализ с использованием ZIKV NS1-связывающихся антител не дает положительных результатов у субъектов, которые уже были инфицированы другими флавивирусами. Флавивирусы типично индуцируют большое количество антител, которые перекрестно реагируют с ZIKV. Другими словами, этот анализ является высоко специфическим и не зависит от перекрестно-реагирующих Ab.

Таким образом, возможен анализ блокировки связывания для диагностики in-vitro инфекции, вызванной вирусом Зика, включающий следующие стадии:

(I) добавление выделенного образца от субъекта, подлежащего диагностике, на планшет, покрытый NS1 белком ZIKV, и инкубирование указанного образца на указанном планшете,

(II) добавление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или комплекса,

(III) определение ингибирования связывания указанного антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

Предпочтительно, выделенный образец от субъекта, подлежащего диагностике, выбирают из крови, слюны или мочи; предпочтительно образец представляет собой образец крови, такой как цельная кровь, плазма или сыворотка.

Также является предпочтительным, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, добавляемый на стадии (II), является меченым, предпочтительно биотинилированный или конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP).

Кроме того, выделенный образец от субъекта, подлежащего диагностике, предпочтительно разводят, например, 1:5 - 1:50, предпочтительно 1:5-1:25, например, 1:10.

Предпочтительно, время инкубирования на стадии (I) составляет по меньшей мере 5 мин, предпочтительно по меньшей мере 15 мин, более предпочтительно по меньшей мере 30 мин, еще более предпочтительно по меньшей мере 45 мин и наиболее предпочтительно по меньшей мере 60 мин.

На стадии (II) после добавления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно инкубировать в течение по меньшей мере 1 мин, предпочтительно, по меньшей мере 3 мин, более предпочтительно по меньшей мере 5 мин, еще более предпочтительно по меньшей мере 10 мин и наиболее предпочтительно по меньшей мере 15 мин.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые используют в качестве зондового антитела в анализе блокировки связывания, представляет собой предпочтительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно могут представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с антигенной детерминантой S2 NS1 белка вируса Зика. Наиболее предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые используют в качестве зондового антитела в анализе блокировки связывания, являются антителом или его антигенсвязывающий фрагментом, содержащим CDRH1, CDRH2, и CDRH3 аминокислотные последовательности и CDRL1, CDRL2, и CDRL3 аминокислотные последовательности (I) в соответствии с SEQ ID NO: 127-131 и 133; или варианты их функциональной последовательности, имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей; или (II) в соответствии с SEQ ID NO: 127-130 и 132-133; или варианты их функциональной последовательности, имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей. Особенно предпочтительно,

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением, которые используют в качестве зондового антитела в анализе блокировки связывания, представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 134 или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей и/или вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 135 или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей. Например, ингибирование связывания типичных биотинилированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов может быть оценено путем определения оптимальной концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением для достижения 70% максимального связывания с NS1 белком ZIKV. Например, оптимальные концентрации типичных антител gZKA15, gZKA25 и gZKA35 для достижения 70% максимального связывания с NS1 белком ZIKV могут составлять 38, 17 и 7 нг/мл, соответственно. После осуществления вышеописанного анализа блокировки связывания, можно добавлять субстрат, такой как p-NPP, и ELISA планшет можно анализировать при 405 нм и рассчитывать процентное значение ингибирования связывания согласно следующему уравнению (I):

$$(I) \quad \% \text{ ингиб} = (1 - [(ОП \text{ образца} - ОП \text{ отриц контр}) / (ОП \text{ полож контр} - ОП \text{ отриц контр})]) \times 100$$

где "% ингиб" относится к процентному значению ингибирования связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением с NS1 белком ZIKV; "ОП образца" относится к оптической плотности образца; "ОП отриц контр" относится к оптической плотности отрицательного контроля; и "ОП полож контр" относится к оптической плотности положительного контроля.

Этот анализ обеспечивает определенные преимущества, такие как способность обнаруживать клинические, субклинические и асимптоматические инфекции ZIKV на уровне популяции, и при этом можно их отличать от инфекций, вызванных другими флавивирусами, такими как DENV. В особенности, диагностический анализ в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает более высокую точность, чем прямые анализы ELISA связывания.

Кроме того, диагностику (*in vitro*) инфекции Зика (в выделенном образце) можно осуществлять с помощью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с NS1 белком ZIKV, комплекса, композиции или набора для определения, является ли выделенный образец (жидкости организма), такой как выделенный образец крови, инфицирован вирусом Зика.

Предпочтительные выделенные образцы (субъекта) включают образцы жидкости организма и образцы тканей. Более предпочтительным является образец жидкости организма. Предпочтительные жидкости организма для диагностики инфекции ZIKV включают кровь (например, цельная кровь, плазма, сыворотка), слюна и моча. Наиболее предпочтительной является кровь, в особенности плазма или сыворотка. Кроме того, предпочтительные диагностические анализы представляют собой иммунологические анализы. Предпочтительные примеры иммунологических анализов включают ELISA, иммунофлуоресценцию, иммуногистохимию и проточную цитометрию. Предпочтительно, диагностика включает ELISA. Наиболее предпочтительно, используют анализ блокировки связывания, как описано выше.

Предпочтительно, способ (*in vitro*) диагностики инфекции Зика (в выделенном образце) может включать этапы:

(I) контактирование выделенного образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое связывается с NS1 белком ZIKV, комплексом или композицией.

Более предпочтительно, способ (*in vitro*) диагностики инфекции Зика (в выделенном образце) может включать следующие этапы:

(0) добавление выделенного образца от субъекта, подлежащего диагностике, (например, образца жидкости организма, такого как кровь (например, цельная кровь, плазма, сыворотка), слюна и моча) на ELISA планшет, покрытый NS1 белком ZIKV;

(I) дальнейшее добавление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента на ELISA планшет, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно меченное, например, биотинилированное;

(II) необязательно, промывание планшета ELISA; и

(III) определение ингибирования связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Настоящее изобретение также предполагает применение нейтрализующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции для лечения или предотвращения инфекции ZIKV у субъектов с диагностированной инфекцией, вы-

званной вирусом Зика.

Предложенный способ предотвращения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, может включать следующие стадии:

(I) диагностику инфекции, вызванной вирусом Зика, у субъекта путем применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с NS1 белком ZIKV, комплекса, композиции, или набора; и

(II) введение указанному субъекту нейтрализующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или фармацевтической композиции.

Предпочтительно, в этом способе предотвращения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, стадию (I) диагностику инфекции, вызванной вирусом Зика, можно осуществлять в виде *in-vitro* диагностики на выделенном образце (жидкости организма), таком как выделенный образец крови.

Составной комплект (набор), содержащий

(I) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с NS1 белком ZIKV, комплекс, композицию; и

(II) нейтрализующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку или фармацевтическую композицию, пригоден для использования в способе, как описано выше. Путем применения такого способа и/или такого набора, ZIKV инфекция может быть специфически диагностироваться, а также предотвращаться и/или лечиться.

Описание фигур

Фиг. 1 показывает реакционную способность (ELISA) и ZIKV и DENV1 нейтрализующую активность антител, полученных от четырех ZIKV иммунокомпетентных доноров (ZKA, ZKB, ZKC и ZKD) к E белку ZIKV и DENV1-4 и к EDIII-домену E белка ZIKV; NNB -нейтрализующие, но не связывающие E белок, антитела.

Фиг. 2 показывает реакционную способность (ELISA) антител, полученных от четырех ZIKV иммунокомпетентных доноров (ZKA, ZKB, ZKC и ZKD) к NS1 белку из ZIKV, DENV1-4 и других флавивирусов. YFV - вирус желтой лихорадки; WVN - вирус лихорадки Западного Нила; JEV - вирус японского энцефалита; и TBEV - вирус клещевого энцефалита (но, не определяли).

Фиг. 3 показывает связывание ZKA190, ZKA78 и ZKA64 антител с ZIKV и DENV1 E и с ZIKV ED III белками, как измерено с помощью ELISA.

Фиг. 4 показывает связывание ZKA185 и ZKA190 антител с ZIKV E, DENV1 VLP и с ZIKV EDIII белками, как измерено с помощью ELISA.

Фиг. 5 показывает связывание к ZKA15, ZKA25 и ZKA35 антител с ZIKV и DENV1-4 NS1 белками, как измерено с помощью ELISA.

Фиг. 6 показывает для примера 3 картирование антигенной детерминанты ZIKV NS1 белка, используя исследования перекрестно-конкурентного Octet-связывания. (A-B) Перекрестно конкурирующую матрицу осуществляли с помощью Octet на 24 mAb, специфических для ZIKV NS1 (A) или перекрестно-реагирующий с DENV NS1 (B). +, отсутствие связывания вторичного Ab; +/-, частичная потеря связывания вторичного mAb; -, связывание вторичного mAb. Перечеркнутые клетки, не тестировали. (C) Карта антигенных детерминант, нацеленных на ZIKV NS1-специфических mAb, как определено с использованием BLI (Octet) перекрестной конкуренции.

Фиг. 7 показывает для примера 4 анализ блокады связывания, используя mAb ZKA35 в качестве зонда для обнаружения ZIKV NS1 в плазме ZIKV-иммунных (n=4), DENV- иммунных (n=5) и контрольных доноров (n=48) (1/10 разведение). Образцы плазмы тестировали для определения их способности связываться с NS1 (прозрачные кружечки) и ингибировать связывание биотинилированного mAb ZKA35 с NS1 (зарисованные кружечки).

Фиг. 8 показывает для примера 5 нейтрализующую активность ZKA190, ZKA64, ZKA64-LALA, ZKA230 и ZKA78 антител по отношению к ZIKV (H/PF/2013 штамм) и DENV1 на клетках Vero, как определено путем проточной цитометрии (% инфицированных клеток).

Фиг. 9 показывает для примера 5 нейтрализующую активность ZKA190, ZKA64, ZKA185, ZKA230 и ZKA78 антител по отношению к ZIKV (H/PF/2013 штамм) на клетках Vero, как определено путем анализа жизнеспособности клеток (wst-1, Roche).

Фиг. 10 показывает для примера 6 активность усиления инфицирования (ADE, антителозависимое усиление) ZKA190, ZKA64, ZKA64-LALA, ZKA185, ZKA230 и ZKA78 антител для ZIKV (H/PF/2013 штамм) на непермиссивных K562 клетках, как определено путем проточной цитометрии (% инфицированных клеток).

Фиг. 11 показывает для примера 6, что четыре ZIKV-иммунных плазмы и одна DENV-иммунная плазма проявляют сходную активность усиления ZIKV инфекции K562 клеток (верхняя панель). Этот ADE эффект полностью блокируется во всех пяти иммунных плазмах с помощью EDIII-специфического ZKA64-LALA антитела (нижняя панель).

Фиг. 12 показывает выравнивание аминокислот EDIII участка для 39 ZIKV штаммов из азиатских линий с 2013 г. (включая прототипный штамм MR766 африканской линии, выделенный в 1947 г).

Фиг. 13 показывает для примера 5 нейтрализующую активность ZKA190 и ZKA190-LALA анти-

тело по отношению к трем штаммам ZIKV (H/PF/2013, MR766 и MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015) на клетках Vero, как определено путем проточной цитометрии (% инфицированных клеток).

Фиг. 14 показывает для примера 7 NS1 анализ блокировки связывания для резидентов Европы. Представлены BOB значения для образцов, собранных в Италии и Швейцарии. Графически представлены BOB значения в образцах от ZIKV, первично и вторично DENV-, WNV-, и CHIKV-инфицированных индивидуумов и панель образцов крови здоровых доноров со Швейцарии.

Фиг. 15 показывает для примера 8 нейтрализацию ZKA190 и C8 mAb, тестируемых по отношению к панели четырех штаммов ZIKV, как определено в процентах инфицированных клеток Vero в присутствии возрастающих количеств mAb (А). Также представлены IC₅₀ значения (В) и статистика (С). Данные репрезентативны для по меньшей мере двух независимых экспериментов.

Фиг. 16 показывает для примера 9 нейтрализацию и усиление инфекции ZIKV с помощью антитела ZKA190. (А) Нейтрализация инфекции ZIKV PRVABC59 штамма hNPC с помощью ZKA190, ZKA190-LALA и контрольного mAb, как определяли путем анализа бляшкообразования на клетках Vero (левая панель) и непрямой иммунофлуоресценции инфицированных hNPC, используя меченное флуорофором анти-Е антитело (правая панель). (В) ADE инфекции ZIKV непермиссивных K562 клеток с помощью ZKA190 и ZKA190-LALA. (С) ADE индуцировали в K562 клетках, если ZIKV предварительно инкубировали с серийными разведениями плазмы сыворотки от различных ZIKV-положительных пациентов (левая панель). Если ZKA190 LALA добавляли к комплексам ZIKV-сыворотка, то ADE ингибировалось (правая панель). (D) ADE индуцировалось в K562 клетках, если ZIKV предварительно инкубировали с серийными разведениями rгM перекрестно-реагирующих mAb (DV62), имеющих происхождение из DENV-иммунокомпетентного донора. ZKA190-LALA ингибирует ADE от ZIKV, если образует комплексы с rгM-реакционноспособным антителом DV62. (Е) Влияние на ADE, индуцированное пиковым усиленным разведением DENV2 плазмы (левая панель) или анти-rгM DV62 mAb (правая панель) с помощью серийных разведений указанных mAb.

Фиг. 17 показывает для примера 10 идентификацию ZKA190 эпитопа и анализ его консервативности в ZIKV штаммах. (А) Наложение [¹⁵N/¹H]-HSQC спектров ¹⁵N-меченного ZIKV EDIII при отсутствии (черный) или присутствии (красный) немеченного ZKA190 Fab. Различия идентифицируют EDIII остатки, задействованные в связывание антитела. (В) ЯМР картирование эпитопа ZKA190 Fab в комплексе с ZKV EDIII. Пертурбацию химического сдвига (CSP, у-ось) графически представляли относительно номеров EDIII остатков. Остатки, задействованные в связывание антитела, выделенные красным цветом. (С) Остатки в FG петле, идентифицированные с помощью ЯМР картирования эпитопа, частично скрыты в Е белке мол А, но в значительной степени экспонируются в молекулах В и С. EDIII Е белка выделенный синим цветом. Остатки, идентифицированные с помощью ЯМР картирования эпитопа, окрашены в пурпурный цвет, за исключением тех в FG петли, которые окрашены в зеленый цвет. Смежные Е белки показаны в виде серой поверхности. (D) Уровень консервативности аминокислотных остатков в ZKA190 эпитопе, как рассчитано с помощью анализа последовательностей из 217 ZIKV штаммов, обнаруженных в базе данных источников ZIKV (NCBI) на 24 ноября 2016 г. (Е) Открытая репрезентация, демонстрирующая загрузку комплементарности между эпитопом и паратопом в результате "причаливания". Границы эпитопа и паратопа очерчены зеленым цветом. Границы между тяжелыми и легкими цепями Fab и их соответствующие области узнавания на EDIII показаны желтыми пунктирными линиями.

Фиг. 18 показывает для примера 10 ZKA190 эпитоп, идентифицированный с помощью ЯМР и "причаливания". (А) Схематическое представление 12 ЯМР структур с наиболее низкой энергией ZIKV EDIII, с остатками, задействованными в ZKA190 связывание, выделенными красным цветом. Видно гибкость на N-конце конструкции. (В) Модель комплекса ZKA190:EDIII, полученного при моделировании причаливания и молекулярной симуляции, одобренные результатами ЯМР. Эпитоп на EDIII (серый), идентифицированный с помощью ЯМР, выделено красным цветом. Тяжелая и легкая цепь ZKA190 обозначены темно- и светло-зеленым цветом, соответственно. EDIII остатки, которые задействованные или не задействованные в связывание антитела, если мутированы, показаны оранжевыми и синими палочками, соответственно. (С) Идентифицированный ЯМР ZKA190 эпитоп (красный) доступный на поверхности вируса (белый).

Фиг. 19 показывает для примера 10 связывание дт или мутированного EDIII с ZKA190 IgG. Представлены SPR данные и кинетики связывания. Показаны EDIII мутанты, которые задействованы (выделенные красным) или не задействованы в связывание, как представлено на фигуре.

Фиг. 20 показывает для примера 11 результаты экспериментов конфокальной микроскопии. ZIKV инкубировали при концентрации, превышающей в 10 тыс. раз IC₅₀ значение либо ZKA190 Fab или полноразмерных IgG, добавленных в клетки Vero. Комплекс ZIKV:антитело обнаруживали внутри клеток (зеленый) и локализованные совместно с эндосомами (красные, желтое перекрытие). Эндосомы и кислотные органеллы обозначены Lysotracker красным; Alexa-488 конъюгированные ZKA190 представлены зеленым цветом. Ядра окрашивали с помощью DAPI (синий).

Фиг. 21 показывает для примера 12 профилактическую и терапевтическую эффективность ZKA190. (А) ZKA190 эффективно защитный по отношению к инфицированию ZIKV при введении профилактически мышам (A129 в (А) и AG129 в (В)), при воздействии летальной дозы ZIKV штамма MP17451. В экс-

периментах использовали N=4-8 мышей на группы. Представлены кривые выживания Каплан-Мейера (А). Достоверность определяли с помощью Mantel-Cox логарифмического рангового критерия. Панель А, слева сверху: ZKA190 в дозе 5, 1 и 0,2 мг/кг отн. Контр mAb, P = 0,0031; ZKA190 в дозе 0,04 мг/кг отн. Контр mAb, P = 0,0116; ZKA190-LALA в дозе 5, 1, 0,2 и 0,04 мг/кг отн. Контр mAb, P = 0,0031. Панель А, справа сверху: Оценка заболеваемости мышей при наблюдении в течение 14-15 дней (использовали два различных способа оценки; см. (Dowall, S.D., Graham, V.A., Rayner, E., Atkinson, B., Hall, G., Watson, R.J., Bosworth, A., Bonney, L.C., Kitchen, S., и Hewson, R. (2016). A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004658-13). Панель А, нижние панели: масса тела мышей. Панели В: ZKA190 или ZKA190-LALA вводили в дозе 15 мг/кг в различные периоды времени после инфицирования ZIKV. Панель В, слева сверху: А Показана кривая выживания Каплан-Мейера. В экспериментах использовали N=5 мышей на группу. Достоверность определяли с помощью Mantel-Cox логарифмического рангового критерия. ZKA190 и ZKA190-LALA вводили либо в день 1, 2, 3 или 4 отн. Контр., P = 0,0016. Панель В, справа сверху: Оценка заболеваемости мышей при наблюдении в течение 14 дней в соответствии с (Dowall и др., 2016). За мышами наблюдали в течение периода 14 дней для определения потери массы тела (Панель В, нижние панели). Контрольное антитело представляло собой MPE8, специфическое для RSV F белка (Corti, D., и др. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* 501, 439-443 (2013)).

Фиг. 22 показывает для примера 12 профилактическую эффективность анти-ZIKV EDIII-специфических mAb ZKA190 по отношению к ZIKV штаммами MP1741. (А) Представлена вирусемия, измеренная в виде БОЕ/мл в день 5 в крови всех животных. (В) Вирусную нагрузку измеряли в виде геномных копий/мл с помощью количественной ПЦР в день 5 в крови всех животных и в крови и указанных тканях, если животных отбраковывали при окончании исследования или если достигали гуманных конечных точек. (С) За мышами наблюдали в течение 14 дневного периода для определения потери массы тела (D) Концентрация IgG в сыворотке крови человека в день 5 образцы крови. Достоверность определяли по сравнению с контрольным антителом, обработка с помощью непараметрического неспаренного критерия Манна-Уитни-Уилкоксона. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Фиг. 23 показывает для примера 12 терапевтическую эффективность анти-ZIKV EDIII-специфических mAb ZKA190. (А) Вирусные нагрузки измеряли в виде БОЕ в день 5 в крови всех животных. (В) Вирусные нагрузки измеряли в виде геномных копий с помощью количественной ПЦР в день 5 в крови всех животных и в крови и указанных тканях, если животных отбраковывали при окончании исследования или если достигали гуманных конечных точек. Достоверность определяли по сравнению с контрольным антителом, обработка с помощью непараметрического неспаренного критерия Манна-Уитни-Уилкоксона. *p < 0,05; **p < 0,01. (С) Концентрация IgG в сыворотке крови человека в день 5 образцы крови.

Примеры

В последующих примерах представлены иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения. Последующие примеры представлены только с целью иллюстрации и помощи квалифицированному специалисту в данной области техники для использования изобретения. Примеры никоим образом не предназначены для ограничений другим путем объема изобретения.

Пример 1. Выделение ZIKV-специфических антител и продукция моноклональных антител.

IgG+ В-клетки памяти выделяли из криоконсервированных мононуклеаров периферической крови (PBMC) от четырех ZIKV-инфицированных доноров (ZKA, ZKB, ZKC и ZKD), используя CD22 микрошарики (Miltenyi Biotec), с последующим истощением клеток, несущих IgM, IgD и IgA, путем сортировки клеток. После этого В-клетки памяти от ZIKV-инфицированных доноров иммортализовали с EBV (вирус Эпштейна-Барра) и CpG (CpG олигонуклеотидов 2006) во множественных параллельных лунках, как было описано ранее (Traggiai, E. и др., *Nat. Med.* 10, 871-875, 2004) и затем культуральные супернатанты тестировали в первичном скрининге, используя параллельно микро-анализ на нейтрализацию на основании 384 лунок и анализ связывания (ELISA) для тестирования их связывания с NS1 белком ZIKV или с E белком ZIKV. Результаты анализа связывания представлены на фиг. 1 (связывание с E белком ZIKV) и фиг. 2 (связывание с NS1 белком ZIKV).

Анализ на нейтрализацию проводили на клетках Vero. В планшете на 384 лунки, ZIKV H/PF/2013, что приводило к заражению (m.o.i., множественность заражения) 0,35, инкубировали с супернатантами в течение 1 ч при 37% (5% CO₂) перед добавлением предварительно высеянных 5 тыс. клеток Vero. Их инкубировали дополнительно в течение 5 дней, после этого супернатант удаляли и добавляли WST-1 реагент (Roche). Положительные культуры собирали и размножали. Из положительных культур получали VH и VL последовательности с помощью ОТ-ПЦР. Антитела клонировали в человеческих IgG1 и Ig kappa или Ig lambda экспрессионных векторах (предоставленными Michel Nussenzweig, Rockefeller University, New York, US), по существу, как описано (Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H (2008) Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 329: 112-124). Моноклональные антитела получали из EBV-иммортализованных В-клеток или путем временной трансфекции 293 Freestyle клеток (Invitrogen). Супернатанты из В-клеток или трансфектированных клеток собирали и IgG аффинно очищали с

помощью хроматографии на Белке А или Белке G (GE Healthcare) и обессоливали по отношению к PBS.

На фиг. 1 представлен обзор выбранных ZIKV нейтрализующих антител (см. табл. 1 и 2 для аминокислотных последовательностей их CDR и вариабельных участков тяжелых/легких цепей). Две последние колонки на фиг. 1 описывают активности нейтрализации (IC_{50}) для ZIKV и DENV1 (если их определяли). Другие колонки обеспечивают активности связывания (EC_{50}) антител к ZIKV E белку (ZIKV E), DENV1 E белку (DENV1 E), DENV2 E белку (DENV2 E), DENV3 E белку (DENV3 E), DENV4 E белку (DENV4 E), DENV1 вирусоподобной частице (DENV1 VLP), DENV2 вирусоподобной частице (DENV2 VLP), DENV3 вирусоподобной частице (DENV3 VLP), DENV4 вирусоподобной частице (DENV4 VLP), и к EDIII-домену E белка ZIKV (DIII ZKA).

Выделяли дополнительные антитела для определения их способности связываться с NS1 белком ZIKV (см. фиг. 2). Положительные культуры собирали и размножали. Из положительных культур получали VH и VL последовательности с помощью ОТ-ПЦР. Антитела клонировали в человеческих IgG1 и Ig kappa или Ig lambda экспрессионных векторах (предоставленных Michel Nussenzweig, Rockefeller University, New York, US), по существу, как описано (Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H (2008) Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 329: 112-124). Моноклональные антитела получали из EBV-иммортиализованных В-клеток или путем временной трансфекции 293 Freestyle клеток (Invitrogen). Супернатанты из В клеток или трансфектированных клеток собирали и IgG аффинно очищали с помощью хроматографии на Белке А или Белке G (GE Healthcare) и обессоливали по отношению к PBS.

На фиг. 2 представлено обзор выбранных антител, связывающих NS1-белок ZIKV (см. табл. 4 и 5 для аминокислотных последовательностей их CDR и вариабельных участков тяжелых/легких цепей). В частности, на фиг. 2 представлены активности связывания (EC_{50}) антител с NS1 белком ZIKV (ZIKV NS1), NS1 белку DENV1 (DENV1 NS1), NS1 белку DENV2 (DENV2 NS1), NS1 белку DENV3 (DENV3 NS1), NS1 белку DENV4 (DENV4 NS1), NS1 белку вируса желтой лихорадки (YFV NS1), S1 белку вируса лихорадки Западного Нила N (WNV NS1), NS1 белку вируса японского энцефалита (JEV NS1), и к NS1 белку вируса клещевого энцефалита (TBEV NS1).

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

В примере 1, было идентифицировано большое количество ZIKV-нейтрализующих антител и они были охарактеризованы в отношении их специфичности к ZIKV, в особенности E белка ZIKV и ZIKV EDIII, а также в отношении их перекрестной реакционной способности к DENV. После этого антитела ZKA190 (SEQ ID NO: 1-18), ZKA185 (SEQ ID NO: 19-36), ZKA230 (SEQ ID NO: 37-54), ZKA64 (SEQ ID NO: 73-90) и ZKA 78 (SEQ ID NO: 55-72), описанные в Примере 1, отбирали и в дальнейшем тестировали по отношению к E белку ZIKV ("ZIKV"), ZIKV EDIII ("DIII ZI") и также тестировали по отношению к E белку вируса денге (DENV, номер серотипа 1) с помощью ELISA. Для этого, использовали стандартный ELISA. Вкратце, ELISA планшеты покрывали E белком ZIKV при концентрации 1 или 3 мкг/мл, блокировали с помощью 10% FCS в PBS, инкубировали с сывороткой или антителами человека и промывали. Связанные антитела обнаруживали путем инкубирования с AP-конъюгированными козьими античеловеческими IgG (Southern Biotech). После этого планшеты промывали, добавляли субстрат (p-NPP, Sigma) и планшеты анализировали при 405 нм. Относительные аффинности связывания моноклонального антитела определяли путем измерения концентрации антитела (EC_{50}), необходимой для достижения 50% максимального связывания при насыщении.

Результаты представлены на фиг. 3 и 4. Следует отметить, что ZKA64 и ZKA190 связываются с ZIKV E и ZIKV EDIII ("DIII ZI") с низкими значениями EC_{50} , таким образом указывая на то, что ZKA64 и ZKA190 связываются с доменом III E белка ZIKV (EDIII). ZKA78 связываются с ZIKV E, но не с ZIKV EDIII, указывая на то, что ZKA78 связывается с ZIKV E, но не нацелен на EDIII участок. Несмотря на их значительную ZIKV нейтрализующую активность (см. фиг. 1), антитела ZKA185 и ZKA230 не проявляют какого-либо обнаруживаемого связывания с ZIKV E и ZIKV EDIII (фиг. 4). Таким образом, ZKA185 и ZKA230 обозначаются как "нейтрализующие, но не связывающие E белок" (NNB) антитела. Те NNB антитела предположительно распознают четвертичные эпитопы, которые экспонированы на ZIKV инфекционных вирионах, но не на растворимых белках.

Кроме того, ни одно из ZKA190, ZKA185, ZKA230, и ZKA64 не проявляют какого-либо обнаруживаемого связывания с DENV E белками (фиг. 1, DENV1-4 серотипы, и фиг. 3 и 4), указывая на то, что ZKA190, ZKA185, ZKA230, и ZKA64 являются специфическими к ZIKV и перекрестно не реагируют с вирусом денге. В отличие от этого, ZKA78, который предположительно связывается с ZIKV EDI/II, но не с ZIKV E DIII (см. фиг. 3), связывается с DENV белками (фиг. 1 и 3), указывая на то, что ZKA78 представляет собой перекрестно-реагирующее антитело, связывающееся с обоими, ZIKV и DENV.

Для дополнительного подтверждения этих результатов, связывающиеся с E белком ZIKV антитела ZKA190, ZKA64 и ZKA78 дополнительно тестировали по отношению к E белку вируса денге (DENV, номера серотипов 1-4). ZKA64 и ZKA190 не связываются с E белком DENV1-4, таким образом подтверждая тот факт, что ZKA64 и ZKA190 являются специфическими к ZIKV. В отличие от этого, ZKA78 связывается с DENV1-4 E, подтверждая тот факт, что ZKA78 представляет собой перекрестно-реагирующее антитело, связывающееся с E белком обоих ZIKV и DENV (см. фиг. 1).

Пример 3. Характеристики ZIKV NS1-специфических антител для серологической диагностики.

В примере 1, было идентифицировано большое количество NS1-реакционноспособных антител и затем они были охарактеризованы в отношении их специфичности к ZIKV NS1 и перекрестной реакционной способности к другим белкам NS1 флавивирусов (фиг. 2). После этого антитела ZKA15 (SEQ ID NO: 91-108), ZKA25 (SEQ ID NO: 109 - 126) и ZKA35 (SEQ ID NO: 127-144) были дополнительно охарактеризованы в отношении их связывания с ZIKV NS1 и DENV1 NS1, DENV2 NS1, DENV3 NS1 и DENV4 NS1. Для этого использовали стандартный ELISA. Вкратце, ELISA планшеты покрывали NS1 белком ZIKV в концентрации 1 мкг/мл, блокировали с помощью 10% FCS в PBS, инкубировали с сывороткой или антителами человека и промывали. Связанные антитела обнаруживали путем инкубирования с AP-конъюгированными козьими анти-человеческими IgG (Southern Biotech). После этого планшеты промывали, добавляли субстрат (p-NPP, Sigma) и планшеты анализировали при 405 нм. Относительные аффинности связывания моноклонального антитела определяли путем измерения концентрации антитела (EC₅₀), необходимой для достижения 50% максимального связывания при насыщении.

Результаты представлены на фиг. 5. Все три антитела (ZKA15, ZKA25 и ZKA35) связываются с высокой аффинностью с ZIKV NS1, но не с DENV1-4 NS1 антигенами (фиг. 5).

Для дальнейшего исследования связывания антител с ZIKV NS1, использовали бислойные интерферометрические конкурентные анализы. Создавали перекрестно конкурирующую матрицу, используя бислойную интерферометрию (BLI; Octet) на 13 антителах, специфических для ZIKV NS1 (то есть перекрестно не реагирующий с DENV NS1), а именно антитела ZKA24, ZKA15, ZKA32, ZKA19, ZKA50, ZKA37, ZKA46, ZKA10, ZKA48, ZKA35, ZKA25, ZKA44, и ZKA30 (см. фиг. 6A). Как можно увидеть на фиг. 2 не одно из этих 13 антител не проявляет обнаруживаемого связывания с DENV NS1.

Конкурентные анализы и определение антигенных детерминант осуществляли при 37°C с помощью системы Octet RED96, FortéBio. ZIKV-NS1 белок, разведенный до 2,5 мкг/мл в PBS, иммобилизовали в течение 7-9 мин на поверхности APS покрытого сенсорного чипа. Покрытые биосенсоры помещали в лунки, содержащие блокирующий буфер (0,1% BSA в PBS) в течение 6 мин для блокирования свободных сайтов связывания Biosensor. После этого покрытие Biosensors инкубировали в течение 8 мин с набором единичных очищенных mAb, специфических для ZIKV-NS1, разведенных в блокирующем буфере при 10 мкг/мл. После связывания первой партии mAb (этап 1), Biosensors передвигали в лунки, содержащие различные mAb в течение 8 мин (этап 2). Ассоциация второго mAb приводило к распознаванию различной антигенной детерминанты по сравнению с первым mAb (например, не конкурентное). Конкуренцию или частичную конкуренцию определяли на этапе 2, где не обнаруживали ассоциацию или незначительную ассоциацию, соответственно. Создавали перекрестно конкурирующую матрицу путем множественных прогонов конкурентий для предсказания картирования антигенной детерминанты на ZIKV NS1.

Результаты представлены на фиг. 6A и 6C. Сначала, все из тестированных ZIKV NS1-специфических антител связывались с антигенной(ыми) детерминантой(ами) S1 и/или S2 (фиг. 6A). Тем не менее, некоторые из антител не конкурировали с другими. Например, ZKA15 не конкурировало за связывание с ZKA25 и ZKA35 и наоборот (фиг. 6A). Таким образом, антителу ZKA15 присваивали антигенную детерминанту S1, в то же время как антителам ZKA25 и ZKA35 присваивали антигенные детерминанты S2 (фиг. 6C). В заключение, на основании используемых антител, идентифицировали антигенные детерминанты (S1 и S2) на ZIKV NS1 (фиг. 6C).

Дополнительно, исследовали связывание 10 антител, перекрестно реагирующих с NS1 белком ZIKV и с NS1 белком DENV (а именно, ZKA18, ZKA29, ZKA39, ZKA53, ZKA54, ZKB19, ZKB23, ZKC29, ZKC33, и ZKC34; фиг. 6B) с антигенными детерминантами S1 и/или S2 на ZIKV NS1. Как можно увидеть на фиг. 2 все эти 10 антител проявляют связывание с DENV NS1. Эти 10 перекрестно-реагирующих антител тестировали в перекрестном конкурентном анализе, как описано выше (для ZIKV NS1-специфических антител) по отношению к ZIKV NS1 S1-специфическому антителу ZKA15 и по отношению к ZIKVNS1 S2-специфическому антителу ZKA35.

Результаты представлены на фиг. 6B. Интересным является тот факт, что ни одно из десяти тестируемых перекрестно-реагирующих антител не конкурирует с ZKA 15 и/или ZKA35 за связывание с антигенной(ыми) детерминантой(ами) S1 и/или S2 на ZIKV NS1 (фиг. 6B). Эти результаты свидетельствуют о том, что антигенная детерминанта ZKA15 и ZKA35 не нацелена на NS1 перекрестно-реагирующих антител. Таким образом, NS1 антигенные детерминанты S1 и S2 нацелены на ZIKV-специфические, но не перекрестно реагирующие антитела.

Пример 4. Применение ZIKV NS1-специфических антител для диагностики инфекции ZIKV.

В данном примере, исследовали применимость ZIKV NS1-специфических антител согласно настоящему изобретению для диагностики инфекции ZIKV. Более специфически определяли применение ZIKV NS1-специфических антител согласно настоящему изобретению для специфического обнаружения наличия или отсутствия антител, вырабатываемых к ZIKV NS1 в образцах плазмы ZIKV-или DENV-инфицированных доноров.

Для этого, использовали анализ "блокады связывания". В особенности, определяли способность ZIKV NS1-реакционно-способных антител в плазме ингибировать связывание биотинилированного антитела ZKA35 с ZIKV NS1. Для этого, ZIKV NS1-специфическое антитело ZKA35 биотинилировали,

используя EZ-Link NHS-PEO набор твердофазного биотинилирования (Pierce). Меченное ZKA35 тестировали относительно связывания с ZIKV NS1 –определяли оптимальную концентрацию ZKA35 для достижения 70% максимального связывания. Образцы плазмы от ZIKV- (n=4), DENV-иммунных (n=5) доноров и контрольной (n=48) плазмы (1/10 разведение) добавляли в ELISA планшеты, покрытые ZIKV NS1. Через 1 ч, биотинилированное анти-ZIKV NS1 антитело ZKA35 добавляли при концентрации, обеспечивающей 70% максимального связывания, и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Планшеты промывали, добавляли субстрат (p-NPP, Sigma) и планшеты анализировали при 405 нм. Процентное значение ингибирования рассчитывали следующим образом: $(1 - [(ОП\ образца - ОП\ отриц\ контр) / (ОП\ полож\ контр - ОП\ отриц\ контр)]) \times 100$.

Результаты представлены на фиг. 7. Следует отметить, что связывание антитела ZKA35 с антигенной детерминантой S2 на NS1 ингибируется только образцами плазмы от ZIKV-иммунокомпетентных доноров, но не DENV-иммунокомпетентных доноров, и это связывание также не ингибируется 48 контрольными образцами плазмы (фиг. 7). Таким образом, это исследование можно использовать для специфического обнаружения клинических и субклинических ZIKV инфекций на уровне популяции.

Пример 5. Антитела в соответствии с настоящим изобретением эффективно нейтрализуют ZIKV инфекцию.

Выделенные антитела ZKA190, ZKA185, ZKA230, ZKA64 и ZKA78 тестировали относительно их способности нейтрализовать инфекцию ZIKV и DENV1 *in vitro*.

Нейтрализацию DENV и ZIKV инфекции с помощью антител измеряли с использованием анализа на основании микро-нейтрализации проточной цитометрии. Различные разведения антител смешивали с ZIKV (MOI 0,35) или ослабленным DENV1 (все при MOI 0,04) в течение 1 ч при 37°C и добавляли к 5000 клеток Vero/лунку в планшеты на 96 лунок с плоским дном. Через четыре дня для ZIKV и пять дней для DENV, клетки фиксировали с помощью 2% формальдегида, пермеабилizировали в PBS 1% FCS 0,5% сапонина, и окрашивали с помощью мышиного mAb 4G2. Клетки инкубировали с козьим анти-мышинным IgG, конъюгированным с Alexa Fluor488 (Jackson Immuno-Research, 115485164) и анализировали путем проточной цитометрии. В других случаях также определяли данные нейтрализации ZIKV, измеряя жизнеспособность клеток с использованием WST-1 реагента (Roche). Титр нейтрализации (50% ингибирующей концентрации [IC₅₀]) выражали в виде концентрации антитела, которая уменьшает инфицирование на 50% по сравнению с контрольными лунками только с клетками.

Результаты представлены на фиг. 8, 9 и 13. EDIII-специфические mAb ZKA64 и ZKA190 и NNB mAb ZKA230 чрезвычайно эффективны для нейтрализации ZIKV (штамм H/PF/2013), с IC₅₀ значениями 93, 9 и 10 нг/мл, соответственно (фиг. 8, верхняя панель). В отличие от этого, перекрестно-реагирующее антитело ZKA78 только частично нейтрализует ZIKV инфекционность и перекрестно нейтрализует DENV1 инфекционность (фиг. 8, нижние панели). Сходные данные были получены путем изменения ZIKV-индуцированного цитопатического эффекта, определенного с помощью WST-1 реагента (фиг. 9). В этом втором анализе, NNB антитело ZKA185 также включали в панель тестируемых антител и проявляло IC₅₀, сходное с наиболее эффективными антителами ZKA190 (EDIII-специфическим) и ZKA230 (NNB).

Важным является отметить, что очень эффективные ZKA64 и ZKA190 антитела, дополнительно к их способности нейтрализовать ZIKV H/PH/2013 штамм (данный пример), также связываются с E белком и EDIII, имеющим происхождение из ZIKV штаммов MR766 и SPH2015, соответственно (фиг. 1 и фиг. 3). Подтверждено, что ZKA190 и ZKA190-LALA также эффективно нейтрализуют два дополнительных ZIKV штамма (MR766 и MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015) (фиг. 13). Взятые в совокупности, результаты указывают на то, что чрезвычайно эффективные ZKA64 и ZKA190 антитела перекрестно реагируют с множественными штаммами ZIKV, относящимся в различным генотипам и происхождению (Восточная Африка и Азия из Уганды, Французской Полинезии, острова Мартиника и Бразилии).

Пример 6. "LALA" мутация ингибирует антителозависимое усиление инфекции ZIKV с помощью сывороточных антител.

Нейтрализующее антитела также тестировали для определения их способности усиливать инфицирование ZIKV в непермиссивных K562 клетках (анализ антителозависимого усиления, ADE анализ). ADE измеряли с помощью проточного анализа с использованием K562 клеток. Антитела и ZIKV H/PF/2013 (MOI 0,175) смешивали в течение 1 ч при 37°C и добавляли к 5000 K562 клеткам/лунку. Через четыре дня, клетки фиксировали, пермеабилizировали, и окрашивали с помощью m4G2. Количество инфицированных клеток определяли путем проточной цитометрии.

Результаты представлены на фиг. 10. Все антитела усиливают инфекцию ZIKV в непермиссивных K562 клетках в широком диапазоне концентраций, включая те, которые полностью нейтрализуют ZIKV инфекцию на клетках Vero (фиг. 10). Следует отметить, что в то время как EDIII-специфические антитела ZKA64 и ZKA190 полностью нейтрализуют ZIKV инфекции K562 клеток выше 1 мкг/мл, NNB антитело ZKA230 оказывается неспособным это сделать, результатом, который может быть обусловлен разными механизмами нейтрализации свободных вирусов по сравнению с Fc-гамма-рецептор-интернализованными вирусами. В отличие от этого, перекрестно реагирующее ZKA78, которое только частично нейтрализует ZIKV инфекционность, эффективно усиливает ZIKV инфицирование K562 клеток. Эти результаты свидетельствуют о том, что перекрестно-реагирующие антитела, вызываемые либо

ZIKV или DENV инфекцией, могут опосредовать гетерологическое ADE.

С учетом вышеизложенного, проводилось исследование, может ли ADE также индуцироваться иммунной сывороткой и может ли блокироваться нейтрализующими антителами, доставляемыми в виде "LALA варианта". Для получения LALA варианта, каждую из тяжелых цепей мутировали в аминокислотах 4 и 5 CH2 домена путем замены на аланин вместо встречающегося в природе лейцина, используя сайт-направленный мутагенез. Как описано выше, LALA варианты (IgG1 человека антитела) не связываются с Fc-гамма-рецепторами и комплементом.

Для исследования влияния ZKA64-LALA антитела в ZIKV ADE, использовали ингибирование ADE анализа. Поскольку ADE для ZIKV наблюдается при использовании ZIKV- или DENV-иммунной плазмы, ZIKV (MOI 0,175) смешивали с плазмой от первичных ZIKV- или DENV-инфицированных доноров в течение 30 мин при 37°C. ZKA64-LALA антитело добавляли при концентрации 50 мкг/мл, смешивали 5000 K562 клеток/лунку и инкубировали в течение трех дней. После этого клетки окрашивали с помощью 4G2 и анализировали путем проточной цитометрии.

Результаты представлены на фиг. 11. В гомологичных установках, четыре ZIKV-иммунных плазмы, собранные от выздоравливающих пациентов и одна DENV-иммунная плазма проявили сходную способность усиливать ZIKV инфицирование K562 клеток (фиг. 11, верхняя панель), и этот ADE эффект полностью блокируется EDIII-специфическим ZKA64-LALA антителом (фиг. 11, нижняя панель).

Следует отметить, что ADE эффект ZIKV- и DENV-иммунной плазмы полностью блокируется EDIII-специфическим ZKA64-LALA антителом. Способность блокировать ADE единичного EDIII-специфического LALA антитела может относиться не только к его способности преобладать в конкуренции с усиливающими антителами в сыворотке, но также и нейтрализовать вирус при интернализации в эндосомы.

Эти результаты указывают на то, что эффективное нейтрализующее антитело, такое как ZKA190, ZKA230, ZKA185 или ZKA64, разработанные в "LALA" форме, имеют сильный потенциал использоваться в профилактических или терапевтических установках для предотвращения врожденной ZIKV инфекции, например, у беременных женщин и/или у людей, живущих на территории с высоким риском. Применение LALA формы позволяет избежать риска ZIKV ADE и, как показано выше, также может блокировать ADE ранее существующих перекрестно-реагирующих антител, как, например, в случае пациентов, уже иммунных к DENV.

Пример 7. Анализ образцов европейских резидентов с использованием ZIKV NS1-специфических антител для диагностики инфекции ZIKV.

Данный Пример основан на анализе блокады связывания, описанном в примере 4. Для дальнейшей оценки специфичности ZIKV NS1 BOB анализа, тестировали большое количество образцов, полученных от пациентов, инфицированных DENV, WNV или вирусом чикунгунья (CHIKV).

Для этого, использовали анализ "блокады связывания". Полистирольные планшеты покрывали в течение ночи 1 мкг/мл ZIKV NS1 и блокировали в течение 1 ч с PBS, содержащим 1% BSA. Добавляли плазму или сыворотку (1:10 разведение) к NS1-покрытым планшетам ELISA. После этого, например, через 1 ч, добавляли равный объем биотинилированного анти-NS1 ZKA35, и смесь инкубировали, например, при комнатной температуре в течение 15 мин. Планшеты промывали и добавляли стрептавидин, конъюгированный со щелочной фосфатазой, например, в течение 30 мин. Планшеты снова инкубировали и добавляли субстрат. Рассчитывали процентное значение ингибирования следующим образом: $(1 - \frac{(\text{ОП образца} - \text{ОП отриц контр})}{(\text{ОП полож контр} - \text{ОП отриц контр})}) \times 100$.

Результаты представлены на фиг. 14. Тридцать один из 32 образцов (96,9%) от WNV пациентов, собранных более, чем через 10 дней после начала симптомов, были оценены отрицательно. Следует отметить, что только положительную оценку получали от образца, собранного в 2016 г. Два из 27 образцов от DENV пациентов, собранных более, чем за 10 дней после начала симптомов, оценивали положительно, и два положительных образца были получены от вторичных DENV инфекций. Дополнительно, ни один из образцов, полученных от пациентов с чикунгунья, или YFV-вакцинах оценивали положительно. Также тестировали большое количество образцов плазмы от доноров крови со Швейцарии (n=116), собранных в период между 2010 и 2016 гг. Ни один из этих образцов не был оценен положительно. Полученные результаты подтверждают и усиливают высокую чувствительность и специфичность NS1 BOB ELISA анализа.

Пример 8. Антитело в соответствии с настоящим изобретением нейтрализует ZIKV более эффективно, чем антитело из уровня техники EDE1 mAb C8.

Для сравнения нейтрализующих антител в соответствии с настоящим изобретением с эффективными нейтрализующими анти-ZIKV антителами из уровня техники, осуществление нейтрализации ZKA190 сравнивали с такими же параметрами для эффективно нейтрализующего mAb из уровня техники EDE1 C8 (Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Haouz A, England P, Stiasny K, Mongkolsapaya J, Heinz FX, Screaton GR, Rey FA. Structural basis of potent Zika-denge virus antibody cross-neutralization. Nature. 2016 Aug 4;536(7614):48-53). Нейтрализация обоих антител тестировали по отношению к панели четырех различных ZIKV штаммов (H/PF/2013; MR766, MRS-OPY и PV10552).

Вкратце, измеряли нейтрализацию инфекции ZIKV с помощью mAb с использованием анализа

микро-нейтрализации на основании проточной цитометрии. Различные разведения mAb смешивали с ZIKV (MOI 0,35) в течение 1 ч при 37°C и добавляли к 5000 клеткам Vero/лунку в планшеты на 96 лунок с плоским дном. Через четыре дня для ZIKV, клетки фиксировали с помощью 2% формальдегида, пермеабелизировали в PBS, содержащем 1% фетальную телячью сыворотку (Hyclone) и 0,5% сапонин, и окрашивали с помощью мышинового mAb 4G2. Клетки инкубировали с козьим анти-мышинным IgG, конъюгированным с Alexa Fluor488 (Jackson Immuno-Research, 115485164) и анализировали путем проточной цитометрии. Титр нейтрализации (50% ингибирующей концентрации [IC₅₀]) выражали в виде концентрации антитела, которая уменьшает инфицирование на 50% по сравнению с контрольными лунками только с вирусом.

Результаты представлены на фиг. 15. ZKA190 mAb эффективно нейтрализует африканские, азиатские и африканские штаммы с IC₅₀ в диапазоне от 0,6 до 8 нг/мл. По сравнению с этим, антитело из уровня техники С8 приблизительно в 24 раза менее эффективно.

Пример 9. Дальнейшая характеристика антитела ZKA190.

Эффективность антитела ZKA190 в дальнейшем исследовали *in vitro* и *in vivo*. Для этого, синтезировали mAb в IgG1 формате дикого типа (дт) и в формате IgG1 Fc-LALA. Вкратце, VH и VL последовательности клонировали в человеческих I γ 1, I κ и I γ λ, экспрессионных векторах (любезно предоставленных Michel Nussenzweig, Rockefeller University, New York, NY, USA), по существу, как описано (Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H: Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell OT-ПЦР and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 2008, 329:112-124). Рекомбинантные mAb получали путем временной трансфекции EXP1293 клеток (Invitrogen), очищенных с помощью хроматографии на Белке А (GE Healthcare) и обессоленных по отношению к PBS. Для получения LALA варианта, каждую из тяжелых цепей мутировали в аминокислотах 4 и 5 CH2 домена путем замены на аланин вместо встречающегося в природе лейцина, используя сайт-направленный мутагенез. Как описано выше, LALA варианты (IgG1 человека антитела) не связывается с Fc-гамма-рецепторами и комплементом.

Как показано на фиг. 15А и описано в примере 8, ZKA190 тестировали на панели четырех ZIKV штаммов. ZKA190 mAb эффективно нейтрализует африканские, азиатские и американские штаммы с IC₅₀ в диапазоне от 0,004 до 0,05 нМ (фиг. 15А; от 0,6 до 8 нг/мл).

Поскольку было показано, что ZIKV инфицирует нейтральные клетки-предшественники человека (hNPC), что приводит к повышенной клеточной токсичности, нарушению регуляции клеточного цикла и уменьшенному росту клеток, ZKA190 и ZKA190-LALA тестировали в hNPC. Для этого, фибробласты взрослых особей мужского пола, полученные от Movement Disorders Bio-Bank (Neurogenetics Unit of the Neurological Institute 'Carlo Besta', Milan), перепрограммировали, используя набор CytoTune-iPS 2.0 Sendai (Life Technologies). hiPSC поддерживали в условиях без питания в mTeSR1 (Stem Cell Technologies). Для получения эмбрионидных телец (ЕВ), диссоциированные hiPSC высевали в планшеты с низкой адгезией в mTeSR1, дополненной N2 (0,5×) (ThermoFisher Scientific), Noggin человека (0,5 мг/мл, R&D System), SB431542 (5 мкМ, Sigma), Y27632 (10 мкМ, Miltenyi Biotec) и пенициллин/стрептомицин (1%, Sigma) (как описано в Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR: A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2010, 143:527-539). Для получения розеток, ЕВ высевали через 10 дней на покрытые матригелем планшеты (1:100, матригель с уменьшенными факторами роста, Corning) в DMEM/F12 (Sigma) с N2 (1:100), заменимыми аминокислотами (1%, ThermoFisher Scientific) и пенициллин/стрептомицин. Через 10 дней, клетки пассировали с аккутазой (Sigma) и высевали в покрытые матригелем колбы в NPC среду, содержащую DMEM/F12, N2 (0,25%), B27 (0,5%, ThermoFisher Scientific), пенициллин/стрептомицин и FGF2 (20 нг/мл, ThermoFisher Scientific). hNPC (3×10⁴) высевали на покровные стекла в планшеты на 24 лунки за 3 дня до инфицирования PRVABC59 штаммом. Маточный раствор вируса инкубировали с mAb 1 ч перед добавлением к hNPC для получения MOI 0,5. После абсорбции вируса в течение 4 ч, клеточный супернатант удаляли и повторно добавляли свежую среду, содержащую mAb. Супернатант собирали через 96 ч после инфицирования для измерения титров вируса путем анализа бляшкообразования на клетках Vero. Клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида (PFA, Sigma) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, Euroclone) в течение 30 мин для непрямой иммунофлуоресценции. Фиксированные клетки пермеабелизировали в течение 30 мин (минут) в блокирующем растворе, содержащем 0,2% Triton X-100 (Sigma) и 10% сыворотки осли (Sigma), и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами в блокирующем растворе. Для обнаружения использовали следующее антитело: к оболочке (1:200, Millipore, MAB10216). После этого, клетки промывали с PBS и инкубировали в течение 1 ч с Hoechst и анти-мышинными Alexa Fluor-488 вторичными антителами (1:1,000 в блокирующем растворе, ThermoFisher Scientific). После промывания PBS, клетки снова промывали и укрепляли.

Результаты представлены на фиг. 16А. Оба антитела, ZKA190 и ZKA190-LALA, полностью отменяют инфицирование и репликацию ZIKV в hNPC.

Далее, тестировали способность ZKA190 и ZKA190-LALA вызывать ADE в K562 клеточной линии, как описано в примере 6. Вкратце, ADE измеряли путем проточного анализа, используя K562 клетки.

Вкратце, для ZKA190, ZKA190 и ZIKV H/PF/2013 (MOI 0,175) смешивали в течение 1 ч при 37°C и добавляли к 5000 K562 клеток/лунку. Через четыре дня, клетки фиксировали, пермеабализировали, и окрашивали с помощью mAb m4G2. Количество инфицированных клеток определяли путем проточной цитометрии. Для ZKA190-LALA, ZIKV (MOI 0,175) смешивали с плазмой от первичных ZIKV-инфицированных доноров в течение 30 мин при 37°C. ZKA190-LALA добавляли при концентрации 50 мкг/мл, смешивали 5000 K562 клеток/лунку и инкубировали в течение трех дней. После этого клетки окрашивали с помощью 4G2 и анализировали путем проточной цитометрии. Результаты представлены на фиг. 16B. ZKA190 поддерживает ADE от 0,0001-1 нМ; как предполагалось, ZKA190-LALA не проявляет какой-либо активности ADE. Также тестировали способность ZKA190-LALA ингибировать ADE, индуцированное плазмой от четырех ZIKV-иммунокомпетентных доноров в K562 клетках. Результаты представлены на фиг. 16C. Было обнаружено, что ZKA190-LALA полностью ингибировало ADE, индуцированное антителами в плазме (фиг. 16C).

Анти-prM антитела составляют часть преобладающих антител, вырабатываемых во время иммунного ответа человека на флавивирусы, и было показано, что они усиливают вирусную инфекцию *in vitro* (Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirakul, N., Fitton, P., Vasanaathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C, Edwards, C, Duangchinda, T., Supasa, S., и др. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328, 745-748). K562 клетки предварительно инкубировали с серийными разведениями prM перекрестно-реагирующего антитела DV62 (Beltramello, M., Williams, K.L., Simmons, C.P., Macagno, A., Simonelli, L., Quyen, N.T.H., Sukopulvi-Petty, S., Navarro-Sanchez, E., Young, P.R., de Silva, A.M., и др. (2010). The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 8, 271-283), имеющего происхождение от DENV иммунокомпетентного донора. Результаты представлены на фиг. 16D. DV62 перекрестно реагирует с ZIKV prM белком и вызывает ADE в широком диапазоне концентраций (фиг. 16D). ZKA190-LALA может полностью блокировать анти-prM DV62 mAb-индуцированное ADE незрелых или частично незрелых ZIKV частиц (фиг. 16D).

В завершение, тестировали способность различных концентраций ZKA190, ZKA190-LALA и ZKA190 Fab вызывать или блокировать ADE для ZIKV в присутствии возрастающих концентраций анти-DENV2 в плазме человека или DV62. Результаты представлены на фиг. 16E. ZKA190 при низких концентрациях увеличивает prM DV62-опосредованное ADE инфицирование ZIKV, что согласуется с его способностью стимулировать проникновение как незрелых, так и зрелых вирионов, в то время как при концентрациях выше 1,3 нМ (то есть, 200 нг/мл) ZKA190 блокирует ADE индуцированное как DENV плазмы, так и mAb DV62. ZKA190-LALA, также как и его Fab фрагмент, уменьшает ADE при концентрациях выше 0,06 нМ, указывая на то, что обе ингибированные вирусные инфекции находятся на этап после присоединения, таком как слияние.

Пример 10. ZKA190 связывается с консервативным и высоко доступным участком EDIII.

Для определения ZKA190 эпитопа на уровне остатков, использовали разрешение ЯМР спектроскопии, как описано в Bardelli, M., Livoti, E., Simonelli, L., Pedotti, M., Moraes, A., Valente, A.P., and Varani, L. (2015). Epitope mapping by solution NMR spectroscopy. *J. Mol. Recognit.* 28, 393-400; Simonelli, L., Beltramello, M., Yudina, Z., Macagno, A., Calzolari, L., and Varani, L. (2010). Rapid structural characterization of human antibody-antigen complexes through experimentally validated computational docking. *J Mol Biol* 396, 1491-1507; and Simonelli, L., Pedotti, M., Beltramello, M., Livoti, E., Calzolari, L., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Varani, L. (2013). Rational Engineering of a Human Anti-Dengue Antibody through Experimentally Validated Computational Docking. *PLoS ONE* 8, e55561.

Вкратце, спектры записывали на ЯМР спектрометре Bruker Avance 700 МГц при 300 К. Для установления каркасных резонансов при стандартных экспериментах тройных резонансов (использовали HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CACB, HNCACB, при этом боковые цепи аннотировали, используя HCCH-TOCSY и HBHA(CO)NH эксперименты. Все ЯМР эксперименты осуществляли, используя Topspin 2.1 (Bruker Biospin) и анализировали с помощью CARA. NOESY перекрестные пики автоматически определяли, используя CYANA "poeassign" макро, на основании вручную определенных химических сдвигов. Ограничители верхнего расстояния, используемые для структурных расчетов на CYANA с применением стандартного протокола искусственного отжига, получали из 70 мс ¹⁵N- и ¹³C-разрешенных NOESY спектров. Каркасные динамики для ZIKV EDIII получали на основании измерений N релаксации, записанных на 600 и 700 МГц спектрометрах. Использовали версии обнаружения протонов CPMG (R2), инверсии-восстановления (R1) и ¹⁵N{¹H}-стационарного NOE. Параметры задержки для T2 серий находились в диапазоне от 0 до 0,25 с и для T1 серий в диапазоне от 0,02 до 2 с. В ¹⁵N{¹H}-NOE эксперименте использовали задержку релаксации 5 с. R1 и R2 скорости релаксации получали на основании подгонки методом наименьших квадратов соответствующих экспоненциальных функций к измеренным данным, используя собственные написанные скрипты. Данные релаксации анализировали в безмодельном подходе, используя программное обеспечение DYNAMICS. Использовали программу ROTDIF для расчета общего времени корреляции на основании данных релаксации (8,5 нс). ЯМР картирование эпитопа осуществляли, как было описано ранее (Bardelli и др., 2015; Simonelli и др., 2010; 2013). Вкратце, перекрытие ¹⁵NHSQC спектров меченных EDIII свободных или связанных с ZKA190 Fab предоставляло возможность

идентификации EDIII остатков, чьи ЯМР сигналы изменялись при образовании комплекса, указывая на то, что они задействованы в ZKA190 связывание. Изменения идентифицировали путем ручного наблюдения и путем пертурбации химических сдвигов (CSP), $CSP = ((\Delta\delta_H)^2 + (\Delta\delta_N/10)^2)^{1/2}$. ЯМР образцы типично включали 800 мкМ [^{15}N , ^{13}C]-меченных EDIII в 20 мМ фосфате натрия, 50 мМ NaCl, pH 6,0. Пердеитерированные (номинально 70%) ^2H , ^{15}N EDIII образцы использовали для ЯМР картирования эпитопа с EDIII:ZKA190 Fab соотношением 1:1.1; EDIII концентрация типично составляла 0,4 мМ.

Поскольку ЯМР сигнал сильно зависит от локального химического окружения, то изменения при образовании комплекса идентифицируют остатки антигена, которые задействованы в связывание антитела, либо непосредственно или путем аллостерических эффектов. Путем сравнения ЯМР спектров свободного и связанного EDIII (фиг. 17A), остатки, задействованные на ZKA190, картированы на LR в EDIII, в особенности на BC, DE и FG петли, а также в виде части EDI-EDIII шарнира (фиг. 18A). Эти остатки являются практически идентичными среди 217 известных ZIKV штаммов, за исключением замен в V341I и E393D в изоляте Уганда 1947 (фиг. 17D). Эти мутации также присутствуют в MR766 штамме, которые эффективно нейтрализуются ZKA190 (фиг. 15A). Анализ ZKA190 эпитопа на некомплексируемой ZIKV структуре показал, что эпитоп легко доступный, за исключением для FG петли в 5-складчатой вершине (фиг. 18B и 17C, молекула A).

Вычислительное "причаливание" с последующей симуляцией молекулярной динамики, под руководством и обоснованные информацией об эпитопе на основании данных ЯМР, а также EDIII мутагенеза, показало, что ZKA190 связывается через поверхность раздела путем комплементарности формы и заряда (фиг. 18B и 17E). Причаливание указывает на то, что отсутствуют непосредственные контакты между ZKA190 и FG петлей на EDIII, свидетельствуя о том, что изменения в его ЯМР сигналах при связывании антитела имеет происхождение от аллостерических эффектов. Эта точка зрения подтверждается тем фактом, что мутации остатков FG петли в рекомбинантном EDIII, но не в других участках эпитопа, не оказывают влияния на аффинность связывания ZKA190 для EDIII (фиг. 18B и 19).

Пример 11. Механизмы ZKA190 нейтрализации.

Способность ZKA190 эффективно нейтрализовать вирус может вовлекать ингибирование либо присоединение клеток или мембранный синтез. Дальнейший механизм может вовлекать инактивацию вируса путем перекрестного связывания вирусных частиц.

ZKA190 Fab может нейтрализовать ZIKV, хоть и менее эффективно, чем соответствующий IgG. Путем связывания с EDI-EDIII линкером, ZKA190 (оба Fab и IgG) может ингибировать ~70 градусов вращения DIII, необходимое для слияния вируса с мембраной клетки-хозяина (Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X., and Rey, F.A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *Embo J* 23, 728-738; Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313-319). Альтернативно, ZKA190 может предотвращать присоединение ZIKV к клеткам-мишеням.

Способность ZKA190 ингибировать мембранный синтез подтверждается анализом путем конфокальной микроскопии. Для этого, клетки Vero высевали в количестве 7500 клеток/лунку на покровные стекла диаметром 12 мм в планшеты на 24 лунки и инкубировали в течение ночи. Клетки инфицировали ZIKV N/PF/2013 (MOI 100) в присутствии или отсутствии нейтрализующих концентраций Alexa-488 конъюгированных mAb (0,7 мкМ) при 37°C в течение 3 ч, промывали PBS, и фиксировали с помощью 2% параформальдегида в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Подкисленные эндосомы идентифицировали с помощью Lysotracker красного (Invitrogen) путем добавления красителя (50 нМ) к клеткам в течение последних 30 мин инкубацией перед фиксированием. После фиксации осуществляли интенсивное промывание в PBS и 50 мМ глицина и, в завершение, покровные стекла приготавливали для микроскопического анализа, используя гистологическую среду Vectashield для флуоресценции с DAPI (Vector Laboratories). Образцы анализировали путем конфокальной микроскопии, используя Leica TCS SP5 микроскоп с а 63x/1,4 N.A. объективом. Анализ и обработку изображений осуществляли с помощью программного обеспечения Fiji.

Результаты представлены на фиг. 20. Анализ путем конфокальной микроскопии показал, что ZKA190 (Fab или IgG) может входить в клетки Vero только при образовании комплекса с ZIKV, при нейтрализующих концентрациях, превышающих IC_{50} в 10 тыс. раз (фиг. 20).

Пример 12. Характеристика *in vivo* EDIII-специфического mAb ZKA190.

Для оценки их профилактических и терапевтических свойств, ZKA190 и ZKA190-LALA тестировали на A129 мышах, получавших летальную дозу ZIKV штамм MP1751 (африканская линия).

Для тестирования их профилактических эффективностей, ZKA190 и ZKA190-LALA вводили за один день до вирусной провокации.

Самкам мышей A129 (ИФН-альфа/бета рецептор -/-) и мышей дикого типа 129Sv/Ev в возрасте 5-8 недель вводили mAb (ZKA190, ZKA190-LALA и контрольное антитело MPE8 (Corti, D., et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* 501, 439-443 (2013)), разведенные в PBS в различных тканях внутрибрюшинным путем (в/б) в объеме 500 мкл. MAb вводили либо

за 1 день или через 1, 2, 3 или 4 дней после вирусной провокации. Животных провоцировали подкожно с применением 102 БОЕ ZIKV (штамм MP1751) и затем в течение 14 дней. Каждый день наблюдали за весом тела и температурой и клинические наблюдения записывали по меньшей мере два раза в сутки. В день 5 после провокации, от каждого животного отбирали 50 мкл крови в РНКзащищенные пробирки (Qiagen, UK) и замораживали при -80°C . После окончания исследования (через 14 дней после провокации) или когда животные достигали конечных точек гуманности, отбирали пробы органов после вскрытия, и кровь и срезы головного мозга, селезенки, печени, почек и яичников собирали для вирусологических анализов.

Образцы тканей от A129 мышей взвешивали и гомогенизировали в PBS, используя керамические шарики и автоматизированный гомогенизатор (Precellys, UK), используя шесть 5-ти секундных циклов при 6500 об./мин с перерывом 30 с. Двести мл гомогената ткани или раствора крови переносили в 600 мкл RLT буфера (Qiagen, UK) для экстракции РНК, используя RNeasy Mini набор для экстракции (Qiagen, UK); образцы пропускали через QIAshredder (Qiagen, UK) как на начальной стадии. Использовали ZIKV специфический анализ ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения вирусной РНК от субъектов-животных. Праймерные и зондовые последовательности адаптировали от Quick и др., 2017 (Quick, J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rogers TF, Beutler NA, и др.: Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. Nat Protoc 2017, 12:1261-1276) с внутренней оптимизацией и валидацией, осуществляемой для обеспечения оптимальных условий мастер-микс и циклизации. ОТ-ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием набора Superscript III Platinum One-step qRT-PCR (Life Technologies, UK). Конечная мастер-микс (общая реакционная смесь) (15 мкл) содержала 10 мкл 2× реакционной смеси, 1,2 мкл воды ПЦР-степени чистоты, 0,2 мкл 50 мМ MgSO_4 , 1 мкл каждого праймера (ZIKV 1086 и ZIKV 1162с оба при 18 мкМ рабочей концентрации), 0,8 мкл зонда (ZIKV 1107-FAM при 25 мкМ рабочей концентрации) и 0,8 мкл SSIII смеси ферментов. Пять мкл матричной РНК добавляли к мастер-микс, получая конечный реакционный объем 20 мкл. Используемые условия циклизации предусматривали 50°C в течение 10 мин, 95°C в течение 2 мин, с последующими 45 циклами 95°C в течение 10 с и 60°C в течение 40 с, плюс конечная стадия охлаждения 40°C в течение 30 с. Количественный анализ с использованием флуоресценции осуществляли после окончания каждой 60°C стадии. Реакции прогоняли и анализировали на платформе 7500 Fast (Life Technologies, UK) используя 7500 программное обеспечение, версия 2.0.6. Количественное определение вирусной нагрузки в образцах осуществляли, используя серийные разведения количественного РНК олигонуклеотида (Integrated DNA Technologies). Олигонуклеотид содержал 77 оснований ZIKV РНК, нацеленных для на этого анализа, на основании номера доступа GenBank AY632535.2 и был синтезирован в количестве 250 нмоль с ВЭЖХ очисткой.

Результаты представлены на фиг. 21, 22 и 23. ZKA190 и ZKA190-LALA проявили защиту мышей от смертности и заболеваемости при концентрациях 5, 1 или 0,2 мг/кг (фиг. 21A-B). ZKA190-LALA, и в меньшей степени ZKA190, замедляли заболеваемость и смертность по сравнению с контрольной группой в дозе 0,04 мг/кг. Титры вирусов в крови и органах существенно уменьшались по сравнению с лечеными животными, получавшими контрольное антитело, даже в присутствии уровней антитела в сыворотке ниже 1 мкг/мл (фиг. 22A-D).

Для оценки терапевтического потенциала ZKA190, мы вводили ZKA190 и ZKA190-LALA в различные моменты времени после ZIKV инфицирования. В дозе 15 мг/кг, достигали коэффициентов выживаемости 80-100%, и заболеваемость значительно уменьшилась даже при лечении четыре дня после инфицирования (фиг. 21E-G). Лечение с применением ZKA190 и ZKA190-LALA во все временные точки после инфицирования приводило к существенному уменьшению титров вируса, по сравнению с животными, лечеными контрольным антителом, с заметной тенденцией большего уменьшения при раннем лечении (фиг. 23A-21C). Следует отметить, что ZKA190-LALA показало существенное уменьшение антивирусной активности в образце крови на 5 день по сравнению с ZKA190, когда mAb вводили четыре дней после инфицирования, результат, который может быть связан с нарушенной способностью LALA варианта облегчать быстрый клиренс покрытых оболочкой вирионов.

Таблицы последовательностей и номеров SEQ ID

ZKA190	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	1	GFTFSKYG
CDRH2	2	ISYEGSNK
CDRH3	3	AKSGTQYYDTTGYEYRGLEYFGY
CDRL1	4	QSVSSSY
CDRL2	5	DAS
CDRL2 длинный	6	LIY DASSRA
CDRL3	7	QQYGRSRWT
VH	8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYEGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSG TQYYDTTGYEYRGLEYFGYWGQGLVTVSS
VL	9	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSYLAWYQQKRGQAPRLLIY DASSRATGIPDRFSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGRSRWTFG QG TKVEIK

CDRH1	10	ggattcaccttcagtaaatatggc
CDRH2	11	atatcatatgaggggaagtaataaa
CDRH3	12	gcgaaatcggggacccaatactatgatactactggttatgagtat aggggtttggaatactttggctac
CDRL1	13	cagagtgttagtagcagttac
CDRL2	14	gatgcatcc
CDRL2 длинный	15	ctcatctat gatgcatcc agcagggcc
CDRL3	16	cagcagtatggtaggtcaaggtggaca
VH	17	caggtgcagctgggtggagtctgggggaggcgtgggtccagcctggg aggtcacctgagactctcctgtgcagcctct ggattcaccttcagt aaatatggc atgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctg gagtgggtggcagtt atatcatatgaggggaagtaataaa tattat gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattcc aagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggac acggcagtgattactgt gcgaaatcggggacccaatactatgat actactggttatgagta taggggtttggaatactttggctactgg ggccagggaaaccctggtcaccgtctcctcag
VL	18	gaaattgtgttgacgcagctctccaggcaccctgtctttgtctcca ggggaaagagccaccctctcctgcagggccagt cagagtgttagt agcagttact tagcctggtagcagcagaaacgtggccaggctccc aggctcctcatctat gatgcatcc agcagggccactggcatccca gacaggttcagtggtggcagtggtctgggacagacttcactctcacc atcagcagactggagcctgaagatcttgcagtgattactgt cag cagtatggtaggtcaaggtggaca attcgccaagggaccaaggtg gaaatcaaac

ZKA185	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	19	GYSFTSYW
CDRH2	20	FDPSDSQT
CDRH3	21	ARRYCSSSSCYVDN
CDRL1	22	ALPNKF

CDRL2	23	EDN
CDRL2 длинный	24	VIYEDNKRK
CDRL3	25	YSTDSSSNPLGV
VH	26	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGY SFTSY WITWVRQMPGKGLEWMAK FDPSDSQT NYSPSFQGHVTISVDKSI STAYLQ WSSLKASDTAMYY CARRY CSSSSCYVDN WGQTLVTIF S
VL	27	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGD ALPNK FAYWYRQKSGQAPVLVIY ED NKRPSGI PERFSGSSSGT MATLTISGAQ VEADYH CYSTDSSSNPLGV F GGG TKLTVL

ZKA185	SEQ NO.	ID	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	28		ggata tagttttaccagttactgg
CDRH2	29		ttgatcctagtgactctcaaac
CDRH3	30		gcgagaagata ttgtagtagtagtagttgttatgtggacaat
CDRL1	31		gcattgccaataaattt
CDRL2	32		gaggacaac
CDRL2 длинны й	33		gtcatctat gaggacaac aaacgaccc
CDRL3	34		tactcaacagacagcagttctaataccccctgggagta
VH	35		gaagtgcagctggtgcagtcaggagcagaggtgaaaaagccccggg agtctctgaggatctcctgtaagggttct ggata tagttttaccag ttactggat caacctgggtgcgccagatgcccggaaggcctggag tggatggcgaagt ttgatcctagtgactctcaaac caactacagcc cgtcctccaaggccacgtcaccatctcagttgacaagtcacatcag cactgcctacttgacgtggagcagcctgaaggcctcggacaccgcc atgtattactgt gcgagaagata ttgtagtagtagtagttgttatg tggacaat tggggccaggaacccctggtcaccatcttctcag
VL	36		tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtgteccccaggac aaacggccaggatcacctgctctggagat gcattgccaataaatt tgcttattggt accggcagaagtcaggccaggccccctgttctggtc atctat gaggacaac aaacgaccctccgggatccctgagagattct ctggctccagctcaggacaatggccaccttgactatcagtggggc ccaggtggaggatgaagctgactaccactgt tactcaacagacagc agttctaataccccctgggagta ttcggcggagggaaccaagctgaccg

		tcctag
--	--	--------

ZKA230	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	37	GGSISSDY
CDRH2	38	IYYSGST
CDRH3	39	ARRRKYDSLWGSFAFDI
CDRL1	40	SSNIGGNY
CDRL2	41	IND
CDRL2 длинный	42	LIC IND HRP
CDRL3	43	ATWDDSLGGLV
VH	44	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSG GGSISSDY WSWIRQPPGKGLEWIGY IYYSGST NYNPSLKSRVTISVDTSKNHFSKLNLSVTAADTAVYYC ARRRK YDSLWGSFAFDI WGQGTMTVSS
VL	45	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSG SSNIGGNY VYWYQQLPGTAPKLLIC IND HRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC ATWDDSLGGLV FGGGTKLTVL

ZKA230	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	46	ggtggctccatcagtagtgactac
CDRH2	47	atctattacagtgaggacc
CDRH3	48	gcgaggaggaggaagtatgattccctttggggagttttgcttttg atatac
CDRL1	49	agctccaacatcggaggtaattat
CDRL2	50	attaatgat
CDRL2 длинны й	51	ctcatctgt attaatgat caccggccc

CDRL3	52	gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta
VH	53	cagggtgcagctgcaggagtccgggccaggcctgggtgaagccttcgg agaccctgtccctcacctgcgagctctct ggtggtccatcagtag tgactact ggagctggatccggcagccccagggaagggactggag tggattgggtatata tctattacagtgaggacc aaactacaaccct ccctcaagagtcgagtcaccatatacagtagacagctccaagaacca cttctccctgaagctgaactctgtgaccgctgcggaacggccgtg tattactgt gcgaggaggaggaagtatgattcccttgggggagtt ttgcttttgata tctggggccaagggacaatggtcacogtctcttc ag
VL	54	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggc agagggtcaccatctcttctgttctggaag cagctccaacatcggagg taattat gtatactggtaccagcagctcccaggaacggccccaaa ctcctcatctgt attaatgat caccggccctcaggggtccctgacc gattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcag tgggctccagtcgaggatgaggctgattactgt gcaacatgg gatgacagcctgggtggccttgta tctggcggagggaccaagctga ccgtcctag

ZKA78	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	55	GFTFSNYA
CDRH2	56	IGRNGDSI
CDRH3	57	VKDLAIPESYRIEADY
CDRL1	58	QSVLYRSNNKNY
CDRL2	59	WAS
CDRL2 длинный	60	LIYWASTRE
CDRL3	61	QQYYSSPRT
VH	62	EVQLAESGGGLVQPGGSLTLCSSGSG GFTFSNYAMVWARQAPGKLEYVSG IGRNGDSI YYTDSVKGRFTISRDNKSMVYLQMSLRTEDTAVYY CVKDL AIPESYRIEADY WGQGLVIVSA
VL	63	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYRSNNKNY LSWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGTDFTLTISPLQAEDVAVYYC QQYYSS PRTFGQGTKVEIK

--	--	--

ZKA78	SEQ ID NO.	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	64	ggcttcaacttttagtaactatgca
CDRH2	65	atcgggcgcaacggggactctatc
CDRH3	66	gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaagctgattat
CDRL1	67	cagtcctgtgtgtaccgctctaacaacaagaattac
CDRL2	68	tgggcttca
CDRL2 длинны й	69	ctgatctat tgggcttca acccgggaa
CDRL3	70	cagcagtaactattctagtcctcgaact
VH	71	gaggtgcagctggcagaatcagggcgggggactggtccagcctggcggcagcctgacactgtcttgcagtgatc aggcttcaacttttagtaactatgca atgggtgtgggcaaggcaggctcctgggaaggactggagtatgtctctggc atcgggcgcaacggggactctatct actatactgatagtgtgaagggcgggttccatcagcagagacaatagcaaatccatgggtgtacctgcagatgagctcctgcaaccgaagacacagcagtgactattg cg t gaaagatctggccatccccgagttacagaattgaagctgattat tggggacagggcaccctggtcatcgtgagcgccg
VL	72	gacatcgtgatgacacagtctccagatagtctggcagtcagtcctggggagagggccactattaactgcaagagctcc cagtcctgtgtgtac cgct ctaacaacaagaattac ctgtcttggtatcagcagaagcccgacagccccctaaactgctgatctat tgggcttca acccgggaaagcggcgtcccagacagattctcaggcagcgggtccggaacagacttcacctgacaattagccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactattgt cagcagtaactattctagtcctcgaact ttcggcaggggaccaaggtggaatcaaac

ZKA64	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	73	GYTFTGYH
CDRH2	74	INPNSGGT
CDRH3	75	ARMSSSIWGFHDH

CDRL1	76	QSVLIN
CDRL2	77	GAS
CDRL2 длинный	78	LIYGASSRA
CDRL3	79	QQYNDWPPIT
VH	80	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYH IDWVRQARGQGLEWMGRI NPNSGGT NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMQLSRLRSDDSAVYYC ARMSSS IWGF DHWGQGLVTVSS
VL	81	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVLIN LAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSR ATGIPAREFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNDWPPIT FGQG TRLEIK

ZKA64	SEQ NO.	ID	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	82		ggctacaccttcacagggatcac
CDRH2	83		attaaccctaattctggcgggacc
CDRH3	84		gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatcat
CDRL1	85		cagtctgtgctgattaac
CDRL2	86		ggagcatcc
CDRL2 длинны й	87		ctgatctat ggagcatcc ccagggct
CDRL3	88		cagcagtacaatgattggccccctatcaca
VH	89		caggtgcagctggtccagagcggagcagaggtgaagaacccggcg cctcagtgaaggtcagctgcaaagcttcc ggctacaccttcacagg gtatcac atcgactgggtgaggcaggcaagaggacagggactggaa tggatgggacgg attaaccctaattctggcgggacca actacgccc agaagtttcagggccgagtgactatgaccagagacaccagcatctc cacagcttatatgcagctgtccggctgagatctgacgatagtgcc gtctactattgt gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatc attggggcaggg aacactggtgactgtcagttcag
VL	90		gagatcgtgatgactcagctccagccaccctgtcagtcagcccag gagaacgggcaaccctgtcttgagagcctcc cagtctgtgctgat taac ctggcttggtaaccagcagaagccaggccaggcaaccgactg ctgatctat ggagcatcc ccagggctaccggcattcctgcacgct tcagtggatcaggaagcggaaacagagtttaccctgacaatctctag tctgcagtccgaagacttcgctgtctactattgt cagcagtacaat gattggccccctatcaca atttggccaggggactagactggagatca

		agc
--	--	-----

ZKA15	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	91		GGFINSYY
CDRH2	92		IYKSGST
CDRH3	93		ARDPYGDYVKAFDI
CDRL1	94		QSLLSNGYNY
CDRL2	95		LGS
CDRL2 длинны й	96		LIYLGSNRA
CDRL3	97		MQALQTVT
VH	98		QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGFINSYYWSWIRQPAKGLG WIGRIYKSGSTNYNPSLKSRTMSLDTSKYQFSLKLRSVTAADTAV YYCARDPYGDYVKAFDIWGQGTMTVSS
VL	99		DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSNGYNYLNWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVPDFRSGSGSDFTLKI SRVEAEDVGVYY CMQALQTVT FGGTKVDIK

ZKA15	SEQ NO.	ID	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	100		ggtggcttcatcaatagttactac
CDRH2	101		atctataaaagtgaggacc
CDRH3	102		gcgagagatccctacgggtgactacgттаaggctttgatatt
CDRL1	103		cagagcctcctgcatagtaaaggatacaactat
CDRL2	104		ttgggttct
CDRL2 длинны й	105		ctgatctatttgggttctaactgggcc
CDRL3	106		atgcaagctctacaactgtcact

VH	107	caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcgg agaccctgtccctcacctgcactgtctcc ggtggcttcaatcaatag ttactact ggagctggatccggcagcccgcgggaagggaactggag tggattgggcgtatctataaa agtgggagcacc aactacaaccct ccctcaagagtcgagtcaccatgtcactagacacgtccaagtacca gttctccctgaagctgaggtctgtgaccgcgctgacacggccgtg tattactgt gcgagagatccctacggtgactacgttaaggcttttg atatt ggggccaagggaacaatggtcaccgtctcttcag
VL	108	gatattgtgatgactcagtcctccactctccctgcccgtcaccctcg gagagccggcctccatctctctgcaggtctagt cagagcctcctgca tagtaatggatacaactatt tgaattggtacctgcagaagccaggg cagtcctccacagctcctgatctat ttgggttcta atcgggcctccg gggtccctgacaggttcagtggcagtgatcaggcacagattttac actgaaaatcagcagagtgaggctgaggatgttggggtttattac tgc atgcaagctctaca aact gtcactt tcggccctgggaccaaag tggatatcaaac

ZKA25	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	109		GFTFRSHW
CDRH2	110		IKEDGYEK
CDRH3	111		ARDLRVYSGRGFDP
CDRL1	112		KLGDKY
CDRL2	113		QDS
CDRL2 длины й	114		VII QDS KRP
CDRL3	115		QAWDSSTVV
VH	116		EVQLVESGGGLVFRPGGSLRSLSCAAS GFTFRSHW MSWVRQAPGKGLE WVAN IKEDGYEK YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMKSLRAEDTA VYYC ARDLRVYSGRGFDP WGQTLVTVSS
VL	117		SYELTQPPSLSVSPGQTASITCSGD KLGDKY ACWYQQKPGQSPVLV IY QDS KRPSGIPARFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDS STVVF GGGTKLTVL

ZKA25	SEQ NO.	ID	Последовательность нуклеиновых кислот
-------	---------	----	---------------------------------------

CDRH1	118	ggattcacctttagaagtcattgg
CDRH2	119	ataaaggaagatggatatgagaaa
CDRH3	120	gcgagagatttgagggtatatagtgggagaggtttcgacccc
CDRL1	121	aaattgggggataaataat
CDRL2	122	caagatagc
CDRL2 длины й	123	gtcatctat caagatagc aagcggccc
CDRL3	124	caggcgtgggacagcagcactgtggta
VH	125	gagggtgcagttggtggagtctgggggaggcttggtcggcctgggg ggtccttgagactctcctgtgcagcctct ggattcacctttagaag tcattgg atgagttgggtccgccaggctccagggaaagggctggag tgggtggccaaca ataaaggaagatggatatgagaaa actatgtgg actctgtgaaggccgattcacatctccagagacaacgccaagaa ctcactgtatctgcaaatgaagagcctgagagccgaggacacggcc gtgtattactgt gcgagagatttgagggtatatagtgggagaggtt tcgacccc tggggccagggaaacctgggtcacctctcctcag
VL	126	tcctatgagctgactcagccacctcactgtccgtgtcccaggac agacagccagcatcacctgctctggagat aaattgggggataaata tgctt gctgggtatcagcagaagccaggccagtcccctgtgttggtc atctat caagatagc aagcggccctcagggatcccctgcgcgattct ctggctccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggac ccaggctatggatgaggctgactattactgt caggcgtgggacagc agcactgtggta ttcgggtggagggaaccaagctgacctcctag

ZKA35	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	127		GGSI<u>S</u>TGGYY
CDRH2	128		IYYS<u>G</u>NT
CDRH3	129		AKGGGR<u>E</u>RPFDY
CDRL1	130		SSNI<u>G</u>RNY
CDRL2	131		RNN
CDRL2 длины й	132		LIYRNNQRP
CDRL3	133		VAWDD<u>S</u>RSGFVV

VH	134	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIS TGGY WSWIRQHPGKG LEWIGY IYYS GN T YYNPSLKSRTVISVDT SKQ FSLKLSVTAADT AVYYC AKGGGRERPF DYWGQGLVTVSS
VL	135	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSS SNIGR NYVDWYQQLPGTAPK LLIY RNN QRPSGVP ER FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC VAW DDSRSGFV VFGGGTK V TVL

ZKA35	SEQ NO.	ID	Последовательность нуклеиновых кислот
CDRH1	136		gg tggtccatcagcact gg tggtactac
CDRH2	137		at ctattacag tg ggaacacc
CDRH3	138		gc gaaaggaggaggaggagcgacccttgactac
CDRL1	139		ag ctccaacatcggaagaaattat
CDRL2	140		ag gaataat
CDRL2 длинны й	141		ctcatctat ag gaataatcagcggccc
CDRL3	142		g tagcatgggatgacagccggag tg ggttt g tggt a
VH	143		caggtgcagctgcaggagtcgggccaggactggtgaagccttcac agacctgtccctcacctgcaactgtctct gg tggtccatcagcac tg gtggttactactggagctggatccgccagcaccagggaagggc ctggagtggttaca ct ctattacag tg ggaacacctactaca acctctcaagagtcgagttaccatatcagttgacacctctaa gaagcagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgggacacg gccgtgtattactgt gc gaaaggaggaggaggagcgaccct tg act actggggccagggaacctggtcaccgtctcctcag
VL	144		cagtcctgtgctgactcagccacctcagcgtctgggacccccgggc agagggtcaccatctcttgtctggaagc ag ctccaacatcggaag aa attatgtagactggtaccagcaactcccaggaacggccccaaa ctcctcatctat ag gaataatcagcggccctcaggggtccctgagc gattctctggtccaagtctggcacctcagcctccctggccatcag tgggctccgggtccgaggatgaggctgattactgt g tagcat gg gat gacagccggag tg ggttt g tggt a ttcggcggagggaaccaagg tgaccgtcctag

Константные	SEQ ID	Последовательность
-------------	--------	--------------------

участки	NO.	
IgG1 CH1-CH2-CH3 ак	145	ASTKGFPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEPKSCKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA ак	146	ASTKGFPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEPKSCKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG CK ак	147	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
IgG CL ак	148	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSQRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
IgG1 CH1-CH2-CH3 нукл	149	gcgctcgaccaaggcccatcggtcttccccctggcaccctcc tccaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgctg gtcaaggactacttccccgaacctgtgacggtctcgtggaac tcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccgctgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc gtgccctccagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaac gtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgc ccagcaactgaactcctgggggaccgtcagtccttctcttc cccccaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaacct gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaAgaCct gaggtcaagttcaactggtacgtggcggcgtggaggtgcat aatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg ctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagcc ctcccagccccatcgagaaaacctctccaagccaaaggg cagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccg

		<p>gaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggtc aaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtg ctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcacc gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaag agcctctccctgtccccgggtaaa</p>
IgG1 CH1-CH2- CH3 LALA нукл	150	<p>gcgtcgaccaagggcccatcggcttccccctggcacccctcc tccaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgcctg gtcaaggactacttccccgaacctgtgacgggtctcgtggaac tcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtc ctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc gtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaac gtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt gagcccaaactctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgc ccagcacctgaaGCCGCGgggggaccgtcagtcttctctctt ccccaaaaccacaaggacacctcatgatctcccggaccct gaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccct gaggtaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcat aatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg tacgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactgg ctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagcc ctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg cagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccg gaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggtc aaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtg ctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcacc gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaag agcctctccctgtccccgggtaaa</p>
IgG СК нукл	151	<p>cgTAcGgtggctgcaccatctgtcttcatcttccccccatct gatgagcagttgaaatctggaactgcctctggtgtgtgcctg ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaag gtggataacgcccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctc acagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagc accctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtct tacgctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtc acaaagagcttcaacaggggagagtgct</p>
IgG CL нукл	152	<p>ggtcagcccaaggctgccccctcggctcactctgttcccggcc tcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgt</p>

		ctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggttg aaagcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgagaccacc acaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcgccagcagc tatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagc tacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaag acagtgggcccctacagaatgttca
--	--	--

ZKA10	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	153		GFTFSDSY
CDRH2	154		ISSSPFT
CDRH3	155		ARGLVRDGYKWLFFDY
VH	156		QVQLVESGGGLVEPRGSLRSLSCAAS GFTFSDSY MSWIRQAPGKGLE WISY ISSSPFT NYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYC ARGLVRDGYKWLFFDY WGQGLTVTVSS
ZKA18	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	157		GFTFSSYG
CDRH2	158		IWYDGSNK
CDRH3	159		ARDDSGYSEPFDY
VH	160		QVQLVESGGGVVQPRGSLRSLSCAAS GFTFSSYG MHWVRQAPGKGLE WVAV IWYDGSNK YYADSVKGRFTITRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYC ARDDSGYSEPFDY WGQGLTVTVSS
ZKA28	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	161		GFTVSRNY
CDRH2	162		IYSGGST
CDRH3	163		ARWINDAFDI
VH	164		EVQLVESGGGLIQPGGSLRSLSCAAS GFTVSRNY MSWVRQAPGKGLE WVSV IYSGGST YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYC ARWINDAFDI WGQGMVTVSS
ZKA29	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	165		GFTFSRYS
CDRH2	166		ISPRSTTI
CDRH3	167		ARECTNGVCYRVDY
VH	168		EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVVS GFTFSRYS MNWRQAPGKGLE WVSY ISPRSTTI YYADSVKGRFTVSRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYC ARECTNGVCYRVDY WGQGLTVTVSS

ZKA33	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	169		GFTFSRNW
CDRH2	170		IKEDGNEK
CDRH3	171		ARPFHQGGYAYGLAY
VH	172		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRNW MTWVRQAPGKGLE WVAN IKEDGNEK YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTA VYYC ARPFHQGGYAYGLAY WGQGT LVTVSS
ZKA39	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	173		GFTFSTYS
CDRH2	174		ISPSSSTI
CDRH3	175		AREYCSGGSCYLLDY
VH	176		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYS MN WVRQAPGKGLE WVSY ISPSSSTI YYPDSLKGRFTISRDNAKNSLYLQMD SLRAEDTA QYYC AREYCSGGSCYLLDY WGQGT LVTVSS
ZKA43	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	177		GGSITSYY
CDRH2	178		SHYSGST
CDRH3	179		ARGIYSGKNWFD
VH	180		QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVY GGSITSYY WTWIRQPPGKGLE WIGY SHYSGST NYNPSLKS RVTISIDTSKSKQ FSLNLSVTAADTAV YYC ARGIYSGKNWFD WGQGT LVTVSS
ZKA44	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	181		GFTVSTSY
CDRH2	182		IYSSGST
CDRH3	183		ARVSLGGLDP
VH	184		EVQLVESGGGLIQGGSLRLSCVAS GFTVSTSY MN WVRQAPGKGLE WVSV IYSSGST YYADSVKGRFTISRNTSKNTLYLQMN SLRAEDTAV YYC ARVSLGGLDP WGQGT PVTVSS
ZKA46	SEQ NO.	ID	Аминокислотная последовательность
CDRH1	185		GFSLSNGRMG
CDRH2	186		IFSNDEK
CDRH3	187		ARVEFRAGNYLDS
VH	188		QVTLKESGPVLVKP TETLTLTCTVSGFSLSNGRMG VSWIRQPPGKA LEWLAH IFSNDEK YYSTSLKNRLTISKDT SKSQVVL TMTNMDPVDT

			ATYYCARVEFRAGNYLDSWGQGLVTVSS
ZKA50	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	189		GYTFTNSW
CDRH2	190		IYPGSDT
CDRH3	191		ARQPFDDY
VH	192		EVQLVQSGAQVKKPGESLKI SCKAS GYTFTNSW IGWVRQMPGKGLE WMGI IYPGSDT RYSPSFQGVVTSADKSI STAYLQWSSLKASDTA MYYC ARQPFDDY WGQGLVTVSS
ZKA54	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	193		GYTFTGYY
CDRH2	194		INANSGET
CDRH3	195		AHSDIVVPSDDYALDV
VH	196		QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTS GYTFTGYY MHWVRQAPGQGLE WMGW INANSGET NFAQRFQGRVTMTWDTSI STAYMELSRRLSDDTA VYYC AHSDIVVPSDDYALDV WGQGLVTVSS
ZKB18	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	197		GYSFTSYW
CDRH2	198		IYPGSDT
CDRH3	199		ARQTPGDY
VH	200		EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKTF GYSFTSYW IGWVRQMPGKGLE WMGM IYPGSDT RYSPSFQGVVTSADMSI STAYLQWSSLKASDTA MYYC ARQTPGDY WGQGLVTVSS
ZKB20	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	201		GYFFTRYV
CDRH2	202		INTDNGST
CDRH3	203		ARGTGRDGYNFFAN
VH	204		QVQLVQSGAEVKKPGASVRV SCKAS GYFFTRYV ILWVRQAPGQRPE WMGW INTDNGST RYSQKFQGRVTITKDT SATTAYMDLSSLKSDTA VYYC ARGTGRDGYNFFAN WGQGLVTVSP
ZKB21	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	205		GYTFTGYS
CDRH2	206		IDTNSGDT
CDRH3	207		ARDREHFFSY
VH	208		QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKAS GYTFTGYS IHWVRQAPGQGLA WMGR IDTNSGDT NYAERFQGRVTMTDRDTSI STAYMEVRLSDDTA

		VYYC ARDRERHPFSYWGQGLVTVSS
ZKB23	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	209	GGSISSGDYS
CDRH2	210	ITHSGTT
CDRH3	211	ARHFGWFD
VH	212	QLQLQESGSGLVKPSQTL SLTCAV SGSISSGDYS WSWIRQPPGKG LEWIGY ITHSGTT YFNPSLKS RVTI SVDRSRNQFSLKVT SVTAADT AVYYC ARHFGWFD WGQGLVTVSS
ZKC29	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	213	GGSISSGEYF
CDRH2	214	IHNRGNT
CDRH3	215	ARGGDLVVVPDSIWDYYGMDV
VH	216	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTV SGSISSGEYF WTWIRQHPKKG LEWIGY IHNRGNT YYNPSLKSRLSISLDT SKNHL SLRLSSVTAADT AVYYC ARGGDLVVVPDSIWDYYGMDV WGQGLVTVSS
ZKC31	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	217	GGSISSGGYH
CDRH2	218	IYSGST
CDRH3	219	ARDRSEPGYHYYYAMDV
VH	220	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTV SGSISSGGYH WSWIRQHPKKG LEWIGY IYSGST YYNPSLKR RVTI SVDT SKNQF SLKLSVSAADT AVYYC ARDRSEPGYHYYYAMDV WGQGLVTVSS
ZKC32	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	221	GFTVSSNY
CDRH2	222	IYSGST
CDRH3	223	ARGKKNAFDI
VH	224	EVQLVESGGDLIQPGGSLRLS CAASGFTVSSNY MSWVRQAPGKGL WVSV IYSGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MSLRA GD TAV YYC ARGKKNAFDI WGQGLVTVSS
ZKC33	SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
CDRH1	225	GDSISSRTFS
CDRH2	226	IYSGST
CDRH3	227	ARRNAEFFSFWSYYGMDV
VH	228	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTV SGSISSRTFS WSWIRQPPGKG

			LEWVGHIIYSGSTDYNPSLKSRIISIDTSKNQFSLKLSVTAADT AVYYCARRNAEFFSFWSYIGMDVWGHGTAVIVSS
ZKC34	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	229		GGSINSGGY
CDRH2	230		ILHSGNT
CDRH3	231		ARAGDYSGYVPEY
VH	232		QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCAVSGGSINSGGYWSWVRQHPGKG LEWIGYILHSGNTNYPNPSLKS RVNIFVDTS ENQFSLKLSVTAADT AIYFCARAGDYSGYVPEYWGPGTLTVSS
ZKD25	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	233		GFTVSSNY
CDRH2	234		IYSGGST
CDRH3	235		ARFGGNPSFDY
VH	236		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLE WVSVIYSGGSTYYANSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNLR AEDTAV YFCARFGGNPSFDYWGQGT LTVSS

ZKA3	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	237		GFIFSNYA
CDRH2	238		IGGKDSI
CDRH3	239		VKDLAVLESDRLEVDQ
VH	240		EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCSGSGFIFSNYAMVWARQAPGKGLE YVSGIGGKDSIYHIDSVKGRFTISRDN SKRTVYLQMSRLRTEDTA VYYCVKDLAVLESDRLEVDQWGQGT LVI VSA
ZKA4	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	241		GFTFSSYV
CDRH2	242		TSYDGSNK
CDRH3	243		ARGPVPYWSGESYSGAYFDF
VH	244		QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLE WVTVTSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLRGEDTA IYYCARGPVPYWSGESYSGAYFDFWGGG I LTVSS
ZKA5	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	245		GFTFSNYY
CDRH2	246		MSSSETIK

CDRH3	247		ARSGIETVAGSIDYYGMDV
VH	248		QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGS GFTFSNY MTWIRQAPGKGLE LVSY MSSSETIK YYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRADDTA RYYC ARSGIETVAGSIDYYGMDV WGHGTPVTVSS
ZKA6	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	249		DFTVSNYA
CDRH2	250		VSYDGSNK
CDRH3	251		ATGVTMFQGAQTNAEYLHY
VH	252		QVHLVESGGGVVQPGSLRLSCEAS DFTVSNYA MHWVRQAPGKGLE WVAV VSYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA LYYCAT GVTMFQGAQTNAEYLHY WGQGS LVTISS
ZKA7	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	253		GFTFSRYG
CDRH2	254		VSGDGSST
CDRH3	255		VKDFWSGDQSLESDF
VH	256		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS GFTFSRYG MVWARQAPGKGLE YLS GVSGDGSST YYANSVKGRFTISRDNKNTLYLHMSRLRDEDTA MYYC VKDFWSGDQSLESDF WGQALVTVSS
ZKA8	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	257		GFTFSAHA
CDRH2	258		ISRNEYT
CDRH3	259		VKDFGTSPQTFD
VH	260		DERLVESGGGLVQPGGSLRLVCSAS GFTFSAHA MHWVRQPPGKGLE YVST ISRNEYT YYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMRRLRPEDTA IYYC VKDFGTSPQTFD FWGQGLVAVSS
ZKA76	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	261		GFTFSTYF
CDRH2	262		ISSTGSYK
CDRH3	263		ARPFHSEYTYGLDAFDI
VH	264		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYF MHWVRQAPGKGLE WVAS ISSTGSYK FYADSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNSLRAEDTA VFYCAR PFHSEYTYGLDAFDI WGQGTMLTVSS
ZKA117	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	265		GGSI RRTNSY
CDRH2	266		ISYSGST

CDRH3	267		ARLNDGSTVTTSSYFDY
VH	268		QLQLQESGPGGLVKKPSETLSLTCTVSGGSIRRTNSYWGWRQTTGKG LQWIGSISYSGSTFYNPSLKSRTISLDTSKDHFSLELSSVTAADT AIYYCARLNDGSTVTTSSYFDYWGQGLTVTVSS
ZKB27	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	269		GYSFTSSW
CDRH2	270		IDPDSYF
CDRH3	271		ARHDYSVSENGMDV
VH	272		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSSWINWVRQMPGKGLE WMGRIDPDSYFTYNSPFQGHVTISVDKSI GTAYLQWNSLRASDTA MYYCARHDYSVSENGMDVWGQGLTVTVSS
ZKB29	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	273		GFTFSSYF
CDRH2	274		ISYDGSFK
CDRH3	275		ARRSYSISCFDY
VH	276		QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSFKFYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQMNSLRAEDTA LYYCARRSYSISCFDYWGQGLTVTVSS
ZKB34	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	277		GFTFSRSG
CDRH2	278		VSYDGSNK
CDRH3	279		AKDLTMVRGVHYYYYVMDV
VH	280		QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSRSGMHWVRQAPGKGLE WVAVVSYDGSNKYYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTA VYYCAKDLTMVRGVHYYYYVMDVWGQGLTVTVSS
ZKB39	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	281		GYTFDDYF
CDRH2	282		INPHRGGT
CDRH3	283		VRDQYCDGGNCYGIHQPHYGMDV
VH	284		QVQLVQSGAEVKKPGASLKVSCKASGYTFDDYFIHWVRQAPGQGLE WLGRINPHRGGTNYAQKFQGRVIMTLDM S I STTYMELRRITSDDA VYYCVRDQYCDGGNCYGIHQPHYGMDVWGQGLTVTVSS
ZKB46	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	285		GYSFTSYW
CDRH2	286		IDPDSYF

CDRH3	287		ARREYSSSSGQEDWFDP
VH	288		EVQLVQSGAEVKKPAGESLRISCKGSG YSF TSYWISWVRQMPGKGLE WMGRID PSDSY TNYSPSFQGHVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTA MYYC ARREYSSSSGQEDWFDP WGQGLTLTVSS
ZKB53	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	289		GFTFSSYA
CDRH2	290		ISYDGSNR
CDRH3	291		ARHVEQLPSSGYFQH
VH	292		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYA MHWVRQTPGKGLE WVT VI SYDGSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLR SEDTA VYYC ARHVEQLPSSGYFQH WGQGLTLTVSS
ZKC26	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	293		GFIFSDFY
CDRH2	294		IGHDGSYI
CDRH3	295		ARAHGGFRH
VH	296		QVQVVESSGGGLVLPKGGSLRLSCAAS GFIFSDFY MSWVRQAPGKGLE WVAV I GH DGSYI LYADSVKGRFTISRDN AKNSL FLRMNSLRVEDTA VYYC ARAHGGFRH WGQGLTVVAVSP
ZKD5	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	297		GFTFTSYG
CDRH2	298		ISYDGSNK
CDRH3	299		ARDRDHYDLWNAYTFDY
VH	300		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFTSYG MHWVRQTPGKGLD WVAV I SYDGSN KY ADSVKGRFTISRDN SKDTL YLQMN SLRA ADTA LYYC ARDRDHYDLWNAYTFDY WGQGLTLTVSS
ZKD7	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	301		GFTFSNYA
CDRH2	302		ISYDVSDK
CDRH3	303		AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH
VH	304		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSNYA MHWVRQAPGKGLE WVAV I SYDV SDKY ADSVKGRFTISRDN SKNTL FLQMN SLRA EDTA AYYC AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH WGQGLTLTVSS
ZKD8	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	305		GFTFINYA
CDRH2	306		ISYDGSNK

CDRH3	307		ATDADAYGDSGANFHY
VH	308		QVQLVESGGGVVQPGKSLRSLCAAS GFTFINYAI HWVRQAPGKGLE WVAVI SYDGSNKF YTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRADDTA VYYC ATDADAYGDSGANFHY WGQGLTVTVSS
ZKD15	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	309		DASISSGGFS
CDRH2	310		IYSSGDT
CDRH3	311		ARAHTPTSKFYYYAMDV
VH	312		QLQLQESGSLVKPSQTLSTCTVSD ASISSGGFS WSWIRQPLGKG LEWLG YIYSSGDT FYNPSLQGRVTMSVDIFRSQFSLKLTSVTAADT AMYYC ARAHTPTSKFYYYAMDV WGQGLTVTVSS
ZKD16	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	313		GFTFSDHF
CDRH2	314		SRNKPNSYTT
CDRH3	315		AKVGGCYGGDCHVENDY
VH	316		EVQLVESGGDLVQPGGSLRSLSCVAS GFTFSDHF MDWVRQAPGKGLE WVGR SRNKPNSYTT EYAASVKGRFISRDSSKALYLQMNLSLQTED TAVYYC AKVGGCYGGDCHVENDY WGQGLTVTVSS
ZKD17	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	317		GFIFSDYA
CDRH2	318		ISYDGSSR
CDRH3	319		ARGYCSSGTCFSTNAEYFHP
VH	320		QVQMVESGGGVVQPGTSLRSLSCATS GFIFSDYAM HWVRQAPGKGLE WVAVI SYDGSSRLYAD SVKGRFTVSRDNKNTLYLQMHSLRAGDTA VYYC ARGYCSSGTCFSTNAEYFHP WGQGLTATISS
ZKD20	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	321		GFTFSDHF
CDRH2	322		SRNKPNSYTT
CDRH3	323		ARVGGCNGGDCHVENDY
VH	324		EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVAS GFTFSDHF MDWVRQAPGKGLE WVGR SRNKPNSYTT EYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLQTED TAVYYC ARVGGCNGGDCHVENDY WGQGLTVTVSS
ZKA134	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	325		GGTFSAYA
CDRH2	326		IIPFFGTA

CDRH3	327		ARSDIVSTTRGYHHYGMDV
VH	328		QVHLVQSGAEVKKPGSSVNVSCAS GGTFSAYAI SWVRQAPGQGLE WMGGI IIPFFGTA YYAQKFKGRVTVTADKSTSTVYMEMTSLRSEDTA VYYC ARSDIVSTTRGYHHYGMDV WGQGTTVTVSS
ZKA246	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	329		GYTFSDY
CDRH2	330		INPYSGGT
CDRH3	331		ARGFTMISDREFDP
VH	332		QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCAS GYTFSDY MHWVRQAPGQGLE WMGR INPYSGGT NYAQKFKGRVTVTRDTSISTVYMELRGLRSDDTA VYYC ARGFTMISDREFDP WGQGTTLTVTVSS
ZKA256	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	333		GFTFSTYW
CDRH2	334		IKQDGSEK
CDRH3	335		ARDPGYDDFWSGSYSGSFDI
VH	336		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTY WMTWVRQAPGKGLE WVAN IKQDGSEK YYVDSVKGRFTISRDN T KNSLYLQVNSLRAEDTA IYYC ARDPGYDDFWSGSYSGSFDI WGQGTMTVTVSS
ZKB42	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	337		GFTFNNYG
CDRH2	338		ISYDGNKK
CDRH3	339		VKYGERINGYSDPFDH
VH	340		QVQVVEGGGVVQ PGRSLR LFC AA S GFTFN NYGMHWVRQAPGKGLE WVAL ISYDGNKK YYADSVKGRFSISRDN S KNTLYLQMNRLRSGDTA VYHC VKYGERINGYSDPFDH WGQGTTLTVTVSS
ZKB85	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	341		GYTFTTYA
CDRH2	342		INTNTGNP
CDRH3	343		ARVIVPYAFDI
VH	344		QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCAS GYTFTTY AMNHWVRQAPGQGPE WVGW INTNTGNP TYAQGFTGRFVLSLDTSVSTAF LQ ISSLKAEDTA VYYC ARVIVPYAFDI WGQGTMTVTVSS
ZKB47	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	345		GYTFTNYY
CDRH2	346		INPSGGPT

CDRH3	347		ARDQYGGYARYGMDV
VH	348		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS GYTFTNYY MHWVRQAPGQGLE WMGI INPSSGGPT SYAQKFQGRVTMTTDTSTSTVYME LS SLRSEDTA VYYC ARDQYGGYARYGMDV WGQGT TVTVSS
ZKC6	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	349		GYTFTGY
CDRH2	350		INPSSGGT
CDRH3	351		ARVSDWGFAFDI
VH	352		QVQLVQSGTEVKKPGASVKVSC KASGYTFTGY MHWVRQAPGQGLE WMGR INPSSGGT NYAQKFQGRVTMRDTSI STAY MEL S GLRSDDTA VYYC ARVSDWGFAFDI WGQGT MVTVSQ
ZKA160	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	353		GGSITSYS
CDRH2	354		IFYSGST
CDRH3	355		ARDQTMPVWVGMDV
VH	356		QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTV SGSITSYS SWSWIRQPPGKGLE WIGY IFYSGST DY NPSL KSRVTISVDTSK DQF SLR LR SVTAADTAV YYC ARDQTMPVWVGMDV WGQGT TVTVSS
ZKA172	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	357		GYIFTRYW
CDRH2	358		IDPSDSYT
CDRH3	359		ARQETAREDGMAV
VH	360		EVQLVQSGAEVKKPGKSLRISCKG SGYIFTRYW ISWVRQMPGKGLE WMGR IDPSDSYT NYS PSFQ GHVTISADKSI STAY LQW SSL KASDTA MYYC ARQETAREDGMAV WGQGT TVTVSS
ZKA174	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	361		GGSMSNSYH
CDRH2	362		IYSGST
CDRH3	363		ARNPVFNPLTLTHDAFDI
VH	364		QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTV SGSMSNSYH HGWIRQPPGKGL LEWIGSI Y SG ST YYN PSL KSRVTISVDTSK NQF SLK LN SVTAADT AVYYC ARNPVFNPLTLTHDAFDI WGQGT MVTVSS
ZKA189	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	365		GFTFSSYA
CDRH2	366		ISGSDNT

CDRH3	367		AKWPYYDFWSGSESYFDP
VH	368		GVQLLESGGALVQPGKSLRLSCAAS GFTFSSY ALTWVRQAPGKGLQ WVSAI SGSGDNT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCA KWPYYDFWSGSESYFDP WGQGLTVTVSS
ZKA195	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	369		GYNFPSYW
CDRH2	370		IDPDSY
CDRH3	371		ARADCRSTSCYLVFE
VH	372		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKDS GYNFPSY WIHWVRQMPGKGLE WMGT IDPDSY TNYSFQGHVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTA MYYCA RADCRSTSCYLVFE GGQGLTVTVSS
ZKA215	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	373		GYTFTSYW
CDRH2	374		IDPDSHT
CDRH3	375		ARHALPNYFDS
VH	376		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS GYTFTSY WISWVRQMPGKGLE WMGR IDPDSHT DYSFQGHVTISADKSI SAAYLQWSSLKASDTA MYYCA RHALPNYFDS WGQGLTVTVSS
ZKA218	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	377		GFPFSSYW
CDRH2	378		INSDGRNT
CDRH3	379		ARGGYDYDSSGCFDY
VH	380		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFPFSSY WMHWVRQAPGKGLV WVSR INSDGRNT NYADSVKGRFTISRDNENTVYLYLQMNSLRAEDTA VYYCA ARGGYDYDSSGCFDY WGQGLTVTVSS
ZKB75	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	381		GFTFSNYA
CDRH2	382		ISGTGGST
CDRH3	383		AKDSASRGGYCSGGVCYLNPGHHDY
VH	384		EVQVLESGGGLLQPGGSLRLSCAAS GFTFSNY AMSWVRQAPGKGLE WVST ISGTGGST YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCA KDSASRGGYCSGGVCYLNPGHHDY WGQGLTVTVSS
ZKB83	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		

CDRH1	385		GYSFTNYW
CDRH2	386		IDPDSYI
CDRH3	387		ARLRGSLYCSGGRCYSVPGETPNWFDP
VH	388		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSG YYSFTNYW ITWVRQMPGKGLE WMGS IDPDSYI NYSPSFQGHVTISADWSINTAYLQWSSLKASDTA KYYC ARLRGSLYCSGGRCYSVPGETPNWFDP WGQGTTLVTVSS
ZKC3	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	389		GGSIISYI
CDRH2	390		IYISGSI
CDRH3	391		ARVGGAPYYYYGMDV
VH	392		QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSG GGSIISYI WSWIRQPPGKGLE WIGY IYISGSI NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV YYC ARVGGAPYYYYGMDV WGQGTTLVTVSS
ZKC18	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	393		GFTFGDYA
CDRH2	394		IRSKAYGTT
CDRH3	395		SRDHTGTTAFDI
VH	396		EVQLVESGGGLVQPGFSLRSLSC TASGFTFGDYA MSWFRQAPGKGLE WVGF IRSKAYGTT EYAAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNLSKTED TAVYYC SRDHTGTTAFDI WGQGTMTVTVSQ
ZKD1	SEQ	ID	Аминокислотная последовательность
	NO.		
CDRH1	397		GFTFSSYG
CDRH2	398		IWYDGSNK
CDRH3	399		ARDRRGYGDYVGYYYGMDV
VH	400		QVQLVESGGGVVQPGFSLRSLSC AASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLE WVA VIWYDGSNK YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTA VYYC ARDRRGYGDYVGYYYGMDV WGQGTTLVTVSS

Название	SEQ ID	Аминокислотная последовательность
	NO.	
ZIKV EDIII родовой	401	TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEXQYXGXDGPCKXFXQMAVDXQTLT PVGRLITANPVITEXTENSKMMELELDPPFGDSYIVIGXGKKITH HWHS
ZIKV H/PF/2013 EDIII	402	TAAFTFTKI PAETLHGTVTVVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLT PVGRLITANPVITESTENSKMMELELDPPFGDSYIVIGVGEKKITH HWHS

ZIKV-NS1 прямой праймер	403	TGGAGTTCAACTGACGGTCTG
ZIKV-NS1- обратный праймер	404	TACCCCGAACCCATGATCCT
Gardh- прямой праймер	405	GGCAAGTTCAAAGGCACAGTC
Gardh- обратный праймер	406	CACCAGCATCACCCATTT
ZIKV EDIII родовой	407	<p>X₁GX₂X₃YSLCTAAFTFTKX₄PAEX₅X₆HGTVTVE₇QYX₈GX₉DGFC KX₁₀PX₁₁QMAVDX₁₂QTLTPVGLITANPVITEX₁₃TX₁₄NSKMMLEL DPPFGDSYIVIGX₁₅GX₁₆X₁₇KITHHWHRSG</p> <p>где</p> <p>X₁ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно K, A, или E;</p> <p>X₂ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно V, F, или L;</p> <p>X₃ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно S или F;</p> <p>X₄ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно I или V;</p> <p>X₅ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно T или V;</p> <p>X₆ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно L или D;</p> <p>X₇ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно V или G;</p> <p>X₈ может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно или G;</p> <p>X₉ может представлять собой любую</p>

		(встречающуюся в природе) аминокислоту, за исключением R, предпочтительно T или A;
	X10	может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно V или I;
	X11	может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно или V;
	X12	может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно M или T;
	X13	может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно S или G;
	X14	может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно E или K;
	X15	может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно V или I;
	X16	может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно E, A, K, или D; и
	X17	может представлять собой любую (встречающуюся в природе) аминокислоту, предпочтительно E, A, или K, более предпочтительно K или A

* последовательности, выделенные жирным шрифтом, представляют собой CDR участки (нуклеотидные или ак) и подчеркнутые остатки представляют собой мутированные остатки, по сравнению с последовательностью "зародышевой линии"

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который специфически связывается с эпитопом вируса Зика и нейтрализует инфекцию, вызванную вирусом Зика, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 (i) в соответствии с SEQ ID NO: 1-5 и 7 или (ii) в соответствии с SEQ ID: 1-4 и 6-7.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по существу, не связывается с вирусоподобными частицами денге и/или с белком оболочки вируса денге.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не способствует антителозависимому усилению инфекции, вызываемой вирусом Зика.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело человека.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является IgG типа.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc -фрагмент.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию в Fc фрагменте, указанная мутация уменьшает связывание антитела с Fc рецептором.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7 или 8, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит CH2 L4A мутацию, CH2 L5A мутацию или обе.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом III белка оболочки вируса Зика.
11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.10, где домен III белка оболочки вируса Зика содержит или состоит из аминокислотной последовательности, как указано в SEQ NO: 401 или 407.
12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, где домен III белка оболочки вируса Зика содержит или состоит из аминокислотной последовательности, как указано в SEQ NO: 402.
13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом белка оболочки вируса Зика, который включает один или несколько аминокислотных остатков латерального гребня (LR) в EDIII и/или один или несколько аминокислотных остатков EDI-EDIII шарнирной области.
14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, отличающиеся тем, что эпитоп белка оболочки вируса Зика включает один или несколько аминокислотных остатков латерального гребня (LR) в EDIII и один или несколько аминокислотных остатков EDI-EDIII шарнирной области.
15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с четвертичным эпитопом, представленным на инфекционном вирионе вируса Зика.
16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может ингибировать этап жизненного цикла вируса после присоединения вируса Зика к клеточной мембране.
17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или вариант ее функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, и/или вариабельный участок легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 9 или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.
18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой очищенное антитело.
19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 или 10-18, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab)₂, Fv или scFv.
20. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предыдущих пунктов для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика.
21. Применение по п.20 у субъектов с диагностированной инфекцией, вызванной вирусом Зика, или у субъектов, проявляющих симптомы инфекции Зика.
22. Применение по п.20, где субъект не проявляет симптомов инфекции Зика.
23. Применение по п.20, где субъектом является беременная женщина.
24. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-19 для мониторинга качества вакцины против вируса Зика путем проверки, что антиген указанной вакцины содержит специфический эпитоп в правильной конформации.
25. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-19.
26. Молекула нуклеиновой кислоты по п.25, где полинуклеотидная последовательность содержит или состоит из последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с любой из SEQ ID NO: 10-18, 28-36, 46-54, 64-72 и 82-90; или вариант его функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.
27. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.25 или 26.
28. Клетка для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-19, содержащая вектор по п.27.
29. Фармацевтическая композиция для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-19, нуклеиновую кислоту по пп.25, 26 или вектор по п.27, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.
30. Фармацевтическая композиция по п.29, которая представляет собой продукт в виде одной дозы.
31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.29, 30, где количество антитела или его анти-

генсвязывающего фрагмента не превышает 500 мг.

32. Применение нуклеиновой кислоты по любому из пп.25, 26 для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика.

33. Применение вектора по п.27 для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика.

34. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-19 для диагностики инфекции, вызванной вирусом Зика.

35. Применение нуклеиновой кислоты по любому из пп.25, 26 для диагностики инфекции, вызванной вирусом Зика.

36. Набор для предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, содержащий по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-19, по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по любому из пп.25, 26, по меньшей мере один вектор по п.27 или по меньшей мере одну фармацевтическую композицию по любому из пп.29-31 и инструкцию по их применению, для профилактики или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика.

37. Способ предотвращения или лечения инфекции, вызванной вирусом Зика, у субъекта, где способ включает введение субъекту, который в этом нуждается, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-19, нуклеиновой кислоты по любому из пп.25, 26, вектора по п.27 или фармацевтической композиции по любому из пп.29-31.

38. Способ по п.37, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор или фармацевтическую композицию вводят вплоть до семи дней после (возможного) инфицирования вирусом Зика.

39. Способ по п.37, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с ингибитором контрольных точек.

40. Способ по п.37, где антитело вводят в (единичной) дозе от 0,04 до 15 мг/кг.

41. Способ по п.37, где у субъекта была диагностирована инфекция, вызванная вирусом Зика, или проявляются симптомы инфекции, вызванной вирусом Зика.

42. Способ по п.37 или 41, где субъектом является беременная женщина.

	Связывание (EC50, нг/мл)										Нейтр. (IC50, нг/мл)	
	ZKV E	DENV1 E	DENV2 E	DENV3 E	DENV4 E	DENV1 VLP	DENV2 VLP	DENV3 VLP	DENV4 VLP	DII ZKA	ZKV нейтр.	DENV1 нейтр.
ZKA3	172	510	108	17	134	12	28	10	7	-	411	346
ZKA4	172	135	23	9	22	9	11	10	8	-	961	592
ZKA5	243	877	133	22	123	37	32	25	31	-	1978	-
ZKA6	79	355	28	13	58	13	14	9	10	-	1861	-
ZKA7	112	329	74	11	95	9	18	8	7	-	646	513
ZKA8	70	136	31	8	28	8	11	7	11	-	1336	102
ZKA76	408	-	-	-	-	-	-	-	-	3756	62	HO
ZKA78	2759	1407	982	33	385	158	83	131	136	-	2863	286
ZKA117	376	1780	341	49	391	142	86	36	158	-	1945	83
ZKB27	225	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	257	HO
ZKB29	285	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB30	1560	2011	2320	344	459	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB32	1668	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	545	HO
ZKB34	122	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB39	136	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	667	HO
ZKB41	241	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB45	125	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	1461	HO
ZKB46	3238	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB51	645	220	115	66	62	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB52	3398	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB53	59	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB84	4373	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKC21	2069	4201	3659	877	1252	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKC22	161	347	133	330	75	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKC23	87	2162	97	37	21	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKC24	92	177	71	240	55	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKC26	52	150	61	21	28	HO	HO	HO	HO	-	420	HO
ZKD4	20	80	24	8	11	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD5	42	254	103	17	41	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD6	115	585	600	31	96	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD7	33	474	147	12	44	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD8	24	169	62	12	25	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD15	581	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD16	62	692	475	10	27	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD17	14	93	32	7	12	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD20	565	-	-	50	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKD21	53	63	189	13	17	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKA64	65	-	-	-	-	-	-	-	-	161	155	-
ZKA134	168	-	-	-	-	-	-	-	-	626	432	HO
ZKA190	113	-	-	-	-	-	-	-	-	444	12	HO
ZKA246	473	-	-	-	-	-	-	-	-	5974	243	HO
ZKA256	115	-	-	-	-	-	-	-	-	214	224	HO
ZKB31	73	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	18	-	HO
ZKB42	5661	7073	6485	12065	6884	HO	HO	HO	HO	5158	-	HO
ZKB50	653	10000	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	-	HO
ZKB85	953	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	2400	2387	HO
ZKB47	13	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	574	-	HO
ZKC6	8575	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	5533	32	HO
ZKC25	162	144	147	150	158	HO	HO	HO	HO	200	-	HO
ZKD18	17	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	12	-	HO
ZKA81	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	243	HO
ZKA144	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	48	HO
ZKA146	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	45	HO
ZKA155	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	99	HO
ZKA160	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	38	26
ZKA167	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	121	HO
ZKA169	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	321	HO
ZKA171	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	47	HO
ZKA172	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	9	HO
ZKA174	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	55	-
ZKA183	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	34	HO
ZKA185	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	13	-
ZKA189	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	273	HO
ZKA191	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	52	HO
ZKA195	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	33	-
ZKA207	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	43	HO
ZKA215	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	26	HO
ZKA218	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	14	HO
ZKA228	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	36	HO
ZKA230	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	10	HO
ZKB75	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	190	HO
ZKB79	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	391	HO
ZKB83	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	59	HO
ZKC3	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	170	HO
ZKC8	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	762	HO
ZKC15	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	15	HO
ZKC18	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	662	HO
ZKD1	-	-	-	-	-	HO	HO	HO	HO	-	1141	HO

EDII/II

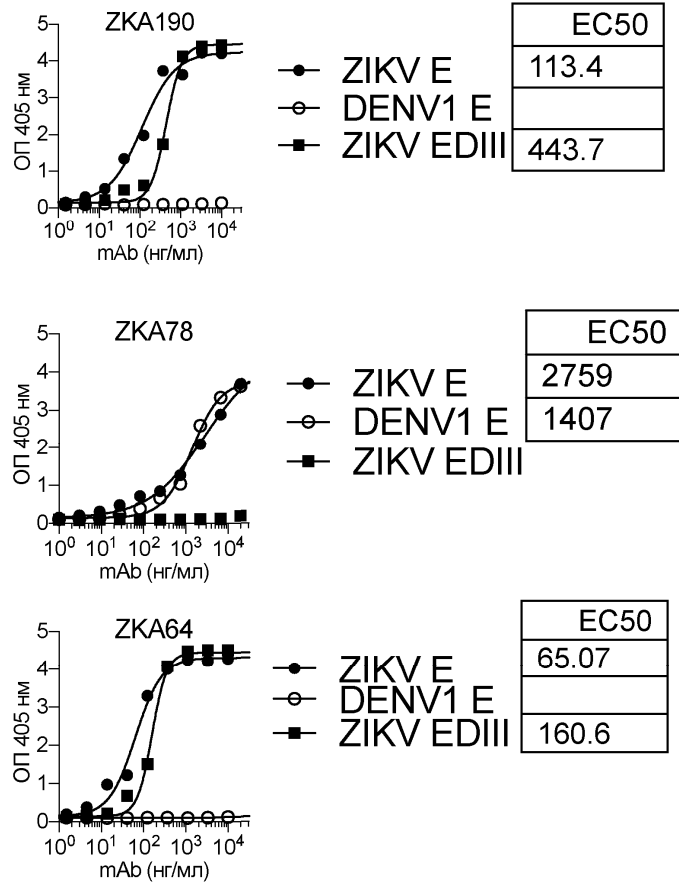
EDIII

NNB

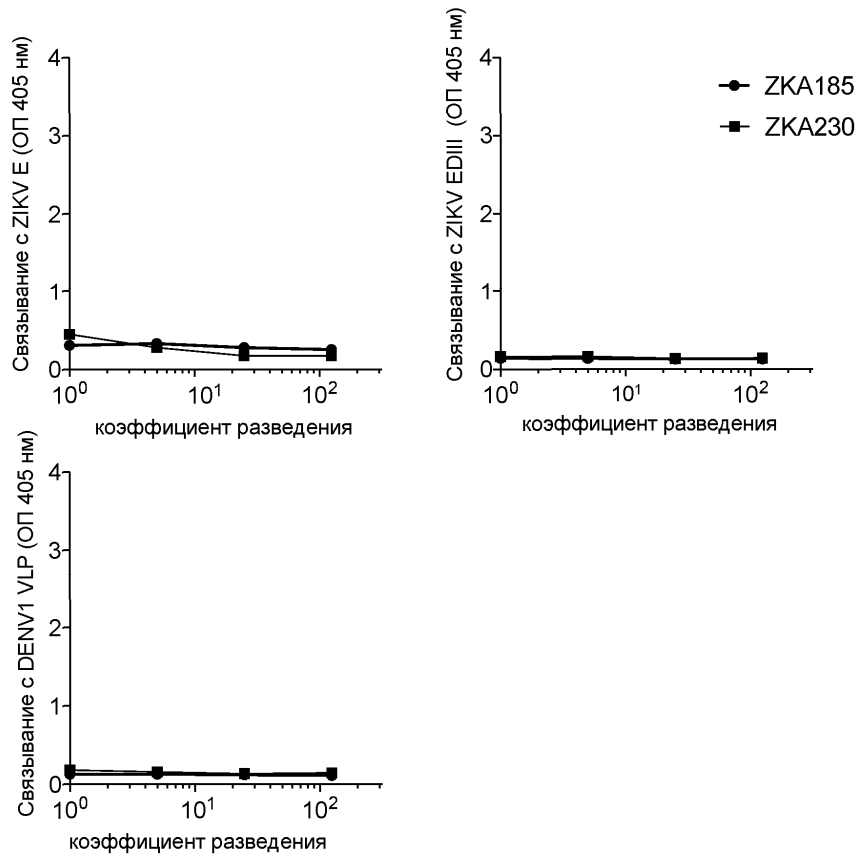
Фиг. 1

mAbs	Связывание (EC50, нг/мл)								
	ZIKV NS1	DENV1 NS1	DENV2 NS1	DENV3 NS1	DENV4 NS1	YFV NS1	WNV NS1	JEV NS1	TBEV NS1
ZKA10	4	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA15	3	-	-	-	-	2784	3217	5499	4613
ZKA16	3	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA18	56	-	-	-	489	255	-	200	-
ZKA19	7	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA24	3	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA25	2	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA28	3	-	-	-	-	-	-	5570	-
ZKA29	6	81	15	30	-	-	2178	2890	9941
ZKA30	2	-	-	-	-	4280	5619	4813	4050
ZKA32	3	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA33	5	-	-	-	-	НО	НО	НО	НО
ZKA34	4	-	-	-	-	-	-	2466	2806
ZKA35	2	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA37	2	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA39	22	1316	330	236	1254	757	-	-	-
ZKA40	15	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA42	2	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA43	2	-	-	-	-	-	-	-	6867
ZKA44	3	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA45	3	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA46	2	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKA48	2	-	-	-	-	5673	9444	-	-
ZKA50	4	-	-	-	-	6601	4940	-	-
ZKA51	4	-	-	-	-	5891	4168	6886	8867
ZKA52	6	-	-	-	-	3419	1821	2705	-
ZKA53	22	1733	-	-	465	97	-	-	-
ZKA54	56	-	3887	-	489	255	-	200	-
ZKB17	7	-	-	-	-	НО	НО	НО	НО
ZKB18	27	-	-	-	-	НО	НО	НО	НО
ZKB19	416	119	123	127	-	НО	НО	НО	НО
ZKB20	2124	-	-	-	-	НО	НО	НО	НО
ZKB21	14	5913	8057	3014	0,2	НО	НО	НО	НО
ZKB23	4	11	64	69	306	НО	НО	НО	НО
ZKC29	557	397	536	609	10	НО	НО	НО	НО
ZKC31	11	-	-	-	-	НО	НО	НО	НО
ZKC32	5	-	-	-	-	НО	НО	НО	НО
ZKC33	4	2	2	2	2	НО	НО	НО	НО
ZKC34	3	5	6	6	4	НО	НО	НО	НО
ZKD25	906	-	-	-	-	НО	НО	НО	НО
ZKD26	2	184	303	314	-	НО	НО	НО	НО

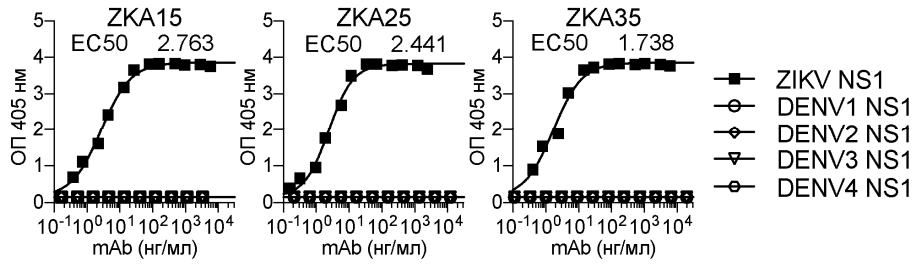
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

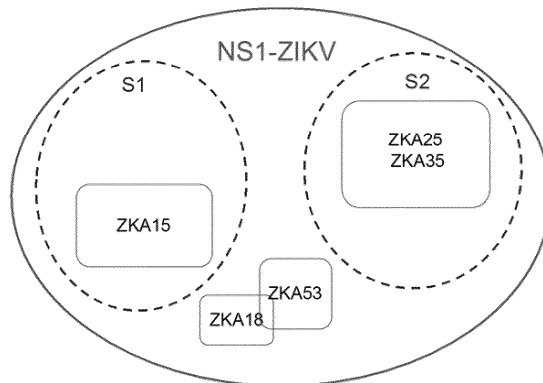
A

		10e Ab													
		20e Ab	ZKA24	ZKA15	ZKA32	ZKA19	ZKA50	ZKA37	ZKA46	ZKA10	ZKA48	ZKA35	ZKA25	ZKA44	ZKA30
S1	ZKA24	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKA15	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKA32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKA19	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1+S2	ZKA50	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	-
	ZKA37	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+/-	-
	ZKA46	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	-	+/-	+/-	+	+/-	-
	ZKA10	-	+	+/-	+	+/-	+	+	+	-	+/-	-	+	-	-
S2	ZKA48	-	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZKA35	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZKA25	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	ZKA44	-	-	-	-	+	+/-	+	+/-	-	+	+	+	+	+
	ZKA30	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	+	+	+	+

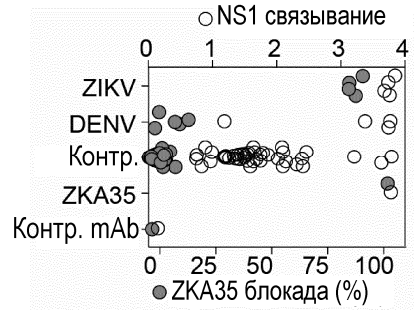
B

		10e Ab												
		20e Ab	ZKA15	ZKA35	ZKA18	ZKA29	ZKA39	ZKA53	ZKA54	ZKB19	ZKB23	ZKC29	ZKC33	ZKC34
S1	ZKA15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	ZKA35	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKA18	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
	ZKA29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKA39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKA53	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	ZKA54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKB19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKB23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKC29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKC33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZKC34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

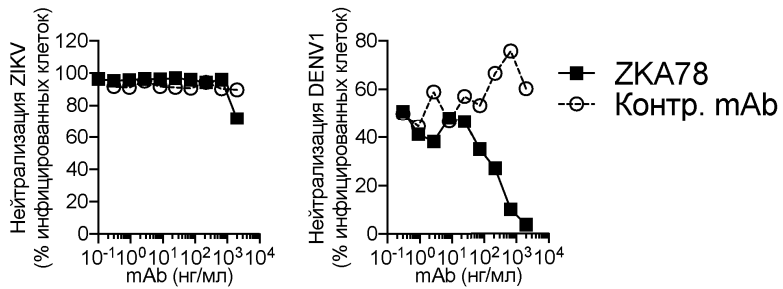
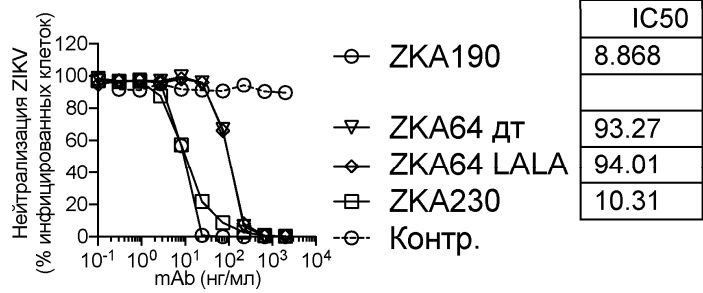
C



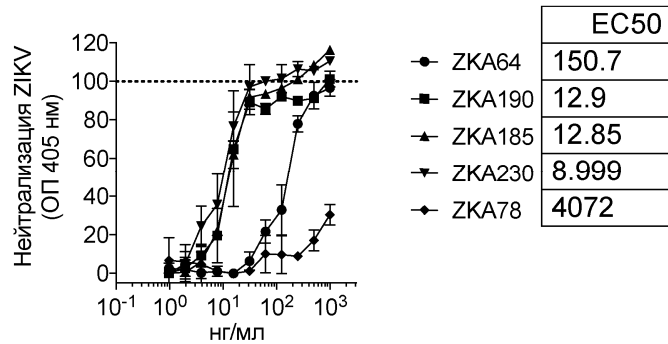
Фиг. 6



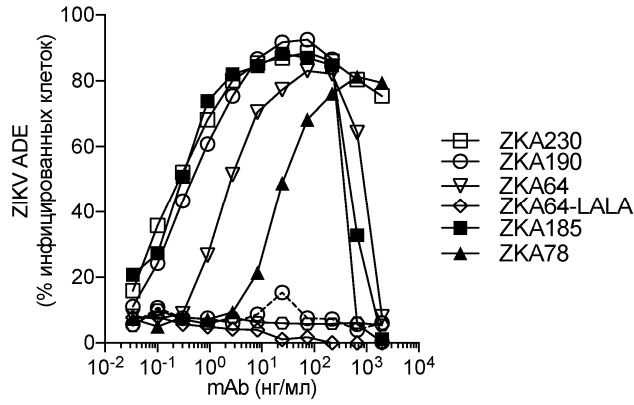
Фиг. 7



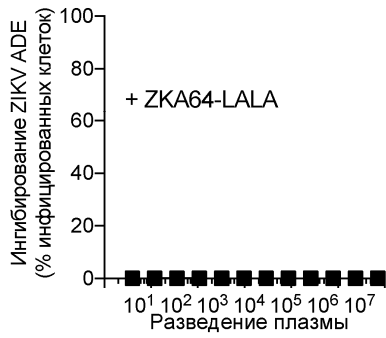
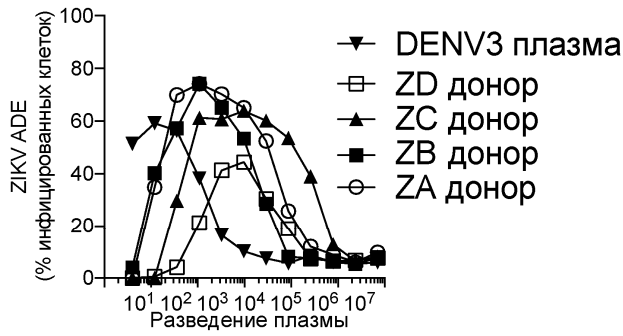
Фиг. 8



Фиг. 9



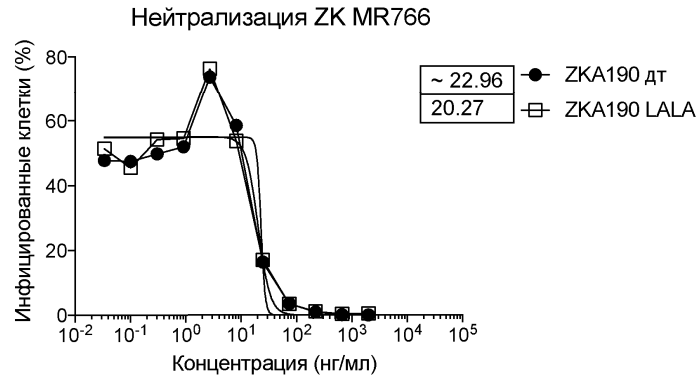
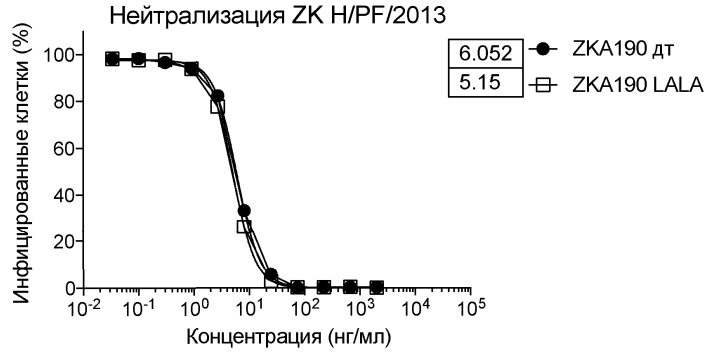
Фиг. 10



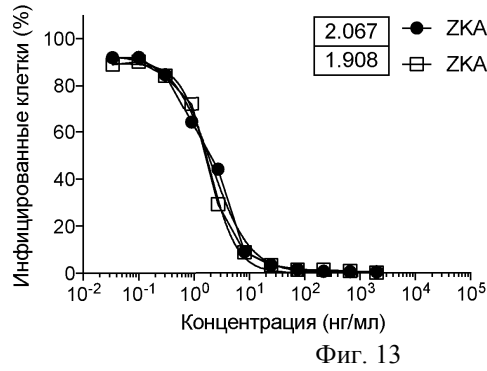
Фиг. 11

H1P2013 (KU776791)	ta a f t k i p a e t l h g t v t e v y a g t d g p c k y a q m a v d m q t l t p y g r f i t a n p v i t e s t e n s k m m l e i d p p f g d s y i v i g v g e k k i t h h w h r s	95
SPH2015 (KU321639)	95
Вirus Zika штамм MRS_OPY_Martinique_PaRI_2015 (KU647676)	95
MR766 (AY632535) i . v d	95
KU926309 Brazil 14-Jan-2016	95
KU870645 USA 02-Feb-2016	95
KU940228 Brazil 01-Jul-2016	95
KU365779 Brazil 2015	95
KU365778 Brazil 2015	95
KU312312 Suriname 2-Oct-15	95
KU853013 Italy 1-Feb-16	95
KU940224 Brazil 01-Aug-2015	95
KU820688 China 14-Feb-16	95
KU761564 China 12-Feb-16 T	95
KU729218 Brazil 2015	95
KU729217 Brazil 2015	95
KU922923 Mexico 25-Feb-16	95
KU365780 Brazil 2015	95
KU501216 Guatemala 1-Dec-15	95
KU740184 China 16-Feb	95
KU527068 Brazil 2015	95
KU955590 China 26-Feb-2016	95
KU707828 Brazil 1-Jul-15	95
KU922960 Mexico 25-Feb-16	95
KU966423 China 2016	95
KU501215 PuertoRico 1-Dec-15	95
KJ776791 FrenchPolynesia 28-Nov-13	95
KU501217 Guatemala 1-Nov-15	95
KU497555 Brazil 30-Nov-15	95
KU820897 Colombia 15-Dec	95
KF993678 Canada 19-Feb-13	95
KU509698 Haiti 12-Dec-14	95
KU820899 China 17-Feb-16	95
KU365777 Brazil 2015	95
KU955589 China 16-Feb-2016	95
KU853012 Italy 1-Feb-16	95
KU681081 Thailand 9-Jul-14 G	95
KU926310 Brazil 29-Jan-2016 A	95
KU744683 China 6-Feb-16 V D G . G	95

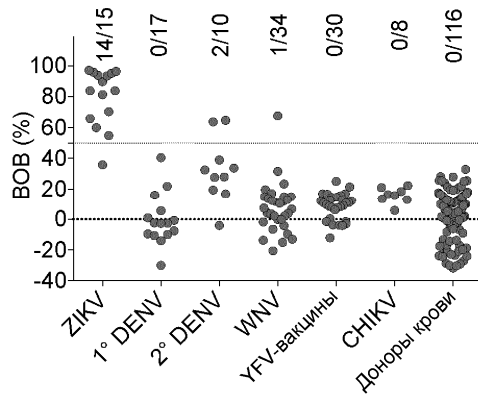
Фиг. 12



Нейтрализация ZK MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015

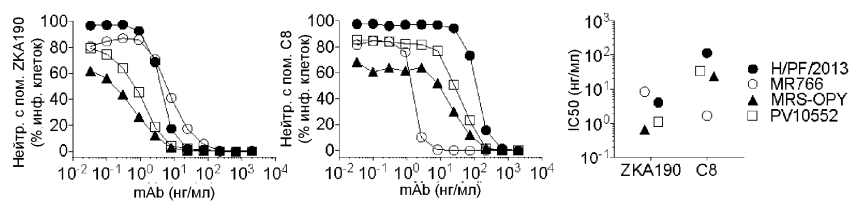


Фиг. 13



Фиг. 14

A



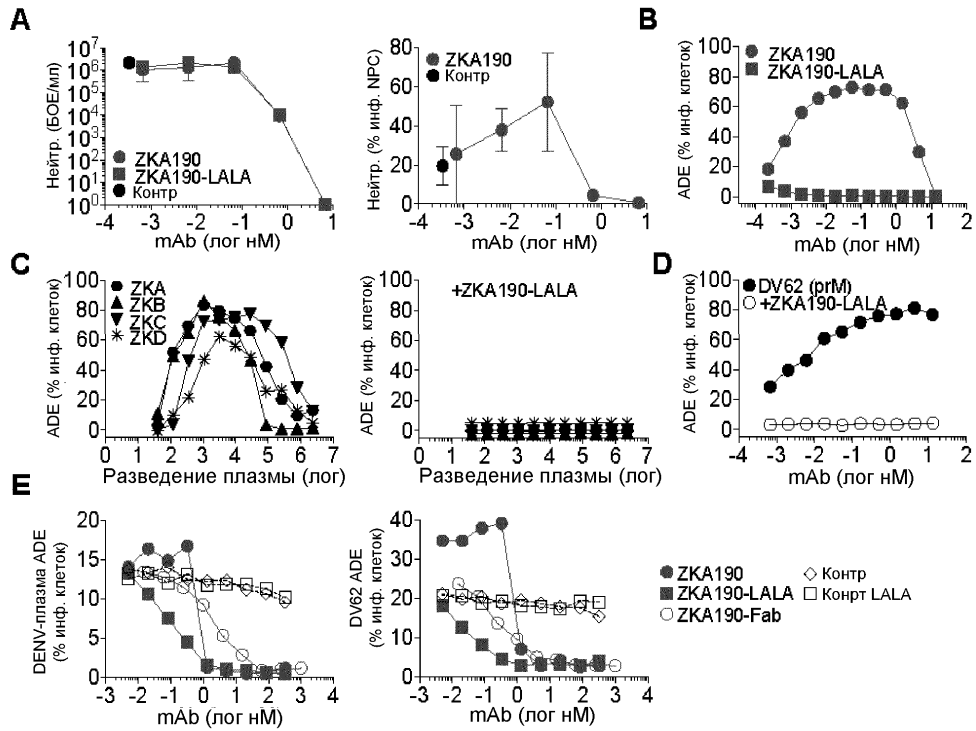
B

ZIKV штамм	IC50 (нг/мл)	
	ZKA190	C8
H/PP/2013	4,09	115,80
MR766	8,37	1,67
MRS-OPY	0,65	23,48
PV10552	1,09	34,60

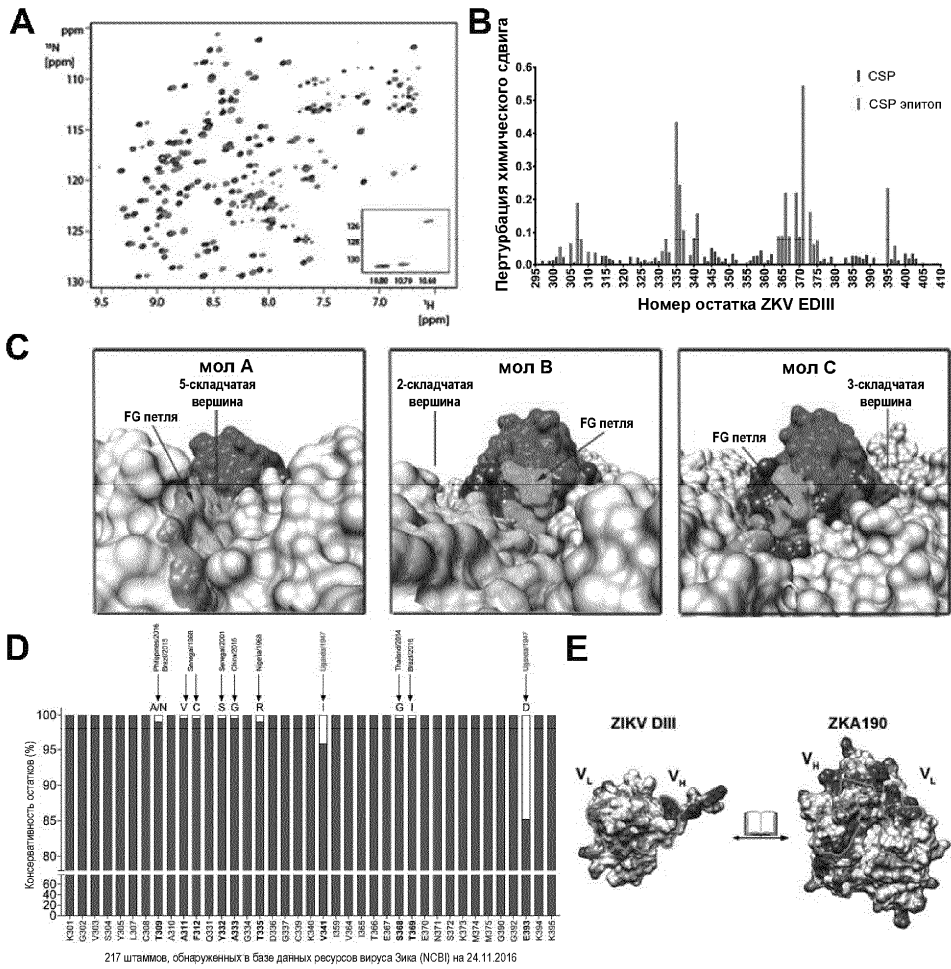
C

	ZKA190	C8
Число значений	4	4
Минимум	0,6484	1,665
25 % перцентилья	0,7581	7,119
Усредненное	2,586	29,04
75 % перцентилья	7,302	95,5
Максимум	8,374	115,8
Среднее	3,549	43,89
Станд. отклонение	3,561	49,86
Ст. ошибка среднего	1,781	24,93
Нижний 95% ДИ среднего	-2,118	-35,45
Верхний 95% ДИ среднего	9,215	123,2
Кoeffициент вариации	100,35%	113,60%
Среднее геометрическое	2,216	19,89
Геом. фактор наруш. сегрег.	3,246	5,977
Сумма	14,19	175,5

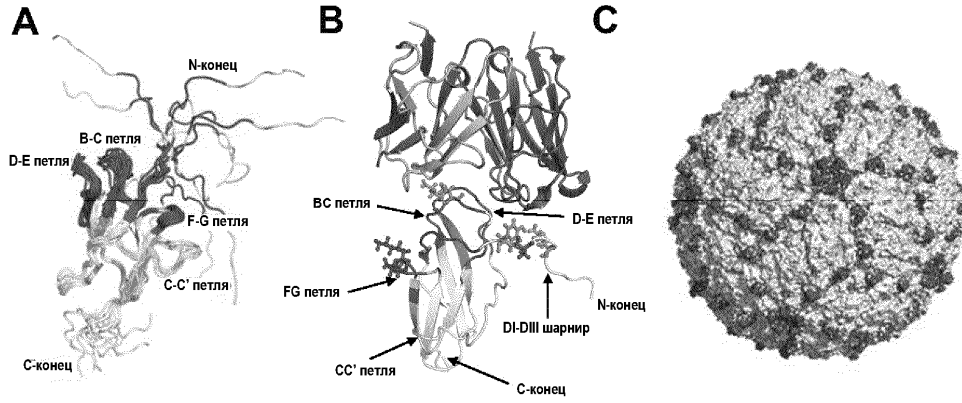
Фиг. 15



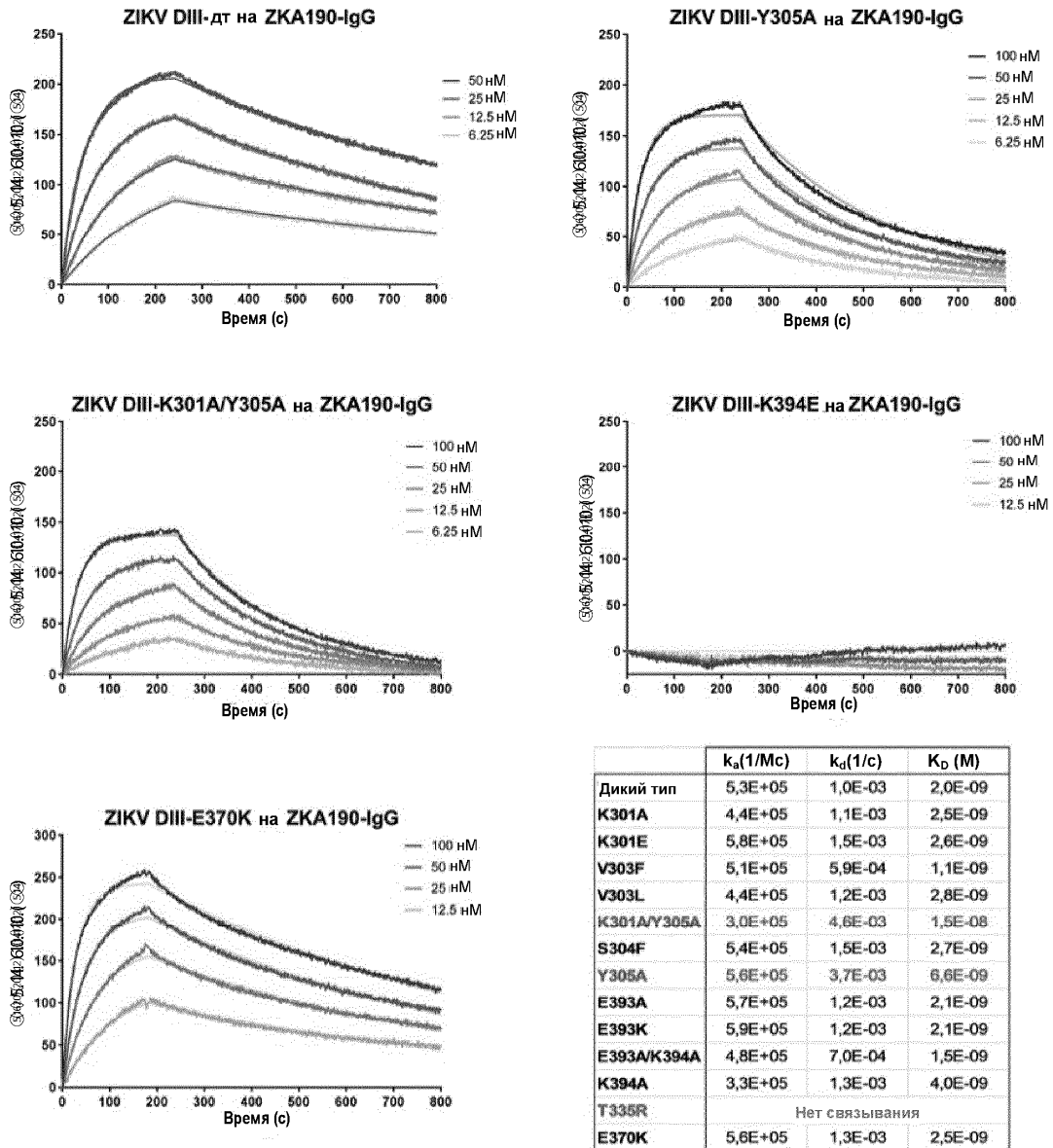
Фиг. 16



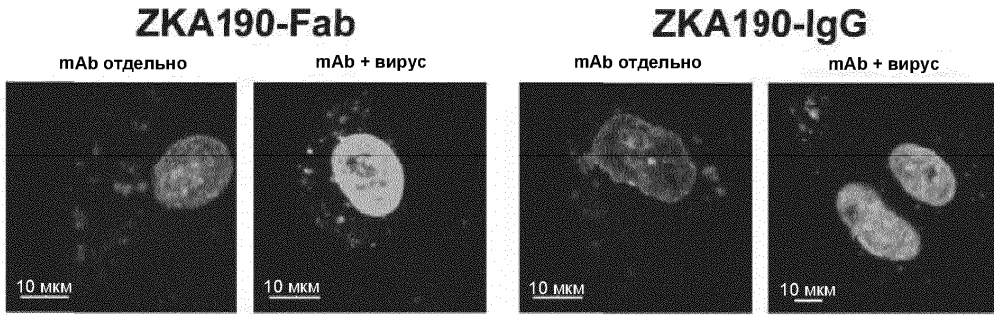
Фиг. 17



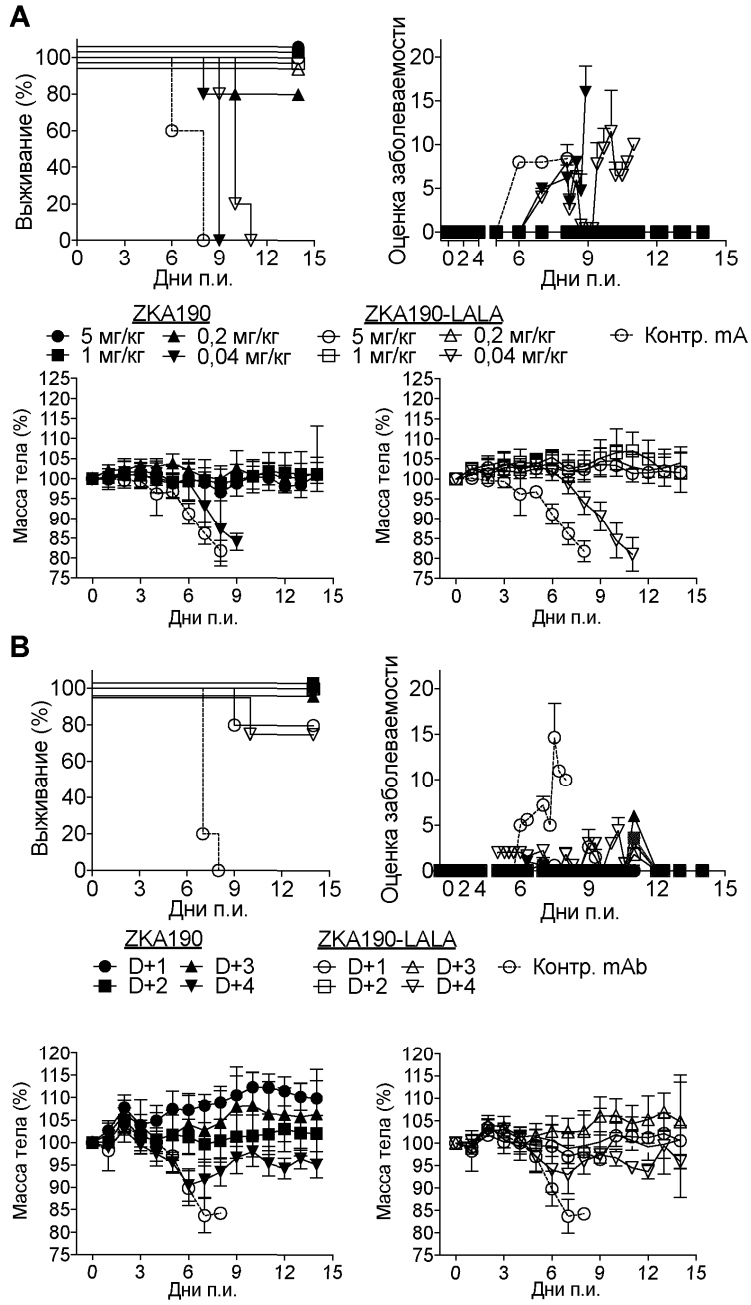
Фиг. 18



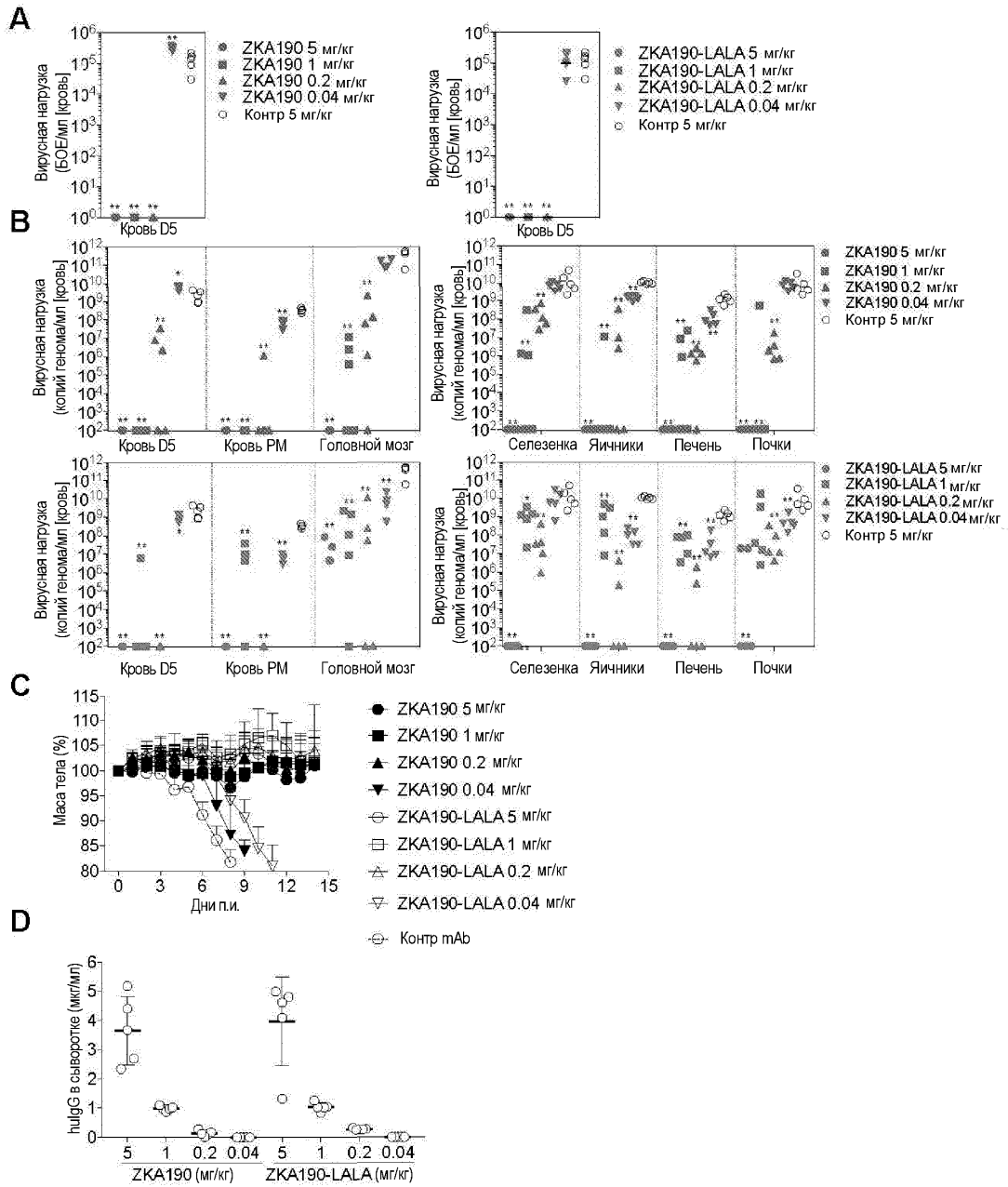
Фиг. 19



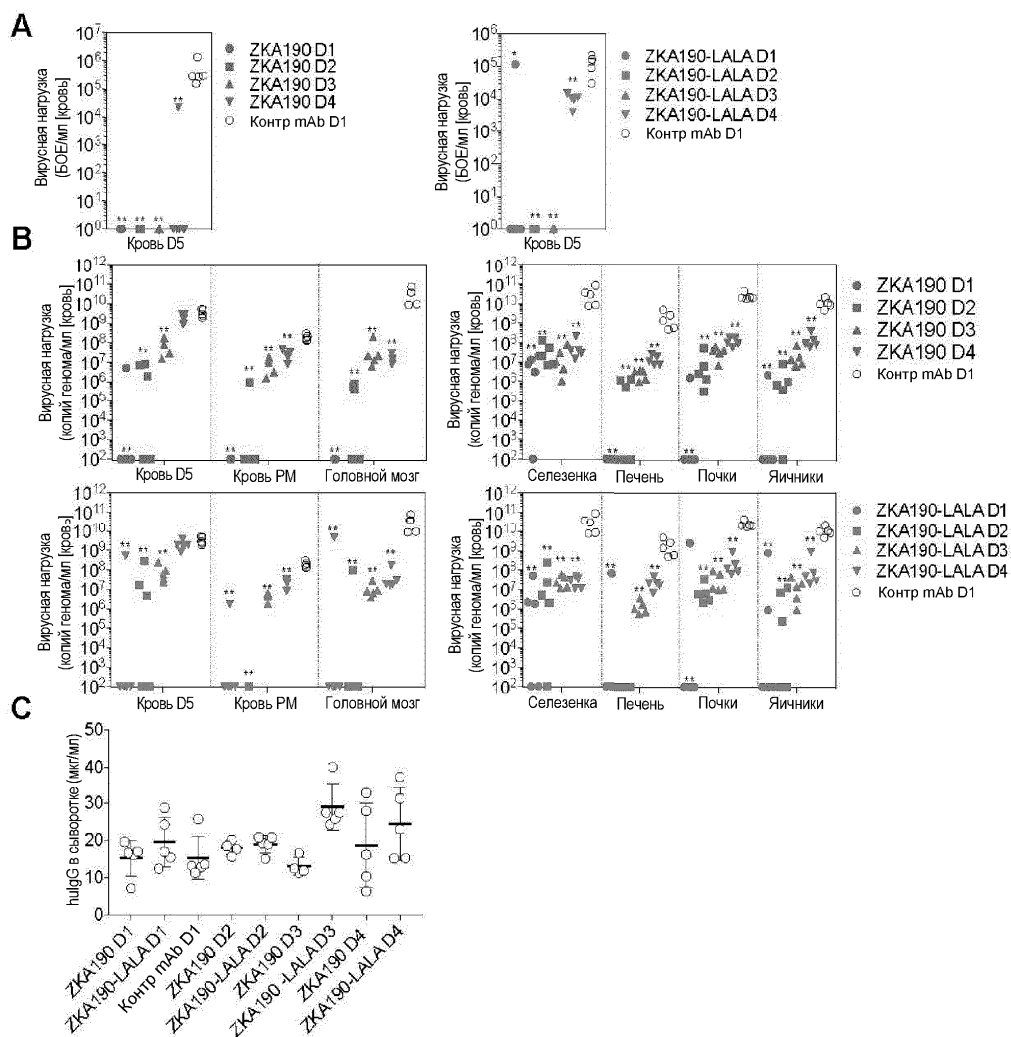
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

