

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036023**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.15

(21) Номер заявки
201691877

(22) Дата подачи заявки
2015.05.20

(51) Int. Cl. **A61K 39/215** (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

**(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К СПАЙК-БЕЛКУ КОРОНАВИРУСА
БЛИЖНЕВОСТОЧНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА**

(31) 62/002,233; 62/004,971; 62/051,717;
62/072,716

(32) 2014.05.23; 2014.05.30; 2014.09.17;
2014.10.30

(33) US

(43) 2017.03.31

(86) PCT/US2015/031800

(87) WO 2015/179535 2015.11.26

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

(72) Изобретатель:
**Киратсоус Кристоc, Шталь Нейл,
Сивапаласингам Суматхи (US)**

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

(56) X.-C. TANG ET AL.: "Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 111, no. 19, 13 May 2014 (2014-05-13), pages E2018-E2026, XP055162782, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1402074111, page 2022 - page 2024; figure 1; table 1

YING TIANLEI ET AL.: "Exceptionally potent neutralization of Middle East respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies", JOURNAL OF VIROLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 88, no. 14, 30 April 2014 (2014-04-30), pages 7796-7805, XP009181617, ISSN: 1098-5514, DOI: 10.1128/JVI.00912-14, page 7803 - page 7804; figure 1; table 1

JIANG LIWEI ET AL.: "Potent Neutralization of MERS-CoV by Human Neutralizing Monoclonal Antibodies to the Viral Spike Glycoprotein", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 6, no. 234, 30 April 2014 (2014-04-30), XP009182042, ISSN: 1946-6234, page 6 - page 7; figures 1-5

(57) Изобретение предлагает моноклональные антитела, которые связываются со спайк-белком коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), и способы их применения. В различных вариантах осуществления по изобретению антитела являются полностью человеческими антителами, которые связываются со спайк-белком MERS-CoV. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению применимы для подавления или нейтрализации активности MERS-CoV, обеспечивая тем самым средство для лечения или предупреждения инфекции MERS у людей. В некоторых вариантах осуществления изобретение предлагает комбинацию одного или нескольких антител, которые связываются со спайк-белком MERS-CoV, для применения в лечении инфекции MERS. В определенных вариантах осуществления одно или несколько антител связываются с отличающимися неконкурентными эпитопами, входящими в состав рецептор-связывающего домена спайк-белка MERS-CoV.

B1

036023

036023 B1

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам человеческих антител, которые специфически связываются со спайк-белком коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), и к способам терапии и диагностики с применением таких антител.

Предшествующий уровень техники

Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) представляет собой недавно появившийся бета-коронавирус, который вызывает тяжелое острое респираторное заболевание. Впервые он был выделен в Саудовской Аравии в 2012 году (Zaki et al., 2012, NEJM, 367:1814-1820) и с тех пор распространился в приблизительно 18 странах с большей частью случаев в Саудовской Аравии и Объединенных Арабских Эмиратах. По состоянию на 15 мая 2014 г. Всемирная организация здравоохранения сообщила о 571 случае MERS, в том числе 171 летальном исходе. Недавно два случая MERS были выявлены в США. Клинические признаки инфекции MERS-CoV у людей варьируют от бессимптомной инфекции до очень тяжелой пневмонии с возможностью развития острого респираторного дистресс-синдрома, септического шока и полиорганной недостаточности, приводящей к летальному исходу.

MERS-CoV схож с коронавирусами HKU4 и HKU5 летучих мышей. Вирус использует свой спайк-белок для взаимодействия с клеточным рецептором для проникновения в клетку-мишень. Raj et al. показали, что вирус связывается посредством рецептор-связывающего домена своего спайк-белка с дипептидилпептидазой-4 (DPP4) на эпителиальных и эндотелиальных клетках человека (Raj et al., 2013, Nature, 495:251-256). Lu et al., в 2013 году показали, что рецептор-связывающий домен MERS-CoV состоит из сердцевины и рецептор-связывающего субдомена, который взаимодействует с DPP4 (Lu et al., 2013, Nature, 500:227-231).

В WO 2014/045254 описано выделение и определение характеристик MERS-CoV, спайк-белка и поликлональных антител к рецептор-связывающему домену спайк-белка. Нейтрализующие моноклональные антитела к рецептор-связывающему домену спайк-белка раскрыты, например, в публикациях Du et al., (2014, J. Virol.), Ying et al., (2014, J. Virol.), Tang, et al., (2014, PNAS) и Jiang et al., (2014, Sci. Transl. Med. Vol. 6, 234ra59).

На сегодняшний день не существует вакцины или терапевтического средства для предупреждения или лечения инфекции MERS. С учетом сохраняющейся угрозы здоровью человека и высокого процента смертельных исходов (выше 30%) существует острая необходимость в противовирусном лечении превентивного и терапевтического характера для контроля MERS. Полностью человеческие антитела, которые с высокой аффинностью специфично связываются со спайк-белком MERS-CoV и подавляют инфицирующую способность вируса, могут иметь большое значение для предупреждения и лечения инфекции MERS.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предлагает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают спайк-белок MERS-CoV. Антитела по настоящему изобретению являются применимыми, среди прочего, в подавлении или нейтрализации активности спайк-белка MERS-CoV. В некоторых вариантах осуществления антитела применяют для блокирования связывания вируса с его рецептором на клетке-хозяине дипептидилпептидазой-4 (DPP4) и для предупреждения проникновения MERS-коронавируса в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления функция антител проявляется в подавлении передачи вируса между клетками. В определенных вариантах осуществления антитела применяют в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции MERS-CoV у субъекта. В определенных вариантах осуществления антитела можно вводить с профилактической или терапевтической целью субъекту, имеющему инфекцию MERS-CoV или имеющему риск ее возникновения.

Антитела по настоящему изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab-, F(ab')₂- или scFv-фрагмент), при этом их можно модифицировать с целью воздействия на функциональность, например, для увеличения стабильности в хозяине или для элиминации остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). В определенных вариантах осуществления антитела могут быть биспецифическими.

В первом аспекте настоящее изобретение предлагает выделенные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются со спайк-белком MERS-CoV. В некоторых вариантах осуществления антитела являются полностью человеческими моноклональными антителами. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с эпитопом в пределах рецептор-связывающего домена (RBD) спайк-белка MERS-CoV. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с аминокислотой, выбранной из аминокислот 367-606 последовательности в GenBank под номером доступа AFS88936.1 (SEQ ID NO: 457). В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению связываются со спайк-белком изолята EMC/2012 MERS-CoV. В определенных вариантах осуществления антитела связываются со спайк-белком разных изолятов

MERS-CoV.

Иллюстративные антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению перечислены в табл. 2 и 3 в данном документе. В табл. 2 изложены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой цепи (HCVR), переменных участков легкой цепи (LCVR), определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к MERS-CoV-S. В табл. 3 изложены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к MERS-CoV-S.

Настоящее изобретение предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 2, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат LCVR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 2, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любые из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 2, образующих пару с любыми из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 2. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащихся в любых иллюстративных антителах к MERS-CoV-S, перечисленных в табл. 2. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/106, 122/106, 130/106, 138/106, 146/106, 154/162, 170/162, 178/162, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/290, 298/306, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434 и 442/450. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 2/10 (например, H1H15177P), 18/26 (e.g., H1H15188P), 66/74 (например, H1H15211P), 114/106 (например, H1H15231P2), 170/162 (например, H1H15260P2) или 218/226 (например, H1H15277N).

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат тяжелую цепь CDR1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 2, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат тяжелую цепь CDR2 (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 2, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь CDR3 (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 2, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат легкую цепь CDR1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 2, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь CDR2 (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 2, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие легкую цепь CDR3 (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 2, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по

меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 2, образующих пару с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 2. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащихся в любых иллюстративных антителах к MERS-CoV-S, перечисленных в табл. 2. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 (например, H1H15177P), 24/32 (например, H1H15188P), 72/80 (например, H1H15211P), 120/112 (например, H1H15231P2), 176/168 (например, H1H15260P2) и 224/232 (например, H1H15277N).

Настоящее изобретение также предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), которые содержатся в любых иллюстративных антителах к MERS-CoV-S, перечисленных в табл. 2. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (например, H1H15177P), 20-22-24-28-30-32 (например, H1H15188P), 68-70-72-76-78-80 (например, H1H15211P), 116-118-120-108-110-112 (например, H1H15231P2), 172-174-176-164-166-168 (например, H1H15260P2) и 220-222-224-228-230-232 (например, H1H15277N).

В связанном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие группу из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), которые содержатся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR в соответствии с любым из иллюстративных антител к MERS-CoV-S, перечисленных в табл. 2. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие аминокислотные последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, которые содержатся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, H1H15177P), 18/26 (например, H1H15188P), 66/74 (например, H1H15211P), 114/106 (например, H1H15231P2), 170/162 (например, H1H15260P2) и 218/226 (например, H1H15277N). Способы и методики выявления CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут быть использованы для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. Иллюстративные правила, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В целом, определение по Kabat основано на вариативности последовательностей, определение по Chothia основано на положении участков структурных петель и определение по AbM представляет собой компромиссное решение между подходами по Kabat и Chothia. См., например, Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997) и Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Настоящее изобретение включает антитела к MERS-CoV-S с модифицированным паттерном гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть использована модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента, который присутствует в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002), *JBC*, 277:26733). В других применениях модификацию галактозилирования можно осуществлять для модифицирования комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Настоящее изобретение также предлагает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание MERS-CoV-S с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждый HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 2.

Настоящее изобретение также предлагает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за специфическое связывание MERS-CoV-S с референтным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждый HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 2.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться с MERS-CoV-S по характеру агониста, т.е. они могут усиливать или стимулировать связывание MERS-CoV-S и/или активность; в других вариантах осуществления антитело может специфически связываться с MERS-CoV-S по характеру антагониста, т.е. они могут блокировать связывание MERS-CoV-S с его рецептором (DPP4).

Настоящее изобретение также предлагает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание спайк-белка MERS-CoV с DPP4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывания спайк-белка MERS-CoV с DPP4, могут связываться с тем же эпитопом на спайк-белке MERS-CoV, что и DPP4, или могут связываться с отличающимся эпитопом на спайк-белке MERS-CoV, что и DPP4. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание MERS-CoV-S с DPP4 человека, верблюда или летучей мыши.

В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты являются биспецифическими и характеризуются первой специфичностью связывания с первым эпитопом в рецептор-связывающем домене спайк-белка MERS-CoV и второй специфичностью связывания со вторым эпитопом в рецептор-связывающем домене спайк-белка MERS-CoV, где первый и второй эпитопы являются отличающимися и неперекрывающимися.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые имеют одну или несколько из следующих характеристик:

- (a) являются полностью человеческим моноклональным антителом;
- (b) выделены из линии клеток гибридомы, выбранной из группы, состоящей из HBVX06H05, HBVX11H04, HBVX11D02, HBVZ10E10, HBVY09F08, HBVZ05G02, HBVZ09B06, HBVY01F08, HBVY10G02, HBVY04B06, HBVY07D10, HBVZ08A09, HBVZ05G04, HBVY06C07, HBVY03H06, HBVZ10G06, HBVZ04F10, HBVX11E09, HBVY06H09, HBVZ05B11, HBVY02E05 и HBVZ04C07;
- (c) взаимодействуют с одним или несколькими аминокислотными остатками в рецептор-связывающем домене спайк-белка MERS-CoV, выбранного из аминокислотных последовательностей 367-606 в SEQ ID NO: 457;
- (d) связываются со спайк-белком MERS-CoV при константе диссоциации (K_D) менее 10^{-9} М, что измерено посредством анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
- (e) блокируют связывание спайк-белка MERS-CoV с дипептидилпептидазой-4 (DPP4) более чем на 90%, что измерено посредством анализа блокирования с помощью ELISA;
- (f) нейтрализуют способность MERS-CoV инфицировать человеческие клетки-хозяева более чем на 90% и при IC_{50} менее 4 нМ, что измерено посредством анализа нейтрализации вирусоподобных частиц (VLP);
- (g) нейтрализуют способность MERS-CoV к инфицированию, где MERS-CoV представляет собой изолят вируса, выбранного из группы, состоящей из EMC/2012, Jordan-N3/2012, England-Qatar/2012, Al-Hasa_1_2013, Al-Hasa_2_2013, Al-Hasa_3_2013, Al-Hasa_4_2013, Al-Hasa_12, Al-Hasa_15, Al-Hasa_16, Al-Hasa_17, Al-Hasa_18, Al-Hasa_19, Al-Hasa_21, Al-Hasa_25, Bisha_1, Buraidah_1, England_1, Hafr-Al-batin_1, Hafr-Al-Batin_2, Hafr-Al-Batin_6, Jeddah_1, KFU-HKU 1, KFU-HKU 13, Munich, Qatar3, Qatar4, Riyadh_1, Riyadh_2, Riyadh_3, Riyadh_3, Riyadh_4, Riyadh_5, Riyadh_9, Riyadh_14, Taif_1, UAE и Wadi-Ad-Dawasir; и
- (h) являются биспецифическим антителом, характеризующимся первой специфичностью связывания с первым эпитопом в рецептор-связывающем домене спайк-белка MERS-CoV и второй специфичностью связывания со вторым эпитопом в рецептор-связывающем домене спайк-белка MERS-CoV, где первый и второй эпитопы являются отличающимися и неперекрывающимися.

Во втором аспекте настоящее изобретение предлагает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к MERS-CoV-S или их части. Например, настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот HCDR1, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах

осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот HCDR2, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот HCDR3, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот LCDR1, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот LCDR2, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 2; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот LCDR3, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие HCVR, где HCVR содержит группу из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), где аминокислотная последовательность изложена в виде HCDR1-HCDR2-HCDR3, что определено с помощью любых иллюстративных антител к MERS-CoV-S, перечисленных в табл. 2.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие LCVR, где LCVR содержит группу из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), где аминокислотная последовательность изложена в виде LCDR1-LCDR2-LCDR3, что определено с помощью любых иллюстративных антител к MERS-CoV-S, перечисленных в табл. 2.

Настоящее изобретение также предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие и HCVR, и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любых аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 2, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любых аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 2. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 3, или, по сути, аналогичную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей. В определенных вариантах осуществления в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где и HCVR, и LCVR получены из одного и того же антитела к MERS-CoV-S, перечисленного в табл. 2.

Настоящее изобретение предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, перечисленных в табл. 2. Настоящее изобретение предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей легкой цепи, перечисленных в табл. 2.

В родственном аспекте настоящее изобретение предлагает рекомбинантные векторы экспрессии, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельный участок тяжелой или легкой цепи антитела к MERS-CoV-S. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любые из упомянутых выше молекул нуклеиновых кислот, т.е. молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, изложенные в табл. 3. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены векторы экспрессии, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих получение антител или фрагментов антител и выделение получен-

ных таким образом антител и фрагментов антител.

В третьем аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают спайк-белок MERS-CoV, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, которая представляет собой комбинацию антитела к MERS-CoV-S и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое преимущественно объединено с антителом к MERS-CoV-S. Иллюстративные средства, которые можно преимущественно объединять с антителом к MERS-CoV-S, включают без ограничения другие средства, которые связывают MERS-CoV и/или подавляют его активность (в том числе другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или средства, которые не связывают непосредственно MERS-CoV-S, но тем не менее ингибируют активность вируса, в том числе способность инфицировать клетки-хозяева. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую:

(a) первое антитело к MERS-CoV-S или его антигенсвязывающий фрагмент;

(b) второе антитело к MERS-CoV-S или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антитело связывается с первым эпитопом в спайк-белке MERS-CoV и второе антитело связывается со вторым эпитопом в спайк-белке MERS-CoV, где первый и второй эпитопы являются отличающимися и неперекрывающимися; и

(c) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую:

(a) первое антитело к MERS-CoV-S или его антигенсвязывающий фрагмент;

(b) второе антитело к MERS-CoV-S или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антитело не конкурирует перекрестно со вторым антителом за связывание со спайк-белком MERS-CoV; и

(c) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Дополнительные комбинации терапевтических средств и комбинированных составов, включающих антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению, раскрыты в других частях настоящего изобретения.

В четвертом аспекте настоящее изобретение предлагает терапевтические способы лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с MERS-CoV, такого как вирусная инфекция, у субъекта, с применением антитела к MERS-CoV-S или антигенсвязывающей части антитела по настоящему изобретению, где терапевтические способы предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое улучшают, тяжесть которого уменьшают, подавляют или предупреждают путем подавления активности MERS-CoV. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способы предупреждения, лечения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции MERS-CoV, при этом способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела к MERS-CoV-S или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способы уменьшения или снижения тяжести по меньшей мере одного симптома или признака инфекции MERS у субъекта путем введения антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению, где по меньшей мере один симптом или признак выбран из группы, состоящей из воспаления легких, альвеолярного повреждения, повышенной температуры, кашля, затруднения дыхания, диареи, функциональной недостаточности органов, пневмонии, септического шока и летального исхода. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способ снижения вирусной нагрузки у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, которые связывают MERS-CoV-S и блокируют связывание MERS-CoV-S с рецептором DPP4 клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить с профилактической или терапевтической целью субъекту, имеющему инфекцию MERS-CoV или имеющему риск ее возникновения. Субъекты из группы риска включают без ограничения индивида с ослабленным иммунитетом, пожилого человека (возрастом старше 65 лет), детей младше 2 лет, туристов, посещающих страны Ближнего Востока (такие как Саудовская Аравия, Объединенные Арабские Эмираты, Катар и т.д.), работников сферы здравоохранения, взрослых или детей, находящихся в тесном контакте с индивидом(ами), у которого(ых) подтверждена MERS или с подозрением на MERS, людей, имеющих нарушения состояния здоровья, такие как легочная инфекция, заболевание сердечно-сосудистой системы или диабет. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению вводят нуждающемуся в этом субъекту в комбинации со вторым терапевтическим средством. Второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из противовоспалительного лекарственного средства (такого как кортикостероиды и нестероидные противовос-

палительные лекарственные средства), противомикробного лекарственного средства, другого антитела к спайк-белку MERS-CoV, противовирусного лекарственного средства, вакцины против MERS-CoV, пищевой добавки, такой как антиоксиданты, и любого другого лекарственного средства или терапевтического способа, известных из уровня техники. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое помогает нейтрализовать или снижать любые возможные побочные эффекты, ассоциированные с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, если такие эффекты возникнут. Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикочно, интраперитонеально, перорально, внутримышечно или интракраниально. В одном варианте осуществления антитело можно вводить посредством одной внутривенной инфузии для достижения максимальной концентрации антитела в сыворотке крови у субъекта. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 мг/кг массы тела субъекта. В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить в одной или нескольких дозах, содержащих от 50 до 600 мг.

Настоящее изобретение также включает применение антитела к MERS-CoV-S или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению в получении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения, при которых блокирование связывания MERS-CoV и/или его активности может принести пользу.

Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена таблица с перечнем супернатантов гибридом, содержащих антитела (перечислены в столбце 1 по ID образцов), и их свойства в анализах связывания, блокирования и нейтрализации, которые описаны в других частях данного документа.

На фиг. 2 представлена матричная таблица, в которой показаны результаты перекрестного конкурентного анализа антител, в котором первое антитело к MERS-CoV-S (mAb-1) наносили на покрытый RBD MERS наконечник датчика с последующей обработкой вторым антителом к MERS-CoV-S (mAb-2). Изображены результаты реакции связывания (в числовых выражениях от -0,05 до 0,64) для каждой протестированной комбинации антител. В светло-серых ячейках с черным шрифтом представлены данные реакции связывания для внутренней конкуренции. Антитела, которые конкурируют в обоих направлениях, независимо от порядка связывания антигена, выделены в черных ячейках с белым шрифтом.

Отсутствие конкуренции, предполагающее разные участки связывания, представлено в виде данных в белых ячейках с черным шрифтом. Антитела, которые показывают сдвиг в связывании более 0,18 нм, не конкурируют перекрестно друг с другом.

На фиг. 3 представлена матричная таблица, в которой показаны результаты перекрестного конкурентного анализа антител, в котором первое антитело к MERS-CoV-S (mAb-1) наносили на покрытый RBD MERS наконечник датчика с последующей обработкой вторым антителом к MERS-CoV-S (mAb-2). Изображены результаты реакции связывания (в числовых выражениях от -0,01 до 0,55) для каждой протестированной комбинации антител. В светло-серых ячейках с черным шрифтом представлены данные реакции связывания для внутренней конкуренции. Антитела, которые конкурируют в обоих направлениях, независимо от порядка связывания антигена, выделены в черных ячейках с белым шрифтом. Отсутствие конкуренции, предполагающее разные участки связывания, представлено в виде данных в белых ячейках с черным шрифтом. Антитела, которые показывают сдвиг в связывании более 0,14 нм, не конкурируют перекрестно друг с другом.

На фиг. 4 показаны результаты количественной ПЦР транскриптов MERS-CoV (транскрибированная геномная мРНК выше гена белка оболочки *UpE*) у мышей с гуманизированной последовательностью DPP4 на 2 и 4 день после инфицирования.

На фиг. 5 показаны результаты количественной ПЦР транскрипта MERS-CoV (геном MERS-CoV - лидерная последовательность) у мышей с гуманизированной последовательностью DPP4 на 2 и 4 день после инфицирования.

На фиг. 6 показано количественное определение концентрации вируса MERS-CoV в легких инфицированной мыши на 4 день после инфекции. Уровни MERS-CoV в легких мыши количественно определяли и выражали в виде БОЕ/мл гомогенизированного легкого мыши.

На фиг. 7 показаны результаты количественной ПЦР транскриптов MERS-CoV (транскрибированная геномная мРНК, расположенная выше гена белка оболочки *UpE*) из легких мышей, обработанных 200, 20 или 2 мкг антител H1H15211P или H1H15277N или изотипическим контролем hIgG за один день до инфицирования MERS-CoV. Все образцы сравнивали с изотипическим контролем hIgG1, принятым за 100%.

На фиг. 8 показаны результаты количественной ПЦР транскриптов MERS-CoV (транскрибированная геномная мРНК лидерная последовательность) из легких мышей, обработанных 200, 20 или 2 мкг антител H1H15211PP или H1H15277N или изотипическим контролем hIgG за один день до инфицирования MERS-CoV. Все образцы сравнивали с изотипическим контролем hIgG1, принятым за 100%.

На фиг. 9 показан анализ концентрации вируса в легких, который количественно определяли посредством анализа бляшкообразования и выражали в БОЕ/мл легких мышей, обработанных 200, 20 или

2 мкг антител H1H15211P или H1H15277N или изотипическим контролем hIgG за один день до инфицирования MERS-CoV. Все образцы сравнивали с изотипическим контролем hIgG1, принятым за 100%.

На фиг. 10 приведены показатели воспаления, полученные при гистологическом анализе легких мышей, обработанных 200, 20 или 2 мкг антител H1H15211P или H1H15277N или изотипическим контролем hIgG за один день до инфицирования MERS-CoV.

На фиг. 11 показаны результаты количественной ПЦР транскриптов MERS-CoV (транскрибированная геномная мРНК, расположенная выше гена белка оболочки UpE) из легких мышей, обработанных 200 или 500 мкг H1H15211P или изотипическим контролем hIgG в первый день после инфицирования или обработанных 200 мкг H1H15211P за один день до инфицирования MERS-CoV. Все образцы сравнивали с изотипическим контролем hIgG1, принятым за 100%.

На фиг. 12 показаны результаты количественной ПЦР транскриптов MERS-CoV (геном MERS-CoV - лидерная последовательность) из легких мышей, обработанных 200 или 500 мкг H1H15211P, или изотипическим контролем hIgG в первый день после инфицирования, или 200 мкг H1H15211P за один день до инфицирования MERS-CoV. Все образцы сравнивали с изотипическим контролем hIgG1, принятым за 100%.

На фиг. 13 показан анализ концентрации вируса в легких, который количественно определяли посредством анализа бляшкообразования и выражали в БОЕ/мл легких мышей, обработанных 200 или 500 мкг H1H15211P или изотипическим контролем hIgG в первый день после инфицирования или обработанных 200 мкг H1H15211P за один день до инфицирования MERS-CoV. Все образцы сравнивали с изотипическим контролем hIgG1, принятым за 100%.

На фиг. 14 приведены показатели воспаления в баллах, полученные при гистологическом анализе легких мышей, обработанных 200 или 500 мкг H1H15211P или изотипическим контролем hIgG за один день до инфицирования MERS-CoV.

Подробное описание

Перед описанием способов согласно настоящему изобретению необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также необходимо понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена лишь для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предполагает ограничительный характер, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться лишь прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Определения

Термин "MERS-CoV", также называемый как "коронавирус MERS", относится к недавно возникшему коронавирусу Ближневосточного респираторного синдрома, который впервые выделили на Аравийском полуострове в 2012 году (Zaki et al., 2012, NEJM, 367:1814-1820) и идентифицировали как причину вспышки тяжелого острого респираторного заболевания. Первоначально ему дали название коронавируса человека-EMC (Медицинский центр Эразмус; hCoV-EMC). Он относится к бета-коронавирусу линии 2с и вызывает тяжелое острое респираторное заболевание, аналогичное коронавирусу тяжелому острому респираторному синдрому (SARS-CoV), который появился в Китае в 2002 году. Было установлено, что коронавирус MERS является близкородственным коронавирусом, найденным у летучих мышей и верблюдов. Посредством вирусного спайк-белка он связывается с рецептором человеческой клетки-хозяина дипептидилпептидазой-4 (DPP4). Было установлено, что спайк-белок MERS-CoV связываются с DPP4 других видов, в частности летучих мышей и верблюдов (Raj et al., 2013, Nature, 495:251-254).

Термин "MERS-CoV-S", также называемый "S-белок", относится к спайк-белку коронавируса MERS. Спайк-белок MERS-CoV представляет собой мембранный гликопротеин типа I из 1353 аминокислот, который собирается в тримеры, которые образуют шиловидные отростки или пепломеры на поверхности оболочки частиц коронавируса MERS. Данный белок обладает двумя важнейшими функциями, связываниями с рецепторами хозяина и слиянием мембран за счет N-концевых (S1, аминокислотные остатки 1-751) и C-концевых (S2, аминокислотных остатков 752-1353) половин S-белка. MERS-CoV-S связывается со своим родственным рецептором, дипептидилпептидазой-4 (DPP4), через рецептор-связывающий домен (RBD) длиной в 230 аминокислот, присутствующий в субъединице S1. Mou et al., (2013) показали в J. Virology (vol. 87, pages 9379-9383), что RBD MERS-CoV расположен в пределах остатков 358-588 спайк-белка. Аминокислотная последовательность полноразмерного спайк-белка MERS-CoV представляет собой иллюстративную аминокислотную последовательность спайк-белка MERS-CoV изолята EMC/2012, представленную в GenBank под номером доступа AFS88936.1

(SEQ ID NO: 4 57). Термин "MERS-CoV-S" также включает варианты спайк-белка MERS-CoV, выделенного из разных изолятов MERS-CoV, например Jordan-N3/2012, England-Qatar/2012, Al-Hasa_1_2013, Al-Hasa_2_2013, Al-Hasa_3_2013, Al-Hasa_4_2013, Al-Hasa_12, Al-Hasa_15, Al-Hasa_16, Al-Hasa_17, Al-Hasa_18, Al-Hasa_19, Al-Hasa_21, Al-Hasa_25, Bisha_1, Buraidah_1, England_1, Hafr-Al-Batin_1, Hafr-Al-Batin_2, Hafr-Al-Batin_6, Jeddah_1, KFU-HKU 1, KFU-HKU 13, Munich, Qatar3, Qatar4, Riyadh_1, Riyadh_2, Riyadh_3, Riyadh_3, Riyadh_4, Riyadh_5, Riyadh_9, Riyadh_14, Taif_1, UAE и Wadi-Ad-Dawasir.

Термин "MERS-CoV-S" включает рекомбинантный спайк-белок MERS-CoV или его фрагмент. Термин также охватывает спайк-белок MERS-CoV или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, мышинным или человеческим Fc-фрагментом или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, данный термин включает последовательности, примерами которых является последовательность, показанная под SEQ ID NO: 458, содержащая мышинный Fc (mIgG2a) или человеческий Fc (hIgG1) на С-конце, связанном с аминокислотными остатками 367-606 полноразмерного спайк-белка MERS-CoV. Данный термин также включает варианты белков, которые содержат гистидиновую метку на С-конце, связанном с аминокислотными остатками 367-606 полноразмерного спайк-белка MERS-CoV.

Термин "DPP4" относится к дипептидилпептидазе-4, рецептору для MERS-CoV. DPP4 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II из 766 аминокислот, присутствующий на поверхности клетки в димерной форме. Он представляет собой экзопептидазу, которая расщепляет дипептиды гормонов и хемокинов после аминокислотного остатка пролина, регулируя таким образом их биологическую активность. У людей DPP4 в основном экспрессируется на эпителиальных клетках в почках, тонком кишечнике, печени и предстательной железе, на реснитчатых и безреснитчатых клетках в верхнем и нижнем отделах дыхательных путей и на иммунных клетках (т.е. CD4+, CD8+, дендритных клетках и макрофагах). Если не указано, что DPP4 получен от вида, не относящегося к человеку, термин "DPP4", используемый в данном изобретении, означает DPP4 человека.

Термин "инфекция MERS" или "инфекция MERS-CoV", используемый в данном документе, также описанный в виде Ближневосточного респираторного синдрома, относится к тяжелой острой респираторной болезни, вызываемой коронавирусом MERS, и впервые о ней сообщили в Саудовской Аравии в 2012 году. Данный термин включает инфекцию дыхательных путей, зачастую в нижнем отделе дыхательных путей. Симптомы включают высокую температуру, кашель, затруднение дыхания, пневмонию, симптомы, связанные с желудочно-кишечным трактом, такие как диарея, функциональная недостаточность органов (почечная недостаточность и ренальная дисфункция), септический шок и летальный исход в тяжелых случаях.

Термин "антитело", используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. "молекулы полного антитела"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константного участка тяжелой цепи (состоящего из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменного участка легкой цепи ("LCVR" или "V_L") и константного участка легкой цепи (C_L). Участки V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающий фрагмент) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественно или искусственно изменены. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании анализа "бок о бок" двух или более CDR.

Замена одного или нескольких остатков CDR или удаление одного или нескольких CDR также возможна. В научной литературе были описаны антитела, в которых один или два CDR могут быть распределены для связывания. Padlan et al. (1995, FASEB J. 9:133-139) проанализировали участки контактов между антителами и их антигенами, исходя из опубликованных кристаллических структур, и сделали заключение, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR в действительности контактирует с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых аминокислотные остатки одного или двух CDR не вступают в контакт с антигеном (см. также, Vajdos et al., 2002, J. Mol. Biol. 320:415-428).

Остатки CDR, которые не контактируют с антигеном, можно идентифицировать на основе прошлых исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не требуются) среди участков CDR по Kabat, находящихся за пределами CDR по Chothia, путем молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. При удалении CDR или его (их) остатков обычно происходит замена на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать эмпирическим путем. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Раскрытые в данном документе полностью человеческие моноклональные антитела к MERS-CoV-S могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных участках и/или участках CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко определить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из публичных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или несколько аминокислот в пределах одного или нескольких каркасных участков и/или участков CDR мутированы в соответствующий(ие) остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело, или в соответствующий(ие) остаток(ки) последовательности другой зародышевой линии, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательностей называются в данном документе собирательно как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменных участков тяжелой и легкой цепей, раскрытых в данном документе, может легко получить несколько антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все из каркасных остатков и/или остатков CDR в доменах V_H и/или V_L являются обратно мутированными в остатки, встречающиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело. Согласно другим вариантам осуществления лишь определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например лишь мутировавшие остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или лишь мутировавшие остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько из каркасных участков и/или один или несколько из остатка(ов) CDR мутируют в соответствующий(ие) остаток(и) последовательности другой зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально произошло антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевых линий в каркасных участках и/или участках CDR, например, где определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток последовательности определенной зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от последовательности исходной зародышевой линии, сохраняются или мутированы в соответствующий остаток последовательности другой зародышевой линии. Сразу после получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные биологические антагонистические или агонистические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т.п. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные при помощи этого общего способа, охвачены настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные антитела к MERS-CoV-S, содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает антитела к MERS-CoV-S с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе.

Термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR, в частности CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего (например, мыши), привиты на FR последовательности человека. Данный термин включает антитела, полученные рекомбинантным путем у не относящихся к человеку млекопитающих или в клетках не относящегося к человеку млекопитающего. В данный термин не предназначено включение антитела, выделенного у человека-субъекта или полученного от него.

Термин "рекомбинантный", используемый в данном документе, относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению, которые созданы, экспрессируются, выделены или получены при помощи технологий или способов, известных в данной области, как, например, технология рекомбинантной ДНК, которая включает, например, сплайсинг ДНК и экспрессию трансгенов. Данный термин относится к антителам, экспрессируемым у не относящегося к человеку млекопи-

тающего (в том числе у трансгенных не относящихся к человеку млекопитающих, например трансгенных мышей), или в клеточной системе экспрессии (например, клетках CHO), или выделенным из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

Термин "специфически связывается", или "специфически связывается с", или ему подобный означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который является относительно устойчивым в физиологических условиях. Специфическое связывание можно характеризовать при помощи равновесной константы диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М или менее (например, значение меньше K_D означает более сильное связывание). Способы определения наличия специфического связывания двух молекул хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и им подобные. В данном документе описаны антитела, которые идентифицированы при помощи поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, которые специфически связываются с MERS-CoV-S. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом у MERS-CoV-S и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными участками MERS-CoV-S, тем не менее считаются антителами, которые "специфически связываются", как используется в данном документе.

Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем mAb, которые характеризуются аффинностью связывания с MERS-CoV-S, выраженной в виде K_D , составляющей по меньшей мере 10^{-8} М, предпочтительно 10^{-9} М, более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, что измерено при помощи поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, или определения сродства в растворе посредством твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA).

Термин "медленная скорость диссоциации", " K_{off} " или " k_d " означает диссоциацию комплекса антитела и MERS-CoV при константе скорости 1×10^{-3} с⁻¹ или менее, предпочтительно 1×10^{-4} с⁻¹ или менее, что определено при помощи поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и им подобные, используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или получаемый посредством генной инженерии полипептид или гликопротеин, специфически связывающийся с антигеном с образованием комплекса. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", используемый в данном документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться со спайк-белком MERS-CoV.

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антител по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с функциональной молекулой, такой как лиганд, или терапевтической молекулой ("иммуноконъюгат"), такой как противовирусное лекарственное средство, второе антитело к MERS-CoV-S, или любой другой терапевтической молекулой, применяемой в лечении инфекции, вызываемой MERS-CoV.

Термин "выделенное антитело", используемый в данном документе, предназначен для обозначения антитела, которое, по сути, не содержит антител (Ab), специфичных в отношении другого антигена (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с MERS-CoV-S, или его фрагмент, который, по сути, не содержит Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от MERS-CoV-S).

Термин "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело", используемый в данном документе (или "антитело, которое нейтрализует активность MERS-CoV-S" или "антитело-антагонист"), предназначен для обозначения антитела, связывание которого с MERS-CoV-S приводит в результате к подавлению по меньшей мере одной биологической активности MERS-CoV. Например, антитело по настоящему изобретению может предотвращать или блокировать связывание MERS-CoV с DPP4.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс", используемый в данном документе, относится к оптическому феномену, который предусматривает анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, при помощи системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси).

Термин " K_D ", используемый в данном документе, относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия определенного антитела и антигена.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в переменном участке молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, с которым вступают в реакцию В- и/или Т-клетки. Он также относится к участку антигена, с которым связывается антителом. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы в общем представляют собой подгруппу струк-

турных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно обуславливают свойство аффинности взаимодействия. Также эпитопы могут быть конформационными, т.е. состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь специфические характеристики трехмерных структур и/или специфические характеристики заряда.

Термин "перекрестная конкуренция", используемый в данном документе, означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном и ингибируют или блокируют связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию двух антител в обоих направлениях, т.е. первое антитело, которое связывается и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах осуществления первое антитело и второе антитело связываются с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы первое и второе антитела могут связываться с разными, но не перекрывающимися, эпитопами таким образом, что связывание одного подавляет или блокирует связывание второго антитела, например, посредством стерического несоответствия. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить с помощью известных в данной области способов, например с помощью безметочного анализа интерферометрии биослоя в режиме реального времени. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может выражаться в виде связывания второго антитела, которое меньше, чем фоновый сигнал из-за самосвязывания (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом). Перекрестная конкуренция между двумя антителами может выражаться, например, в виде % связывания второго антитела, который меньше, чем фоновый сигнал самосвязывания (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом).

Термин "по сути, идентична" или "по сути, идентичная" по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей вставки или делеции, с другой последовательностью нуклеиновой кислоты (или ее комплементарной нитью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 90%, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как определено при помощи хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, что обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, которая, по сути, идентична молекуле референтной нуклеиновой кислоты, может в ряде случаев кодировать полипептид с такой же или, по сути, аналогичной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, кодируемый молекулой референтной нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "по сути, аналогичный" или "по сути, аналогичная" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, как, например, путем применения программ GAP или BESTFIT с использованием значения штрафа за открытие гэпа по умолчанию обладают по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичностью последовательности. Предпочтительно положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, содержащим R-группу боковой цепи со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена практически не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности или степень сходства можно повышать для коррекции характера консервативности замены. Средства для такой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, публикацию Pearson (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают:

- 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин;
- 3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин;
- 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан;
- 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин;
- 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат;
- 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин.

Предпочтительные группы консервативного замещения аминокислоты представляют собой валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Кроме того, консервативной заменой является любое изменение с положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в публикации Gonnet et al. (1992), *Science*, 256:1443-45, включенной в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение с неотрицательным значением в матрице логарифмической

функции правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряется с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности путем применения критериев сходства, определяя различные замены, делеции и другие модификации, включая консервативные замены аминокислоты. Например, программный пакет GCG включает программы, такие как GAP и BESTFIT, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с помощью FASTA, программы в GCG версии 6.1, с использованием параметров по умолчанию или рекомендованных параметров. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей в участках с наибольшим сходством между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом для сравнения последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410 и (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

Выражение "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое приводит к требуемому эффекту, ради которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет установлено специалистом в данной области с помощью известных методик (см., например, Lloyd (1999), The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Используемое в данном документе выражение "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в уменьшении тяжести, предупреждении и/или лечении такого заболевания или нарушения, как вирусная инфекция. Термин включает субъектов-людей, имеющих инфекцию MERS-CoV или риск ее возникновения.

Используемые в данном документе термины "лечить", "излечение" или "лечение" относятся к снижению или уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака инфекции MERS, как результата введения нуждающемуся в этом субъекту терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению. Данные термины включают подавление прогрессирования заболевания или усугубления инфекции. Данные термины также включают положительный прогноз при заболевании, т.е. у субъекта может отсутствовать инфекция, или у него могут быть снижены вирусные титры, или он может не иметь вирусных титров после введения терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

Термины "предупреждать", "предупреждающий" или "предупреждение" относятся к подавлению проявления инфекции MERS или любых симптомов или признаков инфекции MERS при введении антитела по настоящему изобретению. Данный термин включает предупреждение распространения инфекции у субъекта, который подвергся воздействию вируса или имеет риск возникновения инфекции MERS. Используемый в данном документе термин "противовирусное лекарственное средство" относится к любому лекарственному или терапевтическому средству для лечения инфекций, используемому для лечения, предупреждения или уменьшения тяжести вирусной инфекции у субъекта. Термин "противовирусное лекарственное средство" включает без ограничения рибавирин, осельтамивир, занамивир, интерферон-альфа2 β , анальгетики и кортикостероиды. В контексте настоящего изобретения вирусные инфекции включают инфекции, вызванные коронавирусами человека, включая без ограничения MERS-CoV, HCoV_229E, HCoV_NL63, HCoV-OC43, HCoV_HKU1 и SARS-CoV.

Общее описание

Пассивную иммунотерапию для профилактики или лечения заболевания использовали на протяжении более 100 лет, как правило, в форме сыворотки от людей-реконвалесцентов, которая содержит высокие титры нейтрализующих антител (Good et al., 1991; Cancer, 68:1415-1421). В настоящее время множество очищенных моноклональных антител проходят доклинические и клинические исследования для применения в качестве противомикробных средств (Marasco et al., 2007; Nature Biotechnology, 25:1421-1434).

Авторы настоящего изобретения в данном документе описывают полностью человеческие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с MERS-CoV-S и модулируют взаимодействие MERS-CoV-S с DPP4. Антитела к MERS-CoV-S могут связываться с MERS-CoV-S с высокой аффинностью. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению являются блокирующими антителами, где антитела могут связываться с MERS-CoV-S и блокировать взаимодействие MERS-CoV-S с DPP4. В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела по настоящему изобретению могут блокировать связывание MERS-CoV-S с DPP4 и/или подавлять или нейтрализовать инфицирующую способность вируса по отношению к клеткам-хозяевам. В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела могут быть применимы для лечения субъекта, страдающего

от инфекции MERS. В определенных вариантах осуществления выбранные антитела, которые не конкурируют перекрестно за связывание со спайк-белком, используют в комбинации в виде смеси для снижения способности вируса ускользать посредством мутации в ответ на селективное давление любого компонента. При введении нуждающемуся в этом субъекту данные антитела могут снижать инфицированность вирусом субъекта, таким как MERS-CoV. Их можно использовать для уменьшения вирусной нагрузки субъекта. Их можно использовать по отдельности или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими молекулами или способами воздействия, известными в данной области, для лечения инфекции. В данном документе также показано, что данные антитела связываются с эпитопами на S-белке, которые оставались консервативными в ходе естественной эволюции вирусов на протяжении последних двух лет. Кроме того, новую модель на основе трансгенных мышей использовали для демонстрации того, что идентифицированные антитела могут профилактически защищать мышей от инфекции, а также уменьшать тяжесть ранее возникшей инфекции в стандартном подходе к лечению после инокуляции опухоли. В примере 7 показано, что введение антитела к MERS-CoV-S за 1 день до инфицирования способно снизить репликацию MERS-CoV практически до уровня обнаружения в анализах с живым вирусом и на 3 логарифма в анализах с вирусной РНК. Данное антитело демонстрирует защиту, зависящую от дозы, поскольку более низкие дозы антитела, введенного за 24 ч до инфекции, были способны блокировать MERS-CoV в меньшей степени. Кроме того, гистологический анализ ткани легких продемонстрировал, что предварительно обработанные мыши проявляли снижение, индуцированной MERS-CoV, перибронхиальной инфильтрации, утолщения стенок альвеол и общего количества очагов воспаления.

Полноразмерная аминокислотная последовательность полноразмерного спайк-белка MERS-CoV показана под SEQ ID NO: 457. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получены от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как полноразмерный спайк-белок MERS-CoV (SEQ ID NO: 457), или рекомбинантной формой MERS-CoV-S, или модифицированными фрагментами MERS-CoV-S (например, SEQ ID NO: 458), с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногеном активным фрагментом MERS-CoV-S.

Имуноген может быть биологически активным и/или иммуногенным фрагментом MERS-CoV-S или ДНК, кодирующей его активный фрагмент. Данный фрагмент может быть получен из N-концевого или C-концевого домена MERS-CoV-S. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению данный иммуноген представляет собой фрагмент MERS-CoV-S размером от 367 до 606 аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 457.

Эти пептиды можно модифицировать для добавления или замены определенных остатков для введения метки или с целью конъюгирования с молекулами носителя, такого как KLH. Например, цистеин можно добавлять либо по N-концу, либо по C-концу пептида или можно добавлять линкерную последовательность с целью получения пептида для конъюгирования, например KLH для иммунизации.

Определенные антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению способны связываться с MERS-CoV-S и нейтрализовать его активность, что определено с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*. Способность антител по настоящему изобретению связываться с MERS-CoV-S и нейтрализовать его активность можно измерить с использованием любой стандартной методики, известной специалистам в данной области, включая анализы связывания или анализы активности, описанные в данном документе.

Неограничивающие иллюстративные *in vitro* анализы для измерения связывающей и блокирующей активности описаны в примерах 4, 5 в данном документе. В примере 4 константы аффинности связывания и диссоциации антител MERS-CoV-S для MERS-CoV-S определяли посредством анализа с использованием поверхностного плазмонного резонанса. В примере 5 анализы нейтрализации использовали для определения инфицирующей способности вирус-подобных частиц MERS-CoV, содержащих спайк-белок.

Антитела, специфичные к MERS-CoV-S, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевые или C-концевые метки или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий биотин на N-конце, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности. В одном варианте осуществления метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или MPT-выявляемую метку. В определенных вариантах осуществления такие меченые антитела можно использовать в диагностических исследованиях, в том числе в диагностических исследованиях с визуализацией.

Антигенсвязывающие фрагменты антител.

Если конкретно не указано иное, термин "антитело", используемое в данном документе, следует понимать как охватывающее молекулы антител, которые содержат две тяжелые цепи иммуноглобулинов и две легкие цепи иммуноглобулинов (т.е. "молекула полного антитела"), а также их антигенсвязывающих фрагментов. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и им подобные, используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или получаемый посредством генной инженерии

полипептид или гликопротеин, специфически связывающийся с антигеном с образованием комплекса. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", используемый в данном документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которое сохраняет способность специфически связываться со спайк-белком MERS-CoV. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. В определенных вариантах осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с помощью любых подходящих стандартных технологий, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии генной инженерии, включающих манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антител, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотек "фаг-антитело") или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать, и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции при помощи методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, присоединения или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельный участок антитела (например, выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), такой как пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-тела, нанотела (например, моновалентные антитела, бивалентные антитела и т.д.), иммунофармацевтические препараты на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере один CDR, который прилегает к или находится в рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменный участок может быть димерным и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно найти в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3 и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любых иллюстративных конфигурациях, изложенных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны при помощи целого или части шарнирного или линкерного участка. Шарнирный участок может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к образованию гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любых конфигураций переменных и константных доменов, изложенных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, при помощи дисульфидной(дисульфидных) связи(связей)).

Как и в случае с полными молекулами антител антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими).

Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом того же антигена. Любой формат мультиспецифических антител, в том числе форматы иллюстративных биспецифических антител, раскрытых в данном документе, могут быть адаптированы для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению при помощи стандартных методик, доступных из уровня техники.

Получение человеческих антител.

Из уровня техники известны способы получения человеческих антител в трансгенных мышцах. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для создания человеческих антител, которые специфически связываются со спайк-белком MERS-CoV.

Для получения антитела к спайк-белку MERS-CoV можно использовать иммуноген, представляющий собой любую из следующих. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получены от мышей, иммунизированных полноразмерным, нативным спайк-белком MERS-CoV (см., например, номер доступа AFS88936.1 в базе GenBank) (SEQ ID NO: 457) или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно, спайк-белок или его фрагмент можно получить с использованием стандартных биохимических методик, а также модифицировать и использовать в качестве иммуногена. В одном варианте осуществления данный иммуноген представляет собой рецептор-связывающий домен (S1) спайк-белка MERS-CoV. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению иммуноген представляет собой фрагмент спайк-белка MERS-CoV размером от 367 до 606 аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 457.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептидный рецептор-связывающий домен спайк-белка MERS-CoV, экспрессируемый в *E.coli* или любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

При помощи технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патентный документ US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител химерные антитела к MERS-CoV-S с высокой аффинностью исходно выделяют с использованием человеческого переменного участка и мышинового константного участка. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенной мыши с геномом, содержащим переменные участки человеческих тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными мышинными участками константного участка так, что мышь продуцирует антитело, содержащее человеческий переменный участок и мышинный константный участок в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные участки человеческих тяжелой и легкой цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать целое человеческое антитело.

Как правило, мышь, полученную при помощи VELOCIMMUNE®, подвергают воздействию антигена, представляющим интерес, и из мышей, которые экспрессируют антитела, извлекают лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки можно подвергать слиянию с линией клеток миеломы с получением линий immortalized клеток гибридомы, и такие линии клеток гибридомы исследуют и отбирают для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к антигену, представляющему интерес. ДНК, кодирующая переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с константными участками требуемых изотипов тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок-антитело может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Исходно выделяют химерные антитела с высокой аффинностью, имеющие человеческий переменный участок и мышинный константный участок. Как показано в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуют и подвергают скринингу в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Мышинные константные участки заменяют требуемыми человеческими константными участками с получением полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например IgG1 или IgG4, дикого типа или модифицированные. В то время как выбранный константный участок может варьировать в зависимости от конкретного применения, в переменном участке сохраняются характеристики связывания с антигеном с высокой аффинностью или специфичностью к мишеням.

Биологические эквиваленты.

Антитела к MERS-CoV-S и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать спайк-белок MERS-CoV. Такие варианты антител и фрагментов антител содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности у описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело по настоящему изобретению, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые, по сути, являются биологическими эквивалентами антитела или фрагмента антитела по настоящему изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биологическими эквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или степень абсорбции которых значительно не отличается от таких показателей при введении одинаковой молярной дозы в аналогичных экспериментальных условиях, либо однократной дозы, либо нескольких доз. Некоторые антитела считаются эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентами по их степени всасывания, но не по их скорости абсорбции, и по-прежнему могут считаться биоэквивалентом, поскольку такие различия в скорости абсорбции предусмотрены и учитываются при введении метки, и не являются существенными для достижения в организме эффективной концентрации лекарственного средства, например, при длительном использовании, и считаются несущественными с медицинской точки зрения для конкретного изучаемого фармацевтического продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или активности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если один или несколько раз может быть осуществлен переход с референтного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшения эффективности, по сравнению с длительной терапией без такого перехода.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологическими эквивалентами, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия по отношению к условию или условиям использования, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

Биологическую эквивалентность можно выявить при помощи *in vivo* и/или *in vitro* способов. Измерения биологической эквивалентности включают, например, (a) *in vivo* тестирование у людей или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в зависимости от времени; (b) *in vitro* тестирование, которое коррелировало с данными *in vivo* тестирования биологической доступности у человека и обосновано прогнозировало их; (c) *in vivo* тестирование у людей и других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность, или биологическую доступность, или биологическую эквивалентность антитела.

Биологические эквиваленты антитела по настоящему изобретению можно сконструировать при помощи, например, создания разных замен остатков или последовательности или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся значимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить другими аминокислотами для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биологически эквивалентные антитела могут включать варианты антитела, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например мутации, которые устраняют или исключают гликозилирование.

Варианты антител к MERS-CoV-S, содержащие Fc-варианты.

В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению представленные антитела к MERS-CoV-S содержат Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или ослабляют связывания антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к MERS-CoV-S, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-участке Fc-домена, где мутация(и) увеличивают аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где значение pH варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких Fc-модификаций включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F), 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428, и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, N433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 265A (например, D265A) и/или 291A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение включает антитела к MERS-CoV-S, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L

(например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A) и 433K, и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в Fc-домене и другие мутации в пределах переменных доменов антитела, раскрытых в данном документе, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает антитела к MERS-CoV-S, химерный константный участок (C_H) тяжелой цепи, где химерный участок C_H содержит сегменты, полученные из участков C_H более чем одного изоформа иммуноглобулина. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерный участок C_H , содержащий часть домена C_H2 или весь этот домен, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с частью домена C_H3 или всем этим доменом, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению содержат химерный участок C_H с химерным шарнирным участком. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки положений 216-227 согласно нумерации по EU), полученную из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки положений 228-236 согласно нумерации по EU), полученной из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерный шарнирный участок содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерный участок C_H , описанный в данном документе, может в определенных вариантах осуществления проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, предварительную заявку на патент США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте).

Биологические характеристики антител.

В целом антитела по настоящему изобретению осуществляют свои функции путем связывания со спайк-белком MERS-CoV. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с высокой аффинностью с одной или несколькими аминокислотами в рецептор-связывающем домене (RBD) спайк-белка MERS-CoV. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают RBD димерного спайк-белка MERS-CoV (например, при 25 или 37°C) с K_D менее 20 нМ, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 4 в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают димерный MERS-CoV-S с K_D менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 500 пМ, менее 250 пМ или менее 100 пМ, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 4 в данном документе, или, по сути, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают спайк-белок MERS-CoV при периоде полудиссоциации ($t_{1/2}$) более приблизительно 2,1 мин, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 4 в данном документе, или, по сути, аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают спайк-белок MERS-CoV при $t_{1/2}$ более приблизительно 5 мин, более приблизительно 10 мин, более приблизительно 30 мин, более приблизительно 50 мин, более приблизительно 100 мин, более приблизительно 150 мин, более приблизительно 200 мин или более приблизительно 250 мин, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 4 в данном документе (например, в формате mAb-ловушки или антигенной ловушки), или, по сути, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают спайк-белок MERS-CoV с периодом полудиссоциации ($t_{1/2}$) более приблизительно 1,5 мин, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 4 в данном документе, или, по сути, аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают спайк-белок MERS-CoV при $t_{1/2}$ более приблизительно 2 мин, более приблизительно 5 мин, более приблизительно 10 мин, более приблизительно 25 мин, более приблизительно 50 мин, более приблизительно 100 мин, более приблизительно 150 мин или более приблизительно 200 мин, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, с использованием формата анализа, как описано в примере 4 в данном документе (например, в формате

mAb-ловушки или антигенной ловушки), или, по сути, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют более 90% связывания MERS-CoV-S с DPP4, что определено с использованием иммунологического анализа на основе ELISA, например, как показано в примере 2, или, по сути, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые нейтрализуют или подавляют инфицирующую способность MERS-CoV в отношении его клеток-хозяев. В определенных вариантах осуществления антитела нейтрализуют инфицирующую способность MERS-CoV-подобных псевдочастиц (MERSpp). В некоторых вариантах осуществления антитела подавляют более 90% связывания MERS-CoV с человеческими клетками-хозяевами в оптимизированном анализе нейтрализации вирусоподобных псевдочастиц (VLP), например, как показано в примере 5 в данном документе, или, по сути, в аналогичном анализе. Антитела нейтрализовывали инфицирующую способность MERSpp при IC_{50} в диапазоне от 58,9 нМ до 2,93 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с рецептор-связывающим доменом спайк-белка MERS-CoV или с фрагментом домена. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут связываться более чем с одним доменом (перекрестно-реагирующие антитела). В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут связываться с эпитопом, расположенным в рецептор-связывающем домене, содержащем аминокислотные остатки 367-606 MERS-CoV-S. В одном варианте осуществления антитела могут связываться с эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 367-606 последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 457.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут осуществлять свою функцию путем блокирования или подавления DPP4-связывающей активности, ассоциированной со спайк-белком MERS-CoV, путем связывания с любым другим участком или фрагментом полно-размерного белка, аминокислотная последовательность которого изложена под SEQ ID NO: 457.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть биспецифическими антителами. Биспецифические антитела по настоящему изобретению могут связывать один эпитоп в одном домене и могут также связывать второй эпитоп в том же или отличающемся домене спайк-белка MERS-CoV. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела по настоящему изобретению могут связывать два отличающихся эпитопа в одном и том же домене.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются со спайк-белком MERS-CoV, где антитело или его фрагмент проявляют одну или несколько из следующих характеристик:

- (a) являются полностью человеческим моноклональным антителом;
- (b) взаимодействуют с одним или несколькими аминокислотными остатками в рецептор-связывающем домене спайк-белка, выбранными из аминокислотных остатков 367-606, показанных под SEQ ID NO: 457;
- (c) связываются со спайк-белком MERS-CoV при константе диссоциации (K_D) менее 18,5 нМ, что измерено посредством анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
- (d) блокируют связывание спайк-белка MERS-CoV с дипептидилпептидазой-4 на более чем 90%, что измерено посредством анализа блокирования с помощью ELISA;
- (e) нейтрализуют способность MERS-CoV инфицировать человеческие клетки-хозяева более чем на 90% и при IC_{50} менее 4 нМ, что измерено посредством анализа нейтрализации VLP;
- (f) нейтрализуют способность MERS-CoV к инфицированию, где MERS-CoV представляет собой изолят вируса, выбранного из группы, состоящей из EMC/2012, Jordan-N3/2012, England-Qatar/2012, Al-Hasa_1_2013, Al-Hasa_2_2013, Al-Hasa_3_2013, Al-Hasa_4_2013, Al-Hasa_12, Al-Hasa_15, Al-Hasa_16, Al-Hasa_17, Al-Hasa_18, Al-Hasa_19, Al-Hasa_21, Al-Hasa_25, Bisha_1, Buraidah_1, England_1, Hafr-Al-batin_1, Hafr-Al-Batin_2, Hafr-Al-Batin_6, Jeddah_1, KFU-HKU 1, KFU-HKU 13, Munich, Qatar3, Qatar4, Riyadh_1, Riyadh_2, Riyadh_3, Riyadh_3, Riyadh_4, Riyadh_5, Riyadh_9, Riyadh_14, Taif_1, UAE и Wadi-Ad-Dawasir;
- (g) блокируют репликацию MERS-CoV in vivo у субъекта, инфицированного MERS-CoV; и
- (h) являются биспецифическим антителом, характеризующимся первой специфичностью связывания с первым эпитопом в рецептор-связывающем домене спайк-белка MERS-CoV и второй специфичностью связывания со вторым эпитопом в рецептор-связывающем домене спайк-белка MERS-CoV, где первый и второй эпитопы являются отличающимися и неперекрывающимися.

Антитела по настоящему изобретению могут владеть одной или несколькими упомянутыми выше биологическими характеристиками или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны специалисту в данной области из обзора настоящего раскрытия, включая практические примеры данного документа.

Эпитопное картирование и родственные методики.

Настоящее изобретение включает антитела к MERS-CoV-S, которые взаимодействуют с одним или несколькими аминокислотными остатками, обнаруженными в пределах одного или нескольких доменов

молекулы спайк-белка MERS-CoV, включая N-концевой домен S1 (аминокислотные остатки 1-751) и C-концевой домен S2 (аминокислотные остатки 752-1353). Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из трех или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах любого из упомянутых выше доменов молекулы спайк-белка MERS-CoV (например, линейного эпитопа в домене). В качестве альтернативы данный эпитоп может состоять из множества не непрерывных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных либо в одном из, либо в обоих упомянутых выше доменах молекулы спайк-белка (например, конформационный эпитоп).

Разные методики, известные специалисту из уровня техники данной области, можно использовать для определения наличия "взаимодействия с одним или несколькими аминокислотами" антитела в пределах полипептида или белка. Иллюстративные методики включают, например, стандартные эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, такие как описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают аланин-сканирующий мутагенез, блот-анализ пептидов (Reineke (2004), *Methods Mol. Biol.* 248:443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, экстрагирование эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000), *Prot. Sci.* 9:487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый при помощи масс-спектрометрии. В общих чертах, водородно-дейтериевый обмен включает меченое дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с белком, меченым дейтерием. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду и способные к обмену протоны в пределах аминокислот, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обмену дейтерия на водород с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в пределах аминокислот, которые не являются частью поверхности взаимодействия. Как результат, аминокислоты, которые образуют часть поверхности взаимодействия белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, проявлять относительно более высокие массы по сравнению с аминокислотами, включенными в поверхность взаимодействия. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, выявляя тем самым остатки, меченные дейтерием, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999), *Analytical Biochemistry*, 267: 252-259; Engen and Smith (2001), *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым вступают в реакцию В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут образовываться из обеих непрерывных аминокислот или не непрерывных аминокислот, сближенных за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные непрерывными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, в то время как эпитопы, образованные посредством укладки в третичную структуру, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Анализ профиля с модификацией (MAP), также известный как анализ профиля антител с модификацией структуры антигена (ASAP), представляет собой способ распределения по группам больших количеств моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, исходя из подобия профилей связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (см. US 2004/0101920, специально включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте). Каждой категории может соответствовать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного в другой категории, либо частично перекрывается с ним. Данная технология обеспечивает возможность быстрой селекции генетически идентичных антител с тем, чтобы характеристику можно было сосредоточить на генетически отличающихся антителах. При использовании в отношении скрининга гибридомы MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридомы, которые продуцируют mAb с требуемыми характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител по настоящему изобретению в группы антител, связывающих разные эпитопы.

В определенных вариантах осуществления антитела к MERS-CoV-S или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в пределах любого одного или нескольких участков, представленных в качестве примера спайк-белка MERS-CoV, либо в его природной форме, которая представлена в качестве примера под SEQ ID NO: 457, либо полученного рекомбинантно, как представлено в качестве примера под SEQ ID NO: 458, или в его фрагменте. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с внеклеточным участком, содержащим одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 367-606 спайк-белка MERS-CoV.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 358 до приблизительно 450; или из аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 451 до приблизительно положения 606 в SEQ ID NO: 457.

Настоящее изобретение включает антитела к MERS-CoV-S, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любые другие конкретные иллюстративные антитела, полученные из клеточных линий, перечисленных на фиг. 1. Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает антитела к MERS-CoV-S, которые конкурируют за связывание со спайк-белком MERS-CoV или его фрагментом с любым из специфических иллюстративных антител, полученных из гибридом, перечисленных на фиг. 1. Например, настоящее изобретение включает антитела к MERS-CoV-S, которые перекрестно конкурируют за связывание со спайк-белком MERS-CoV с одним или несколькими антителами, полученными из гибридом, перечисленных на фиг. 1.

Используя стандартные способы, известные в данной области, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и референтное антитело к MERS-CoV-S, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и референтное антитело к MERS-CoV-S по настоящему изобретению, обеспечивают возможность связывания референтного антитела со спайк-белком MERS-CoV или пептидом при насыщающих условиях. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой спайк-белка MERS-CoV. Если тестируемое антитело способно связываться с MERS-CoV-S после насыщающего связывания с референтным антителом к MERS-CoV-S, то можно сделать заключение, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того эпитопа, с которым связывается референтное антитело MERS-CoV-S. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться со спайк-белком MERS-CoV после насыщающего связывания с референтным антителом к MERS-CoV-S, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый референтным антителом к MERS-CoV-S по настоящему изобретению.

Для определения того, имеет ли место конкуренция за связывание с референтным антителом к MERS-CoV-S, описанную выше методику исследования связывания осуществляют в двух направлениях: в первом направлении обеспечивают возможность связывания референтного антитела со спайк-белком MERS-CoV при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой MERS-CoV-S. Во втором направлении обеспечивают возможность связывания референтного антитела с молекулой MERS-CoV при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания референтного антитела с молекулой MERS-CoV-S. Если в обоих направлениях только первое (насыщающие условия) антитело способно к связыванию молекулы MERS-CoV-S, то делают заключение, что тестируемое и референтное антитела конкурируют за связывание с MERS-CoV-S. Специалисту в данной области будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с референтным антителом, может необязательно связываться с идентичным эпитопом, как и референтное антитело, но может пространственно блокировать связывание референтного антитела путем связывания перекрывающего или прилегающего эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающим эпитопом, если каждое конкурентно подавляет (блокирует) связывание других с антигеном. То есть, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела подавляет связывание других по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, что измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990, 50:1495-1502). Альтернативно, в двух антителах присутствует одинаковый эпитоп, если, по сути, все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого антитела. В двух антителах присутствует перекрывающийся эпитоп, если некоторые аминокислотные мутации, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого антитела.

Дополнительные стандартные эксперименты (например, мутации в пептидах и анализы связывания) затем можно осуществлять для подтверждения того, обусловлен ли факт наблюдаемого отсутствия связывания тестируемого антитела связыванием с одним и тем же эпитопом, что и референтное антитело, или пространственное блокирование (или другой феномен) несет ответственность за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа можно провести с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, существующего в данной области.

Иммуноконъюгаты.

Настоящее антитело охватывает человеческое моноклональное антитело к MERS-CoV-S, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгатом"), таким как анатоксин или противовирусное лекарственное средство для лечения инфекции MERS. Используемый в данном документе термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химическим или биологическим способом связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым или фрагментом-репортером, ферментом, пептидом или белком, или терапевтическим средством. Данное антитело может быть связано с радиоактивным веществом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом, или белком, или терапевтическим средством в любом месте по всей длине молекулы, которая является настолько длинной, что они способны связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитела и лекарственного средства и белки слияния антитело-токсин. В одном варианте осуществления данное средство может представлять собой второе отличающееся ан-

титело к спайк-белку MERS-CoV. В определенных вариантах осуществления данное антитело может быть конъюгировано со средством, которое является специфичным по отношению к клеткам, инфицированным вирусом. При выборе типа терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к MERS-CoV-S, принимают во внимание подлежащее лечению состояние и достигаемый требуемый терапевтический эффект. Из уровня техники известны примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов; см., например, WO 05/103081.

Мультиспецифические антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, которые специфичны к нескольким целевым полипептидам. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

Любые из мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению или их вариантов можно сконструировать с использованием стандартных молекулярно-биологических методик (например, методики рекомбинантных ДНК и экспрессии белков), известных специалисту в данной области.

В некоторых вариантах осуществления антитела, специфичные к MERS-CoV-S, получают в биспецифическом формате ("биспецифические"), в котором переменные участки, связывающиеся с отличающимися доменами спайк-белка MERS-CoV, соединены вместе для придания двухдоменной специфичности одной связывающей молекуле. Соответственно, полученные свойства биспецифичности могут усиливать общую ингибиторную эффективность по отношению к спайк-белку MERS-CoV посредством как увеличения специфичности, так и avidности связывания. Переменные участки, специфичные к отдельным доменам (например, сегменты N-концевого домена), или те, которые могут связываться с разными участками в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждому участку одновременно связываться с отдельными эпитопами, или с разными участками в пределах одного домена. В одном примере для создания биспецифичности переменный участок тяжелой цепи (V_H) из связывающей молекулы со специфичностью к одному домену подвергают рекомбинации с переменным участком легкой цепи (V_L) из ряда связывающих молекул со специфичностью ко второму домену для идентификации неродственных партнеров V_L , которые можно объединять в пару с исходным V_H без нарушения первоначальной специфичности V_H . Таким же способом можно комбинировать отдельный сегмент V_L (например, V_{L1}) с двумя разными V_H -доменами (например, V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих "плечей" (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Использование отдельного сегмента V_L снижает сложность системы и тем самым упрощает и увеличивает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических молекул (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

Альтернативно, антитела, которые связывают несколько доменов и вторую мишень, такие как без ограничения, например, второе отличающееся антитело к MERS-CoV-S, можно получать в биспецифическом формате с использованием описанных в данном документе методик или других методик, известных специалисту в данной области. Переменные участки антител, связывающиеся с отличающимися участками, можно соединять вместе с переменными участками, которые связываются с соответствующими сайтами, например, на внеклеточном домене MERS-CoV-S, для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Таким образом, сконструированные биспецифические молекулы с данными свойствами служат в качестве молекул с двойной функцией. Переменные участки со специфичностью к внеклеточному домену комбинируют с переменным участком со специфичностью к наружной части внеклеточного домена и объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждому переменному участку связываться с отдельными антигенами.

Иллюстративное антитело в биспецифическом формате, которое можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает применение C_{H3} -домена первого иммуноглобулина (Ig) и C_{H3} -домена второго иммуноглобулина Ig, где C_{H3} -домены первого и второго Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой и где различие по меньшей мере в одну аминокислоту уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует различие по аминокислотам. В одном варианте осуществления C_{H3} -домен первого Ig связывает белок А, а C_{H3} -домен второго Ig содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (нумерация экзонов согласно IMGT; H435R нумерация согласно EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах второго C_{H3} : D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае с антителами IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае с антителами IgG2 и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае с антителами IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанные выше, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-во-впадины, обычную легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и т.п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-тело, лейциновую застежку, DuoBody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² биспецифические форматы (см., например, Klein et al. 2012, mAbs, 4:6, 1-11, и источники, упоминаемые в данном документе, для изучения вышеизложенных форматов). Биспецифические антитела также можно сконструировать при помощи конъюгации пептидов/нуклеиновых кислот, например, где не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем собираются в мультимерные комплексы с определенными составом, валентностью и геометрической формой. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтические составы и введение с целью терапии.

Настоящее изобретение предлагает терапевтические композиции, содержащие антитела к MERS-CoV-S или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению.

Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят с подходящими носителями, наполнителями и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и им подобных. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном многим химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие (катионные или анионные) липиды пузырьки (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло воде" и "вода в масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Доза антитела может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут осуществлять введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и им подобных. При использовании антитела по настоящему изобретению для лечения у пациента-взрослого заболевания или нарушения или для предупреждения заболевания преимущественным является введение антитела по настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 60 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 60, от приблизительно 10 до приблизительно 50 или от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно регулировать. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в начальной дозе по меньшей мере от приблизительно 0,1 до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 10 до приблизительно 200 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. В определенных вариантах осуществления после начальной дозы может следовать введение вторичной дозы или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же или меньше начальной дозы, где повторные введения доз препарата разделены промежутком по меньшей мере от 1 до 3 дней; по меньшей мере в одну неделю, по меньшей мере 2 неделями; по меньшей мере 3 неделями; по меньшей мере 4 неделями; по меньшей мере 5 неделями; по меньшей мере 6 неделями; по меньшей мере 7 неделями; по меньшей мере 8 неделями; по меньшей мере 9 неделями; по меньшей мере 10 неделями; по меньшей мере 12 неделями или по меньшей мере 14 неделями.

Известны различные системы доставки и их можно использовать для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и др.), и ее можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию также можно доставлять в пузырьке, в частности, в липосоме (см., например, Langer (1990), Science, 249:1527-1533).

Применение наночастиц для доставки антитела по настоящему изобретению также предусмотрено в данном документе. Наночастицы, конъюгированные с антителами, можно использовать как для терапевтических, так и для диагностических применений. Наночастицы, конъюгированные с антителами, и способы их получения и применения подробно описаны в публикации Arguebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в данный документ посредством ссылки. Наночастицы

можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для целенаправленного воздействия на инфицированные вирусом клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны в патентных документах, например, US 8257740 или US 8246995, каждый из которых включен во всей своей полноте.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать насос. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи от мишени для композиции, при этом требуется лишь часть системной дозы.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, интракраниальных, интраперитонеальных и внутримышечных инъекций, для капельного введения и т.п. Эти инъекционные препараты можно получать при помощи известных способов. Например, инъекционные препараты можно получать, например, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. Водная среда для инъекций представляет собой, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.п., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксипропиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.п. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.п., которые можно использовать в комбинации с растворяющим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Полученным таким способом инъекционным составом предпочтительно наполняют подходящую ампулу.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению широко используется устройство для доставки в виде шприца-ручки. Такое устройство для доставки в виде шприца-ручки может быть многоразового и одноразового использования. В устройстве для доставки в виде шприца-ручки многоразового использования, как правило, используется заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция в картридже была введена и картридж опустел, пустой картридж можно легко утилизировать и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем устройство для доставки в виде шприца-ручки можно использовать повторно. В устройстве для доставки в виде шприца-ручки одноразового использования заменяемый картридж отсутствует. Вместо этого устройство для доставки в виде шприца-ручки одноразового использования выпускают предварительно наполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре устройства. После того как резервуар опорожняют от фармацевтической композиции, все устройство утилизируют.

Многочисленные устройства для доставки в виде шприца-ручки или автоинъектора многоразового использования используются при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают, разумеется, без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), при этом упомянуты лишь несколько из них. Примеры устройств для доставки в виде шприца-ручки многоразового использования, используемых при подкожном введении фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, разумеется, без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс), при этом упомянуты лишь несколько из них.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в лекарственных формах в стандартной дозе, подходящей для подбора дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в виде стандартной дозы включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные формы (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; предпочтительно, чтобы содержание антитела для других лекарственных форм составляло от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг, а в особенности в форме инъекций.

Применения антител в терапии.

Антитела по настоящему изобретению применимы для лечения и/или предупреждения заболевания, или нарушения, или состояния, ассоциированных с коронавирусом MERS, вызывающим инфекцию MERS, и/или для уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с инфекцией MERS.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению применимы для лечения субъектов, страдающих от тяжелой и острой респираторной инфекции, вызванной коронавирусом MERS. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению применимы для уменьшения концентрации вируса или снижения вирусной нагрузки у хозяина. В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению применимы в предупреждении или уменьшении воспаления в легких пациента с MERS. В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению применимы в предупреждении или уменьшении интерстициального, перибронхиального или периваскулярного воспаления, альвеолярного повреждения и изменений в плевре у субъекта с MERS.

Одно или несколько антител по настоящему изобретению можно вводить для ослабления, или предупреждения, или снижения тяжести одного или нескольких симптомов или состояний заболевания или нарушения. Антитела можно использовать для уменьшения тяжести или снижения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции MERS, включающих без ограничения повышенную температуру, кашель, затруднение дыхания, пневмонию, диарею, функциональную недостаточность органов (например, почечную недостаточность и ренальную дисфункцию), септический шок и летальный исход.

В данном документе также предусматривается использование с профилактической целью одного или нескольких антител по настоящему изобретению у субъектов с риском развития инфекции MERS, таких как индивиды с ослабленным иммунитетом, пожилые люди (возрастом старше 65 лет), дети возрастом младше 2 лет, туристы, посещающие страны Ближнего Востока (например, Саудовскую Аравию, Объединенные Арабские Эмираты и Катар), работники сферы здравоохранения, индивиды, контактирующие с верблюдами или летучими мышами по роду деятельности или с целью развлечения, члены семьи, находящиеся рядом с пациентом, имеющим MERS, взрослые или дети, находящиеся в тесном контакте с индивидами, у которых подтверждена или подозревается инфекция MERS, и пациенты, имеющие нарушения в анамнезе (например, повышенный риск легочной инфекции, заболевание сердечно-сосудистой системы или диабет).

В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению данные антитела используют для получения фармацевтической композиции или лекарственного препарата для лечения пациентов, страдающих от инфекции MERS. В другом варианте осуществления по настоящему изобретению данные антитела используют в качестве вспомогательной терапии с любым другим средством или любой другой терапией, известной специалисту в данной области, применимой для лечения или уменьшения тяжести инфекции MERS.

Виды комбинированной терапии.

Виды комбинированной терапии могут включать антитело kMERS-CoV-S по настоящему изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно преимущественно объединять с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по настоящему изобретению. Антитела по настоящему изобретению можно синергически объединять с одним или несколькими лекарственными средствами или с терапией, используемыми для лечения MERS. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению можно объединять со вторым терапевтическим средством для снижения концентрации вируса у пациента с инфекцией MERS или для уменьшения тяжести одного или нескольких симптомов инфекции.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с противовоспалительными средствами (например, кортикостероидами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), противомикробным лекарственным средством, отличающимся антителом к спайк-белку MERS-CoV, противовирусным лекарственным средством, интерфероном-альфа-2b с внутримышечным введением рибавирина, плазмой крови реконвалесцентов, ингибитором основной вирусной протеазы и ингибиторами проникновения/слияния, целенаправленно воздействующими на спайк-белок MERS-CoV, вакциной против MERS-CoV, антибиотиками, пищевыми добавками, такими как антиоксиданты, или любым другим паллиативным терапевтическим средством для лечения инфекции MERS.

В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело к спайк-белку MERS-CoV. В данном документе предполагается использование комбинации ("смеси") антител с широкой нейтрализующей или подавляющей активностью по отношению к MERS-CoV. В некоторых вариантах осуществления не конкурирующие антитела можно объединять и вводить нуждающемуся в этом субъекту для снижения способности вируса MERS ускользать посредством быстрой мутации от селективного давления. В некоторых вариантах осуществления антитела, входящие в состав комбинации, связываются с эпитопами на спайк-белке, которые являются отличающимися и неперекрывающимися. Антитела, входящие в состав комбинации, могут блокировать связывание

MERS-CoV с DPP4 или могут предупреждать/подавлять слияние с мембраной. Антитела, входящие в состав комбинации, могут подавлять активность MERS-CoV у одного или нескольких изолятов MERS-CoV, включающих без ограничения EMC/2012, Jordan-N3/2012, England-Qatar/2012, Al-Hasa_1_2013, Al-Hasa_2_2013, Al-Hasa_3_2013, Al-Hasa_4_2013, Al-Hasa_12, Al-Hasa_15, Al-Hasa_16, Al-Hasa_17, Al-Hasa_18, Al-Hasa_19, Al-Hasa_21, Al-Hasa_25, Bisha_1, Buraidah_1, England_1, Hafr-Al-batin_1, Hafr-Al-Batin_2, Hafr-Al-Batin_6, Jeddah_1, KFU-HKU_1, KFU-HKU_13, Munich, Qatar3, Qatar4, Riyadh_1, Riyadh_2, Riyadh_3, Riyadh_3, Riyadh_4, Riyadh_5, Riyadh_9, Riyadh_14, Taif_1, UAE и Wadi-Ad-Dawasir.

Также в данном документе предполагается использование комбинации антител к MERS-CoV-S по настоящему изобретению, где комбинация содержит одно или несколько антител, которые не конкурируют перекрестно. В некоторых вариантах осуществления данная комбинация включает первое антитело с широким спектром нейтрализующей активности и второе антитело с активностью против узкого спектра изолятов, и это антитело не конкурирует перекрестно с первым антителом.

Используемое в данном документе выражение "в комбинации с" означает, что дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить до введения, одновременно с ним или после введения антитела MERS-CoV-S по настоящему изобретению. Выражение "в комбинации с" также включает последовательное или совместное введение антитела к MERS-CoV-S и второго терапевтического средства.

Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту до введения антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю до, за 72 ч до, за 60 ч до, за 48 ч до, за 36 ч до, за 24 ч до, за 12 ч до, за 6 ч до, за 5 ч до, за 4 ч до, за 3 ч до, за 2 ч до, за 1 час до, за 30 мин до, за 15 мин до, за 10 мин до, за 5 мин до или менее чем за 1 мин до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту после введения антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, через 5 мин после, через 10 мин после, через 15 мин после, через 30 мин после, через 1 ч после, через 2 ч после, через 3 ч после, через 4 ч после, через 5 ч после, через 6 ч после, через 12 ч после, через 24 ч после, через 36 мин после, через 48 ч после, через 60 ч после, через 72 ч после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению. "Одновременное" введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение субъекту антитела к MERS-CoV-S и дополнительного терапевтически активного компонента в единичной дозированной форме или в отдельных дозированных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 мин или менее относительно друг друга. При введении в отдельных дозированных формах каждую дозированную форму вводят посредством одного и того же пути (например, оба антитела к MERS-CoV-S и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т.д.); альтернативно, каждую дозированную форму можно вводить разными путями (например, антитело к MERS-CoV-S можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). Так или иначе, все введения компонентов в единичной дозированной форме, в отдельных дозированных формах или в отдельных дозированных формах разными путями считаются "одновременным введением" для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего изобретения введение антитела к MERS-CoV-S "до", "одновременно" с введением или "после" (как эти термины определены в данном документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением антитела к MERS-CoV-S "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело к MERS-CoV-S по настоящему изобретению составлено совместно с одним или несколькими дополнительным(и) терапевтически активным(и) компонентом(ами), описанными в данном документе в других частях.

Схемы введения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления однократную дозу антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к MERS-CoV-S и любые дополнительные терапевтически активные средства, упомянутые в данном документе) можно вводить нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению многократные дозы антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к MERS-CoV-S и любые дополнительные терапевтически активные средства, упомянутые в данном документе) можно вводить нуждающемуся в этом субъекту в течение определенного периода. Способы в соответствии с данным аспектом по настоящему изобретению включают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению. Используемое в данном документе выражение "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к MERS-CoV-S

вводят субъекту в разные моменты времени, например в разные дни, разделенные предварительно определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к MERS-CoV-S, затем одной или нескольких вторичных доз антитела к MERS-CoV-S, а затем необязательно одной или нескольких третичных доз антитела к MERS-CoV-S.

Выражения "первичная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также обозначается как "исходная доза"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальных, вторичных и третичных доз могут содержать одинаковое количество антитела к MERS-CoV-S, но, как правило, могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако согласно определенным вариантам осуществления количество антитела к MERS-CoV-S, содержащегося в первичных, вторичных и/или третичных дозах, отличается друг от друга (например, при необходимости регулируется в сторону повышения или понижения) на протяжении курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или больше (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале режима терапии в виде "ударных доз", затем последующие дозы вводят с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

В определенных иллюстративных вариантах осуществления по настоящему изобретению каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-48 ч (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, означает в последовательности из нескольких введений дозу антитела к MERS-CoV-S, которую вводят пациенту до введения ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных введений доз.

Способы в соответствии с данным аспектом по настоящему изобретению могут включать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антагониста антитела к MERS-CoV-S. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) вторичные дозы. Аналогично, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) третичные дозы.

В определенных вариантах осуществления частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может отличаться в ходе схемы лечения. Частоту введения может регулировать врач в ходе курса лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Применения антител в диагностике.

Антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению можно использовать для детектирования и/или измерения MERS-CoV в образце, например, для диагностических целей. Ряд вариантов осуществления предполагает использование одного или нескольких антител по настоящему изобретению в анализах для детектирования заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Иллюстративные диагностические анализы для MERS-CoV могут включать, например, приведение полученного от пациента образца в контакт с антителом к MERS-CoV-S по настоящему изобретению, где антитело к MERS-CoV-S мечено детектируемой меткой или молекулой-репортером, или используется в качестве захватывающего лиганда для избирательного выделения MERS-CoV из образцов пациента. Альтернативно, немеченное антитело к MERS-CoV-S можно использовать для диагностических целей в комбинации со вторым антителом, которое само по себе является меченым с возможностью его детектирования. Детектируемая метка или молекула-репортер может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, или ¹²⁵I; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для детектирования или измерения MERS-CoV в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах MERS-CoV в соответствии с настоящим изобретением, включают образец любой ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит поддающиеся детектированию либо спайк-белок MERS-CoV, либо его фрагменты в нормальном или патологическом состояниях. Как правило, уровни спайк-белка MERS-CoV в конкретном образце, полученные от здорового пациента (например, пациента, не страдающего от заболевания, ассоциированного с MERS-CoV), можно измерять для начального установления исходного уровня или стандартного уровня MERS-CoV. Затем исходный уровень MERS-CoV можно сравнивать с уровнями MERS-CoV, измеренными в образцах, полученных от индивидов с подозрением на MERS-CoV-

ассоциированное состояние или имеющих MERS-CoV-ассоциированное состояние или симптомы, ассоциированные с таким состоянием.

Антитела, специфичные к спайк-белку MERS-CoV-S, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевые или C-концевые метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляют собой биотин. В анализе связывания по расположению метки (если она присутствует) можно определить ориентацию пептида по отношению к поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий биотин на N-конце, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет расположена дистально по отношению к поверхности.

Примеры

Следующие примеры изложены для того, чтобы обеспечить специалистов в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции по настоящему изобретению, и они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количеству, температуре и т.п.), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, то части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Получение человеческих антител к спайк-белку MERS-CoV.

Человеческие антитела к спайк-белку MERS-CoV получали с использованием мыши VELOCIMMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные участки тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный спайк-белок MERS-CoV, с последующим введением повторной дозы, содержащей очищенный фрагмент спайк-белка от 367 до 606 аминокислот с номером доступа AFS88936.1 в GenBank (SEQ ID NO: 457).

Последовательности кДНК, оптимизированные по кодонам, которые кодируют S-белок MERS-CoV (EMC/2012 - GenBank JX869059), синтезировали с помощью GeneArt и клонировали в стандартные векторы экспрессии. Плазмиды, кодирующие варианты S-белка MERS-CoV по рецептор-связывающему домену (RBD), получали путем мутагенеза с использованием QuikChange II (Agilent Technologies) согласно инструкциям изготовителя.

Контролировали гуморальный иммунный ответ с использованием иммунологического анализа, специфичного для MERS-CoV-S. При достижении требуемого иммунного ответа собирали спленоциты и подвергали их слиянию с клетками мышьяной миеломы для сохранения их жизнеспособности и образования линий клеток гибридомы. Проводили скрининг и отбор линий клеток гибридомы для идентификации линий клеток, которые продуцировали антитела, специфичные для MERS-CoV-S. В общей сложности из 696 гибридом, которые экспрессировали антигенспецифические антитела, было обнаружено, что 182 блокируют взаимодействие между DPP4 и спайк-белком, а 123 блокируют проникновение MERSpp в клетку-мишень. Иллюстративные линии клеток, полученные данным способом, обозначили как HBVX06H05, HBVX11H04, HBVX11D02, HBVZ10E10, HBVY09F08, HBVZ05G02, HBVZ09B06, HBVY01F08, HBVY10G02, HBVY04B06, HBVY07D10, HBVZ08A09, HBVZ05G04, HBVY06C07, HBVY03H06, HBVZ10G06, HBVZ04F10, HBVX11E09, HBVY06H09, HBVZ05B11, HBVY02E05 и HBVZ04C07. Линии клеток использовали для получения нескольких химерных антител к MERS-CoV-S (т.е. антител, имеющих человеческие вариабельные домены и мышьяные константные домены); иллюстративные антитела, полученные данным способом, обозначали как H1M15277N, H2aM15279N, H1M15280N, H2aM15278N, H2aM15271N, H1M15267N, H2bM15292N, H2bM15291N, H1M15290N, H1M15293N, H1M15289N, H1M15269N, H2aM15287N, H1M15288N, H2aM15268N, H2aM15270N, H2aM15281N и H2aM15272N.

В табл. 1 показаны выбранные химерные антитела, полученные из супернатантов соответствующих гибридом.

Таблица 1

Ab, PID №	Название клона
H1M15267N	HBVX11H04
H1M15269N	HBVY07D10
H1M15277N	HBVX06H05
H1M15280N	HBVZ09B06
H1M15288N	HBVY02E05
H1M15289N	HBVY03H06
H1M15290N	HBVZ04F10
H1M15293N	HBVZ10G06
H2aM15268N	HBVY04B06
H2aM15270N	HBVY09F08
H2aM15271N	HBVY10G02
H2aM15272N	HBVZ05G02
H2aM15278N	HBVX11D02
H2aM15279N	HBVY01F08
H2aM15281N	HBVZ10E10
H2aM15287N	HBVX11E09
H2bM15291N	HBVZ05G04
H2bM15292N	HBVZ08A09

Также антитела к MERS-CoV-S выделяли непосредственно из антиген-позитивных мышинных В-клеток без слияния с клетками миеломы, что описано в патенте США № 7582298, который специально включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. С помощью данного способа получили несколько полностью человеческих антител к MERS-CoV-S (т.е. антител, имеющих человеческие переменные домены и человеческие константные домены); иллюстративные антитела, полученные с помощью данного способа, обозначали как H4sH15188P, H1H15188P, H1H15211P, H1H15177P, H4sH15211P, H1H15260P2, H1H15259P2, H1H15203P, H4sH15260P2, H4sH15231P2, H1H15237P2, H1H15208P, H1H15228P2, H1H15233P2, H1H15264P2, H1H15231P2, H1H15253P2, H1H15215P и H1H15249P2.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами данного примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

Пример 2. Характеристика супернатантов гибридом.

Анализ связывания на основе ELISA проводили для идентификации содержащих антитела супернатантов (полученных из описанных выше гибридом), которые связывались со спайк-белком MERS-CoV. Белком, имеющим в составе рецептор-связывающий домен из MERS-CoV-S (aa E367-Y606), экспрессируемый с Fc-частью молекулы человеческого IgG1 на C-конце (MERS RBD-hFc; SEQ ID NO: 458), покрывали лунки 96-луночного планшета в концентрации 2 мкг/мл в буфере PBS и оставляли на ночь при 4°C. Сайты неспецифического связывания дополнительно блокировали с использованием 0,5% (мас./об.) раствора BSA в PBS. Супернатанты гибридом разбавляли 1:50 блокирующим буфером и оставляли их для связывания с лунками, покрытыми RBD MERS, на 1 ч при комнатной температуре. После промывания связавшиеся антитела детектировали с использованием поликлонального антитела к hFc, конъюгированного с HRP (Jackson Immunochemical). Образцы обрабатывали раствором 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB; BD Biosciences) для получения колориметрической реакции, а затем нейтрализовали 1 М серной кислотой перед измерением поглощения при 450 нм на планшет-ридере Victor (Perkin Elmer). Результаты представлены на фиг. 1. Интенсивность сигнала при 450 нм использовали для отбора антител с целью дальнейшей их характеристики.

Константы скорости ассоциации и диссоциации связывания (k_a и k_d соответственно), равновесные константы диссоциации и периоды полудиссоциации (K_D и $t_{1/2}$ соответственно) в отношении связывания антигена с супернатантами гибридом определяли с помощью анализа в режиме реального времени на биологических сенсорах, функционирующих на основе спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса, на приборе Biacore 4000 или Biacore T200 (подробности описаны в примере 4). Как показано на фиг. 1, 21 из 22 антител, продуцируемых гибридомами, связывались со спайк-белком MERS-CoV при значениях K_D , варьирующих от 245 пМ до 21,5 нМ.

Способность антител к спайк-белку коронавируса блокировать рецептор-связывающий домен MERS (MERS-RBD), связывающийся с родственником партнером для связывания, человеческой дипептидилпептидазой-4 (hDPP4), оценивали при помощи иммунологического анализа на основе ELISA. Вкратце, человеческой дипептидилпептидазой-4, экспрессируемой с меткой 6xHistidine на C-конце (hDPP4-6His; R&D № по кат. 1180-SE), покрывали лунки 96-луночного планшета в концентрации 2 мкг/мл в буфере PBS и оставляли на ночь при 4°C. Сайты неспецифического связывания дополнительно блокировали с использованием 0,5% (мас./об.) раствора BSA в PBS. Этот планшет использовали для

измерения MERS-RBD (aa E367-Y606), экспрессируемого с Fc-частью молекулы человеческого IgG1 на C-конце (MERS RBD-hFc; SEQ ID NO: 458), в растворе MERS RBD-hFc, который предварительно уравновесили путем разбавления супернатантов, содержащих антитело к MERS. MERS RBD-hFc при фиксированной концентрации 300 пМ предварительно смешивали с 10% объемом супернатантов, содержащих антитело к MERS, с последующим инкубированием при комнатной температуре (RT) в течение 1 ч для того, чтобы связывание антитело-антиген достигло равновесия. Растворы уравновешенных образцов затем переносили в лунки, покрытые hDPP4-6his. После 1 ч связывания при RT планшеты отмывали и связывание RBD MERS детектировали с использованием поликлонального антитела к hFc, конъюгированного с HRP (Jackson Immunochemical). Образцы обрабатывали раствором ТМБ (ТМБ; BD Biosciences, № 51-2606KC и 51-2607KC) для получения колориметрической реакции, а затем нейтрализовывали 1 М серной кислотой перед измерением поглощения при 450 нм на планшет-ридере Victor X5. Поглощение, измеренное отдельно для фиксированной концентрации MERS RBD-hFc, определяли как 0% блокирование, а поглощение, измеренное для образца без добавления MERS RBD-hFc, определяли как 100% блокирование. Процент блокирования рассчитывали как соотношение снижения сигнала, наблюдаемого в присутствии антитела, и разницы между сигналом для MERS RBD-hFc отдельно и фоновым сигналом (сигналом от антитела к hFc, конъюгированного с HRP, отдельно), вычитаемым из 100% блокирования, как определено выше.

Как показано на фиг. 1, 17 из 22 антител к MERS-CoV-S, полученных из отдельных независимых гибридом, блокировали более чем 90% связывания спайк-белка MERS-CoV с DPP4.

Антитела к MERS-CoV-S, полученные из отдельных независимых гибридом, тестировали на предмет нейтрализации инфицирующей способности MERS (подробности анализа приведены в примере 5). Как показано на фиг. 1, 12 из 22 антител к MERS-CoV-S, продуцируемых линиями клеток гибридомы, подавляли или нейтрализовывали более чем 90% инфицирующей способности MERS при IC₅₀, варьирующем от 68,4 пМ до 3,58 нМ.

Пример 3. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи.

В табл. 2 изложены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных участков и CDR тяжелой и легкой цепей выбранных антител к MERS-CoV-S по настоящему изобретению.

Таблица 2

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H15177P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H15188P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H15203P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H15208P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H15211P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H15215P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H15228P2	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H15231P2	114	116	118	120	106	108	110	112
H1H15233P2	122	124	126	128	106	108	110	112
H1H15237P2	130	132	134	136	106	108	110	112
H1H15249P2	138	140	142	144	106	108	110	112
H1H15253P2	146	148	150	152	106	108	110	112
H1H15259P2	154	156	158	160	162	164	166	168
H1H15260P2	170	172	174	176	162	164	166	168

H1H15264P2	178	180	182	184	162	164	166	168
H1M15267N2	186	188	190	192	194	196	198	200
H1M15269N	202	204	206	208	210	212	214	216
H1M15277N	218	220	222	224	226	228	230	232
H1M15280N	234	236	238	240	242	244	246	248
H1M15289N	250	252	254	256	258	260	262	264
H1M15290N	266	268	270	272	274	276	278	280
H1M15293N	282	284	286	288	290	292	294	296
H2M15268N	298	300	302	304	306	308	310	312
H2M15270N	314	316	318	320	322	324	326	328
H2M15271N	330	332	334	336	338	340	342	344
H2M15272N	346	348	350	352	354	356	358	360
H2M15278N	362	364	366	368	370	372	374	376
H2M15279N	378	380	382	384	386	388	390	392
H2M15281N	394	396	398	400	402	404	406	408
H2M15287N	410	412	414	416	418	420	422	424
H2M15291N	426	428	430	432	434	436	438	440
H2M15292N	442	444	446	448	450	452	454	456

Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот изложены в табл. 3.

Таблица 3

Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H15177P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H15188P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H15203P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H15208P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H15211P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H15215P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H15228P2	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H15231P2	113	115	117	119	105	107	109	111
H1H15233P2	121	123	125	127	105	107	109	111
H1H15237P2	129	131	133	135	105	107	109	111
H1H15249P2	137	139	141	143	105	107	109	111
H1H15253P2	145	147	149	151	105	107	109	111
H1H15259P2	153	155	157	159	161	163	165	167
H1H15260P2	169	171	173	175	161	163	165	167
H1H15264P2	177	179	181	183	161	163	165	167

H1M15267N2	185	187	189	191	193	195	197	199
H1M15269N	201	203	205	207	209	211	213	215
H1M15277N	217	219	221	223	225	227	229	231
H1M15280N	233	235	237	239	241	243	245	247
H1M15289N	249	251	253	255	257	259	261	263
H1M15290N	265	267	269	271	273	275	277	279
H1M15293N	281	283	285	287	289	291	293	295
H2M15268N	297	299	301	303	305	307	309	311
H2M15270N	313	315	317	319	321	323	325	327
H2M15271N	329	331	333	335	337	339	341	343
H2M15272N	345	347	349	351	353	355	357	359
H2M15278N	361	363	365	367	369	371	373	375
H2M15279N	377	379	381	383	385	387	389	391
H2M15281N	393	395	397	399	401	403	405	407
H2M15287N	409	411	413	415	417	419	421	423
H2M15291N	425	427	429	431	433	435	437	439
H2M15292N	441	443	445	447	449	451	453	455

Изложенные в данном документе антители обозначали, как правило, в соответствии со следующей номенклатурой: после префикса Fc (например, "H4xH", "H1M", "H2M" и т.д.) следует числовой идентификатор (например, "15177", "15228", "15268" и т.д., как показано в табл. 2), а затем следует суффикс "P", "P2", "N" или "B". Таким образом, в соответствии с данной номенклатурой антители в данном документе может быть обозначено как, например, "H1H15177P", "H1H15228P2", "H2M15268N" и т.д. Префиксы H4sH, H1M и H2M в используемых в данном документе обозначениях антител указывают на конкретный Fc-участок изоформа антитела. Например, антитело "H4sH" имеет Fc человеческого IgG4 с двумя или более аминокислотными изменениями, как раскрыто в US20100331527, антитело "H1M" содержит Fc мышинового IgG1, и антитело "H2M" содержит Fc мышинового IgG2 (изотип а или b) (все варибельные участки являются полностью человеческими, на что указывает первая буква "H" в обозначении антитела). Специалист в данной области примет во внимание, что антитело с Fc конкретного изоформа можно превращать в антитело с Fc иного изоформа (например, антитело с Fc мышинового IgG1 можно превращать в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае варибельные домены (включая CDR), которые показаны числовыми идентификаторами, показанными в табл. 2, будут такими же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или, по сути, аналогичными независимо от природы Fc-домена.

Пример 4. Определение связывания антитела с MERS-CoV-S с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Константы скорости ассоциации и диссоциации связывания (k_a и k_d соответственно), равновесные константы диссоциации и периоды полудиссоциации (K_D и $t_{1/2}$ соответственно) в отношении связывания антигена с очищенными антителами к MERS-CoV-S и супернатантами гибридом определяли с помощью анализа в режиме реального времени на биологических сенсорах, функционирующих на основе спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса, на приборе Biacore 4000 или Biacore T200. Поверхность сенсора Biacore модифицировали либо кроличьим поликлональным антителом к иммуноглобулину мыши (GE, № BR-1008-38), либо мышинным моноклональным антителом к человеческому Fc (GE, № BR-1008-39) для захвата примерно 100-900 RU моноклональных антител к MERS-CoV-S, экспрессируемых либо с мышинным Fc, либо с человеческим Fc соответственно. Реагенты MERS-CoV тестировали на связывание антител к MERS-CoV-S, включающих рекомбинантный рецептор-связывающий домен MERS-CoV-S, экспрессируемый с Fc человеческого IgG1 на C-конце (MERS RBD-hFc; SEQ ID NO: 458). Реагент MERS-CoV в разных концентрациях, варьировавших от 3,7 до 200 нМ, распыляли над моноклональным антителом к MERS-CoV-S, захваченным поверхностью, при скорости потока 30 мкл/мин для Biacore 4000 или при 50 мкл/мин для Biacore T200. Связывание реагента MERS-CoV с захваченным моноклональным антителом регистрировали в течение 3-5 мин, тогда как их диссоциацию из комплекса с антителами регистрировали в течение 7-10 мин в подвижном буфере HBST (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% (об./об.) Surfactant P20). Эксперименты проводили при 25°C. Константы кинетической скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и приближения данных в модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для построения и обработки кривых Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации связывания (X_D) и периоды полудиссоциации ($t_{1/2}$) затем рассчитывали исходя из констант кинетической скорости:

$$K_D (M) = k_d / k_a \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = [\ln 2 / (60 \times k_d)].$$

В первоначальном эксперименте равновесные константы диссоциации и периоды полудиссоциации определяли для супернатантов 22 гибридом (описанных в примере 2).

В дальнейших экспериментах очищенные антитела тестировали в отношении связывания со спайк-белком MERS-CoV, используя анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса, описанный выше.

Таблица 4

Захващенное mAb	Кинетика связывания при 25°C					
	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ Связанный Ag (RU)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	t _{1/2} (мин.)
H2aM15281N	223 ± 0,8	127	2,10E+06	8,18E-04	3,90E-10	14
H1M15289N	224 ± 1,5	88	2,10E+05	4,41E-05	2,10E-10	262
H1M15267N	173 ± 0,7	109	8,43E+05	1,53E-04	1,81E-10	75
H2aM15272N	229 ± 1,1	120	1,65E+06	7,33E-04	4,43E-10	16
H2aM15279N	195 ± 0,7	127	8,70E+05	8,91E-05	1,02E-10	130
H2aM15278N	230 ± 1	118	1,72E+06	8,73E-04	5,06E-10	13
H2aM15268N	174 ± 0,6	121	2,68E+06	9,50E-04	3,55E-10	12
H2aM15270N	182 ± 0,7	107	7,79E+05	6,05E-04	7,76E-10	19
H1M15277N	211 ± 1	150	2,63E+06	9,10E-04	3,46E-10	13
H2bM15292N	185 ± 1,2	95	4,57E+05	1,55E-04	3,40E-10	75
H2aM15271N	227 ± 1,4	112	9,08E+05	1,24E-03	1,37E-09	9
H1M15269N	268 ± 2,8	83	1,76E+05	1,08E-04	6,16E-10	107
H1M15290N	210 ± 1,9	108	4,82E+05	2,11E-04	4,38E-10	55
H1M15293N	187 ± 0,9	91	6,04E+05	1,98E-04	3,28E-10	58
H2bM15291N	179 ± 1,8	83	2,52E+05	1,41E-04	5,59E-10	82
H1M15288N	149 ± 1	55	1,73E+05	7,16E-04	4,15E-09	16
H2aM15287N	186 ± 1,9	50	6,33E+04	4,42E-04	6,98E-09	26
H1M15280N	168 ± 0,8	56	2,83E+05	5,25E-03	1,85E-08	2,2
H1H15233P2	250 ± 13,2	141	1,99E+05	4,56E-05	2,29E-10	253
H1H15231P2	228 ± 3,8	154	6,39E+05	7,44E-05	1,16E-10	155
H1H15188P	189 ± 1,4	158	1,48E+06	1,22E-04	8,25E-11	95
H1H15211P	226 ± 1,1	180	1,13E+06	8,72E-05	7,75E-11	133
H1H15249P2	195 ± 1,2	99	3,49E+05	7,91E-05	2,27E-10	146
H1H15260P2	242 ± 2	164	1,16E+06	1,60E-04	1,38E-10	72
H1H15203P	128 ± 1,4	100	4,43E+05	1,21E-04	2,73E-10	95
H1H15237P2	171 ± 2,2	131	4,39E+05	1,20E-04	2,74E-10	96
H1H15264P2	110 ± 2,9	66	2,23E+05	1,86E-04	8,33E-10	62
H1H15228P2	144 ± 4,3	113	4,43E+05	1,85E-04	4,18E-10	63
H1H15208P	114 ± 4,3	98	4,39E+05	2,43E-04	5,53E-10	48
H1H15177P	135 ± 1,3	105	4,93E+05	1,92E-04	3,90E-10	60
H1H15253P2	127 ± 1,7	94	3,56E+05	1,24E-04	3,48E-10	93
H1H15215P	171 ± 1	86	1,44E+05	9,67E-05	6,71E-10	119
H1H15259P2	234 ± 2,1	142	2,26E+05	3,77E-04	1,67E-09	31

Таблица 5

Захваченное mAb	Кинетика связывания при 37°C					
	Уровень захвата mAb (RU)	100 нМ Ag (RU)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	t _{1/2} (мин.)
H2aM15281N	276 ± 1,6	140	2,55E+06	5,43E-04	2,13E-10	21
H1M15289N	271 ± 2,2	119	4,59E+05	1,26E-04	2,75E-10	92
H1M15267N	202 ± 1,1	132	2,37E+06	7,45E-04	3,14E-10	16
H2aM15272N	284 ± 1,9	135	2,00E+06	6,34E-04	3,16E-10	18
H2aM15279N	229 ± 1	150	1,39E+06	4,45E-04	3,20E-10	26
H2aM15278N	266 ± 1,1	127	2,17E+06	1,13E-03	5,19E-10	10
H2aM15268N	208 ± 1,1	126	3,75E+06	2,02E-03	5,37E-10	6
H2aM15270N	219 ± 0,8	128	1,75E+06	1,14E-03	6,51E-10	10
H1M15277N	246 ± 1,1	156	3,24E+06	2,18E-03	6,71E-10	5
H2bM15292N	242 ± 0,6	117	5,44E+05	5,24E-04	9,63E-10	22
H2aM15271N	276 ± 1,5	117	1,45E+06	1,45E-03	1,00E-09	8
H1M15269N	319 ± 1,7	107	2,54E+05	3,39E-04	1,34E-09	34
H1M15290N	243 ± 1,8	117	6,66E+05	9,84E-04	1,48E-09	12
H1M15293N	213 ± 1,7	112	5,12E+05	8,53E-04	1,66E-09	14
H2bM15291N	229 ± 1,7	97	3,42E+05	6,40E-04	1,87E-09	18
H1M15288N	176 ± 1	69	2,73E+05	2,08E-03	7,61E-09	6
H2aM15287N	228 ± 1,4	61	1,74E+05	1,89E-03	1,09E-08	6
H1M15280N	196 ± 1	59	4,97E+05	6,57E-03	1,32E-08	1,8
H1H15233P2	317 ± 6,9	184	3,74E+05	4,74E-05	1,27E-10	244
H1H15231P2	306 ± 4,3	228	6,59E+05	9,19E-05	1,39E-10	126
H1H15188P	267 ± 1,6	217	1,59E+06	2,65E-04	1,67E-10	44
H1H15211P	305 ± 2,7	232	8,27E+05	1,60E-04	1,94E-10	72
H1H15249P2	260 ± 2,3	157	4,42E+05	1,27E-04	2,88E-10	91
H1H15260P2	322 ± 2,5	220	1,05E+06	5,47E-04	5,19E-10	21
H1H15203P	179 ± 1,2	106	5,01E+05	3,23E-04	6,45E-10	36
H1H15237P2	218 ± 1,4	181	5,14E+05	4,09E-04	7,97E-10	28
H1H15264P2	149 ± 2,1	106	5,07E+05	4,75E-04	9,36E-10	24
H1H15228P2	188 ± 2	157	4,76E+05	4,64E-04	9,75E-10	25
H1H15208P	151 ± 3,6	145	5,25E+05	5,31E-04	1,01E-09	22
H1H15177P	181 ± 1,5	149	5,68E+05	7,01E-04	1,23E-09	16
H1H15253P2	172 ± 0,7	139	4,36E+05	6,29E-04	1,44E-09	18
H1H15215P	224 ± 2,1	96	1,38E+05	2,33E-04	1,68E-09	50
H1H15259P2	282 ± 3,8	173	4,78E+05	8,88E-04	1,86E-09	13

В табл. 4 и 5 показано, что антитела связывались со спайк-белком MERS-CoV при значениях K_D , варьирующих от 77,5 пМ до 18,5 нМ при 25°C и от 127 пМ до 13,2 нМ при 37°C. Антитела демонстрировали значения периодов полудиссоциации ($t_{1/2}$), варьирующие от 2,2 до 262 мин при 25°C и от 1,8 до 244 мин при 37°C.

Пример 5. Нейтрализация опосредованной антителами инфицирующей способности MERS.

Материалы и способы.

Получение псевдочастиц.

Псевдочастицы MERS (MERSpp; также называемые вирус-подобной частицей - VLP) получали путем одновременного трансфицирования клеток 293Т смесью плазмидных конструкций, экспрессирующих спайк-белок MERS, HIV gag-pol и вектором на основе провируса HIV, кодирующим люциферазу светляка. Супернатанты, содержащие MERSpp, собирали через 72 ч после трансфекции, осветляли центрифугированием, концентрировали, разделяли на аликваты и замораживали при -80°C. Контрольные псевдочастицы получали путем замены плазмиды, экспрессирующей спайк-белок MERS-CoV, плазмидой, кодирующей гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSVg).

Анализ на основе MERSpp.

Разведения антител инкубировали с MERSpp в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки Huh7 в полной питательной среде DMEM отделяли с использованием 1% EDTA, промывали и инкубировали со смесями антител/MERSpp в течение 72 ч. Эффективность инфицирования количественно оценивали по детектированию сигнала люциферазы при помощи BrightGlo® luciferase assay (Promega, Сан-Луис-Обиспо, Калифорния, США) и считывали на планшет-ридере Victor® X3 (Perkin Elmer, Уолтхем, Массачусетс, США) по образованию светового сигнала.

Вирусологический тест.

1×10^4 клеток Vero E6 на лунку высевали в 96-луночные планшета за 1 день до эксперимента. 500 TCID₅₀ штамма EMC/2012 MERS-CoV смешивали с определенным количеством антитела в 100 мкл нормальной ростовой среды для Vero E6 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем добавляли к клеткам Vero E6. Через 2 дня после инфекции гибель клеток оценивали с использованием CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) согласно инструкциям изготовителя. Люминесценцию считывали с использованием планшет-ридера Spectramax M (Molecular Devices). Данные выражали в виде процента от неинфицированных контролей.

Результаты.

Нейтрализация MERS-CoV антителами к MERS-CoV-S.

В первоначальном эксперименте антитела к MERS-CoV-S, полученные из отдельных независимых гибридом, тестировали на предмет нейтрализации инфицирующей способности MERS. Как показано на фиг. 1, 12 из 22 антител к MERS-CoV-S, продуцируемых линиями клеток гибридомы, подавляли или нейтрализовывали более чем 90% инфицирующей способности MERS при IC₅₀, варьирующем от 68,4 пМ до 3,58 нМ.

В дальнейших экспериментах очищенные антитела тестировали на предмет нейтрализации MERSpp и живого вируса MERS (изолят: EMC/2012). Результаты представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6

Антитело	IC ₅₀ по отношению к MERSpp (М)	IC ₅₀ по отношению к живому вирусу (EMC2012) (М)
H1M15277N	6,46E-11	2,87E-10
H2aM15279N	9,39E-11	8,25E-10
H1M15280N	1,11E-10	7,63E-10
H2aM15278N	1,42E-10	6,44E-10
H2aM15271N	1,27E-10	1,03E-09
H1M15267N	9,98E-11	8,91E-10
H2bM15292N	1,13E-10	2,26E-09
H2bM15291N	1,86E-10	2,22E-09
H1M15290N	2,10E-10	2,55E-09
H1M15293N	2,58E-10	2,58E-09
H1M15289N	2,81E-10	3,15E-09
H1M15269N	6,88E-10	6,80E-09
H2aM15287N	2,93E-09	8,92E-09
H1M15288N	~0,1209	2,66E-08
H2aM15268N	5,89E-11	2,72E-10
H2aM15270N	1,02E-10	7,11E-10
H2aM15281N	7,85E-11	2,92E-10
H2aM15272N	7,23E-11	5,69E-10

Таблица 7

Антитело	IC50 по отношению к MERSpp (M)	IC50 по отношению к живому вирусу (EMC2012) (M)
H1N15211P	4,74E-11	3,69E-10
H1N15188P	6,20E-11	5,05E-10
H1N15177P	4,57E-11	6,29E-10
H1N15203P	7,65E-11	8,26E-10
H1N15228P2	9,75E-11	8,98E-10
H1N15231P2	1,02E-10	9,20E-10
H1N15237P2	6,60E-11	1,01E-09
H1N15233P2	8,73E-11	1,37E-09
H1N15259P2	7,64E-11	1,63E-09
H1N15264P2	1,34E-10	2,39E-09
H1N15208P	8,27E-11	2,41E-09
H1N15253P2	1,51E-10	2,42E-09
H1N15215P	1,92E-10	2,67E-09
H1N15260P2	6,43E-11	6,70E-09
H1N15249P2	2,27E-10	1,20E-08
H4sH15188P	2,91E-11	н.д.
H4sH15211P	6,08E-11	н.д.
H4sH15260P2	6,24E-11	н.д.
H4sH15231P2	7,33E-11	н.д.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению эффективно блокируют проникновение MERS-CoV в чувствительные клетки и нейтрализуют инфицирующую способность.

Нейтрализация антителами к MERS-CoV-S клинических изолятов.

РНК-содержащие вирусы кодируют комплекс репликации генома, не являющийся высокоточным, что позволяет им быстро адаптироваться к условиям окружающей среды (Malpica et al., 2002; Genetics, 162:1505-1511). Однако коронавирусы, такие как MERS-CoV, кодируют неструктурный белок с экзорибонуклеазной активностью в направлении 3'-5', который обеспечивает функцию устранения ошибок в ходе их репликации и в значительной степени увеличивает кодирующую емкость генома, что не влечет за собой мутационную катастрофу (Cotton et al., 2013; Lancet doi:10.1016/S0140-6736(13)61887-5). Несмотря на это, в ходе секвенирования множества клинических изолятов, полученных в первые два года эпидемии MERS-CoV, выявили, что S-белок вируса MERS-CoV эволюционирует (Cotton et al., 2014; MBio 5 doi:10.1128/mBio.01062-13). Для этого исследования 38 последовательностей клинических изолятов MERS-CoV, депонированных в NCBI, выравнивали и сравнивали с последовательностью первого выделенного штамма EMC/2012. С учетом схемы скринингового анализа ожидали, что антитела по настоящему изобретению будут связываться в пределах RBD S-белка MERS-CoV, поэтому сравнение последовательностей особенно сосредоточили на аминокислотах 367-606. Идентифицировали семь аминокислот, которые отличаются в последовательностях секвенированных клинических изолятов, и прототипную последовательность EMC/2012, A431P, S457G, S460F, A482V, L506F, D509G и V534A (табл. 8).

Таблица 8

Аминокислотная замена	Изолят
A431P	Riyadh_9
S457G	KFU-HKU 1; KFU-HKU 13
S469F	Qatar3; Qatar4
A482V	Riyadh_9
L506F	England 1; England-Qatar/2012
D509G	Bisha_1; Riyadh_1
V534A	Riyadh_2

Для тестирования способности антител связываться с консервативными участками в пределах RBD и нейтрализовать все клинические изоляты MERS-CoV, секвенированные к июлю 2014 года, сайт-направленный мутагенез использовали для создания плазмидной конструкции, кодирующей все варианты S-белка. Этот способ использовали для получения псевдотипированных MERSpp с модифицированными S-белками и проводили анализы нейтрализации. Очищенные антитела по настоящему изобретению (описаны в примере 1) тестировали на предмет нейтрализации инфицирующей способности MERS с ис-

пользованием MERSpp, полученной с упомянутыми выше мутациями. В табл. 9 и 10 показан процент нейтрализации вариантов MERSpp.

Таблица 9

Вариант RBD	Дикий тип	A431P	S457G	S460F	A482V	L506F	D509G
Антитело мкг/мл	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
H1M15267N	71,65%	68,15%	70,81%	76,82%	66,78%	57,11%	84,91%
H1M15269N	7,19%	11,87%	27,48%	19,57%	7,74%	21,09%	7,08%
H1M15280N	56,69%	59,42%	74,42%	73,14%	65,89%	65,90%	38,21%
H1M15277N	75,83%	89,05%	90,07%	89,35%	75,14%	83,27%	62,26%
H2aM15268N	79,86%	89,51%	93,08%	89,11%	83,50%	88,63%	87,74%
H2aM15270N	63,45%	81,24%	81,64%	80,51%	67,96%	79,63%	45,28%
H2aM15271N	53,38%	63,32%	67,50%	65,52%	52,90%	4,79%	38,21%
H2aM15272N	62,88%	72,97%	78,34%	80,51%	58,90%	16,58%	7,08%
H2aM15281N	78,99%	85,38%	86,76%	83,70%	73,96%	17,87%	19,81%
H2aM15279N	48,92%	68,84%	69,91%	65,27%	55,36%	71,27%	53,77%
H2aM15278N	50,50%	65,39%	70,81%	73,87%	48,97%	56,25%	-29,72%
H1M15288N	1,29%	11,64%	20,86%	26,45%	23,68%	8,22%	-2,83%
H1M15289N	43,74%	44,26%	45,54%	51,27%	36,86%	42,32%	28,30%
H1M15290N	36,55%	39,20%	43,73%	48,08%	22,89%	-0,14%	-39,62%
H1M15293N	27,91%	29,10%	34,40%	40,21%	20,33%	1,57%	-15,57%
H2aM15287N	11,65%	5,90%	12,14%	15,15%	19,06%	15,30%	-1,42%
H2bM15291N	45,90%	38,74%	50,05%	49,80%	28,30%	-3,57%	18,40%
H2bM15292N	42,01%	41,04%	49,45%	51,02%	40,21%	14,87%	-16,98%
Изотипический контроль (mIgG1)	-0,14%	10,03%	-3,81%	1,39%	-5,25%	2,64%	-24,06%
Изотипический контроль (mIgG2a)	5,32%	-1,00%	7,32%	8,76%	10,30%	5,65%	-26,89%
Изотипический контроль (mIgG2b)	0,43%	-5,13%	26,88%	5,08%	13,35%	6,08%	-4,25%
H1N15211P	87,77%	90,20%	93,98%	93,78%	88,82%	91,85%	80,66%
H4sH15211P	91,65%	95,02%	98,80%	91,81%	95,41%	96,35%	67,92%
Изотипический контроль (hIgG1)	11,80%	10,26%	-	3,60%	15,61%	6,08%	-8,49%
Изотипический контроль (hIgG4)	-4,60%	-0,54%	-0,50%	-0,33%	13,84%	-5,50%	8,49%

Таблица 10

Вариант RBD	Дикий тип	A431P	S457G	S460F	A482V	L506F	D509G
ID Ab мкг/мл	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
H4sH15188P	81,6%	89,7%	95,7%	92,6%	74,2%	93,6%	101,4%
H4sH15211P	77,1%	91,6%	88,1%	86,0%	73,8%	88,2%	57,2%
H4sH15231P2	70,6%	72,3%	74,5%	75,7%	70,5%	80,6%	60,0%
H4sH15260P2	73,3%	82,8%	77,7%	74,8%	79,0%	73,3%	73,8%
H1H15177P	82,8%	83,2%	84,4%	84,5%	75,9%	90,9%	35,2%
H1H15188P	81,4%	88,9%	86,8%	85,5%	86,4%	92,4%	90,3%
H1H15203P	61,0%	80,5%	74,5%	74,0%	74,0%	61,3%	35,2%
H1H15208P	53,9%	79,3%	73,8%	77,7%	65,2%	76,5%	82,1%
H1H15211P	77,8%	87,3%	93,5%	94,6%	80,2%	82,6%	79,3%
H1H15215P	20,2%	43,0%	42,4%	44,0%	41,7%	15,8%	-47,6%
H1H15228P2	47,8%	64,1%	68,4%	57,4%	63,1%	74,8%	62,8%
H1H15231P2	48,1%	60,6%	71,4%	55,7%	60,0%	55,2%	46,2%
H1H15233P2	55,4%	66,8%	69,7%	59,9%	65,0%	50,8%	65,5%
H1H15237P2	52,6%	74,4%	82,7%	73,5%	70,5%	73,8%	79,3%
H1H15249P2	15,6%	34,6%	19,8%	34,2%	37,2%	30,7%	29,7%
H1H15253P2	52,9%	66,4%	56,0%	57,7%	58,2%	56,9%	51,7%
H1H15259P2	61,2%	79,3%	77,1%	63,8%	68,1%	73,0%	79,3%
H1H15260P2	68,8%	85,6%	74,5%	86,7%	80,4%	82,1%	54,5%
H1H15264P2	23,1%	55,5%	52,3%	52,3%	40,1%	47,4%	-20,0%
Изотипический контроль (hIgG1)	-38,0%	-0,3%	1,6%	-36,9%	0,8%	-16,9%	15,9%
Изотипический контроль (hIgG4)	-19,9%	1,1%	-4,5%	-8,1%	6,7%	-7,4%	15,9%
H1H15277N	35,2%	86,7%	83,1%	65,0%	75,1%	73,0%	71,0%
Изотипический контроль (mIgG1)	-8,8%	2,6%	-3,6%	3,7%	0,2%	-9,6%	26,9%

Эти данные свидетельствуют о том, что антитела по настоящему изобретению связываются с участками спайк-белка MERS-CoV, которые остаются консервативными в ходе природной эволюции вируса.

Антитела к MERS-CoV-S по настоящему изобретению нейтрализуют более эффективно, чем ранее выделенные антитела к MERS-CoV.

Эффективность выбранных антител по настоящему изобретению сравнивали с ранее выделенными моноклональными антителами. Три группы антител использовали в *in vitro* способах выделения, т.е. фаговом дисплее (Tang et al., 2014, PNAS doi:10.1073/pnas.1402074111 и Ying et al., 2014, J. Virol., doi:10.1128/JVI.00912-14) и дрожжевом дисплее (Jiang et al., 2014, Sci. Transl. Med. doi:10.1126/scitranslmed.3008140), для отбора антител, которые связываются с S-белком MERS-CoV и блокируют проникновение вируса. Для этого исследования выбирали панель из трех антител с опубликованными последовательностями вариабельных доменов, которые, как сообщалось, нейтрализуют MERS-CoV и связываются с разными эпитопами. Последовательности антител 3B12 (Tang et al., 2014, PNAS doi:10.1073/pnas.1402074111), MERS-4 и MERS-27 (Jiang et al., 2014, Sci. Transl. Med. doi:10.1126/scitranslmed.3008140) клонировали в константные домены IgG1, затем экспрессировали и очищали аналогично выбранным антителам по настоящему изобретению. Эффективность нейтрализации для всех антител тестировали с использованием псевдочастиц, полученных с прототипной последовательностью EMC/2012, и всех описанных выше клинических изолятов.

Значения IC_{50} в нейтрализации выбранных антител к вариантам MERSpp показаны в табл. 11. Как видно из табл. 11, H1H15211P был способен нейтрализовать все изоляты при значениях IC_{50} , варьирующих от $1,3E-11M$ до $6,5E-11M$. Подобные значения также наблюдали для H1H15277N, кроме варианта V534A, который проявлял частичную устойчивость к антителу. Однако следует отметить, что это аминокислотное изменение наблюдали только в одном изоляте MERS-CoV (Riyadh 2), который выделили в 2012 году, и он является частью мертвой ветви эволюционного дерева MERS-CoV.

H1H15211P и H1H277N нейтрализуют MERSpp при значениях IC_{50} по меньшей мере на один логарифм ниже, чем наиболее эффективное сравниваемое антитело к MERS-4. Кроме того, как 3B12, так и MERS-27 по всей видимости связываются с менее консервативными сайтами в S-белке MERS-CoV, поскольку псевдочастицы с последовательностями множества клинических изолятов невозможно нейтра-

лизовать этими антителами.

Таблица 11

	H1H15177P	H1H15188P	H1H15211P	H1H15277N	H1H15267N2	3B12	MERS-4	MERS-27
wt	5,374E-11	4,819E-11	6,525E-11	6,978E-11	7,621E-11	1,69E-09	3,90E-10	8,36E-09
A431P	1,924E-11	1,323E-11	2,15E-11	3,162E-11	4,877E-11	6,35E-10	2,02E-10	4,50E-09
S457G	3,022E-11	1,99E-11	2,578E-11	3,532E-11	4,973E-11	7,43E-10	2,81E-10	5,06E-09
S460F	2,435E-11	1,49E-11	2,031E-11	3,19E-11	6,805E-11	6,69E-10	3,14E-10	6,36E-09
A482V	2,044E-11	1,955E-11	2,735E-11	8,094E-11	6,533E-11	9,58E-10	6,83E-10	1,26E-08
L506F	1,624E-11	1,017E-11	1,341E-11	3,967E-11	3,537E-11	~0,001534	5,64E-10	6,64E-09
D509G	1,792E-10	1,682E-11	4,036E-11	4,322E-11	4,846E-11	1,17E-07	1,37E-09	4,57E-09
V534A	3,663E-11	2,034E-11	3,195E-11	7,064E-09	4,317E-10	5,63E-08	2,19E-10	1,31E-07

Эти данные свидетельствуют о том, что антитела по настоящему изобретению способны нейтрализовать широкий спектр изолятов MERS-CoV с повышенной эффективностью по сравнению с несколькими антителами, выделенными исключительно на основе их биохимических свойств *in vitro*.

Пример 6. Анализ перекрестной конкуренции между антителами к MERS-CoV-S на основе биологического сенсора Octet.

Конкурентное связывание антител к MERS-CoV S определяли с использованием безметочного анализа интерферометрии биослоя в режиме реального времени на основе биологического сенсора Octet® RED96 (Pall ForteBio Corp). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере HBS-P Octet (10 mM HEPES, 150 mM NaCl и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4, 1 мг/мл BSA) при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Чтобы оценить, способны ли антитела конкурировать за связывание с их соответствующими эпитопами на рекомбинантно экспрессируемом рецептор-связывающем домене спайк-белка MERS, слитом с человеческой Fc-меткой (MERS RBD-hFc; SEQ ID: 458), выбирали анализ в формате предварительной смеси и 50 nM MERS-CoV-RBD-mFc предварительно инкубировали с 500 nM другого моноклонального антитела к MERS (далее обозначенного как mAb-2) в течение по меньшей мере 2 ч до проведения анализа конкурентного связывания. Неспецифическое моноклональное антитело инкубировали с MERS-RBS.mFc в качестве изотипического контроля. Биосенсоры Octet, покрытые поликлональным антителом к hFc (Pall ForteBio Corp., № по кат. 18-5060), сперва погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора, на 4 мин для захвата приблизительно 2 нм антитела к MERS (далее обозначенного как mAb-1). Затем после стадии захвата свободные поликлональные антитела к hFc насыщали путем погружения биологических сенсоров Octet в лунки, содержащие 100 мкг/мл неспецифического полностью человеческого моноклонального антитела. И, наконец, биологические сенсоры опускали на 4 мин в лунки, содержащие предварительно смешанные образцы 50 nM MERS-RBD-mFc и 500 nM mAb-2. Биологические сенсоры промывали в буфере HBS-P Octet между каждой стадией эксперимента. В ходе эксперимента реакцию связывания регистрировали в режиме реального времени и измеряли реакцию связывания в конце каждой стадии. Сравнивали реакцию связывания mAb-1 с предварительно образованным комплексом MERS-RBD-mFc и mAb-2 и определяли характер конкурентного/неконкурентного связывания разных моноклональных антител к MERS.

В экспериментальных условиях, используемых в данном примере, перекрестную конкуренцию (т.е. конкуренцию между антителами в обоих направлениях) отмечали, например, для (a) H2aM15281N, H1M15290N, H1M15293N, и H2bM15291N; (b) H2aM15272N, H2bM15292N, и H2aM15271N и (c) H2aM15268N, H1M15267N, H2M15279N, H1M15289N и H1M15277N (фиг. 2).

В другом эксперименте определяли конкурентное связывание антител, выделенных непосредственно из антиген-позитивных мышинных В-клеток (описанных в примере 1). В экспериментальных условиях, используемых в данном примере, перекрестную конкуренцию (т.е. конкуренцию между антителами в обоих направлениях) отмечали, например, для (a) H1H15215P, H1H15177P, H1H15203P, и H1H15211P; (b) H1H15188P, H1H15208P, H1H15228P2, H1H15233P2, H1H15237P2, H1H15253P2, и H1H15259P2; и (c) H1H15231P2, H1H15249P2, H1H15260P2 и H1H15264P2 (фиг. 3).

В другом эксперименте регистрировали конкурентное связывание двух антител H1H15211P и H1H15277N.

Таблица 12

mAb1	Уровень захвата mAb1 (нм)	Связывание предварительно образованного комплекса mAb2 и MERS-RBD-mFc с захваченным mAb1			
		H1N15277N	H1N15211P	Изотипическое контрольное mAb	Без mAb
H1N15277N	2,19	0,22	0,55	1,03	0,96
H1N15211P	2,08	0,68	0,22	0,73	0,69

В табл. 12 показано, что два антитела не подавляют друг друга и связывание одного антитела с RBD MERS-CoV по-прежнему обеспечивает возможность для связывания второго антитела. Эти данные свидетельствуют о том, что два антитела связываются с эпитопами, которые являются отличающимися и не перекрывающимися. Мутация в одном эпитопе, как результат селективного давления, оказываемого одним антителом, не должна влиять на связывание другого антитела.

Пример 7. Эффективность *in vivo* антител к MERS-CoV-S.

Материалы и способы.

Получение мышей с нокином по человеческой DPP4.

Поскольку спайк-белок MERS не взаимодействует с мышшиной DPP4, гуманизованную модель инфекции MERS-CoV получали с использованием технологии VelociGene® technology (Valenzuela et al., 2003, Nat. Biotechnol. 21:652-659). Вкратце, крупный направленный вектор (LTVEC) конструировали таким образом, чтобы он содержал ген человеческой DPP4 геномной ДНК размером 82 т.п.о. от экзона 2 до экзона 26, включающего 3' UTR, для замещения соответствующих частей мышшиного Dpp4 размером 79 т.п.о. Человеческие ВАС RP11-68L22 и мышшиные ВАС RP23-362N15, содержащие ген Dpp4, идентифицировали с использованием Blast и последовательность подтверждали с использованием настольного секвенатора Illumina MiSeq. LTVEC электропорировали в F1-гибридные (129S6SvEvTac/C57BL6NTac) клетки ES. Устойчивые к G418 колонии отбирали через 10 дней после электропорации и скринировали на предмет корректного целенаправленного воздействия с помощью анализа утраты аллеля. Использовали способ VelociMouse® (Poueymirou, et. al., 2007; Nature Biotechnology, 25:91-99), в котором подвергшиеся целенаправленному воздействию клетки ES вводили в некомпактизированные эмбрионы мышей Swiss Webster на стадии 8 бластомеров для получения поколения мышей F0, полностью произошедших из ES клеток, несущих аллель человеческого гена DPP4. Все проведенные процедуры с животными строго соответствовали рекомендациям Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных NIH (Care and Use of Laboratory Animals of the NIH). Протокол экспериментов был утвержден Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных компании Редженерон Фармасьютикалс (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)). Данный способ описан подробно в заявке на патент США № 62/051626, поданной 17 сентября 2014 г., включенной в данный документ во всей своей полноте. Трансгенные мышей также получали путем случайных вставок гена hDPP4 в геном мыши.

Эксперименты на животных.

Мышам в возрасте от шести до восьми недель с гуманизованной DPP4 интраперитонеально вводили (i.p.) определенные количества антител или стерильный солевой физиологический раствор в качестве контроля за 1 день до инфицирования или в 1 день после инфицирования в зависимости от эксперимента. Перед интраназальной инокуляцией мышшей анестезировали интраперитонеальным введением смеси ксилазина (0,38 мг/мышь; Lloyd laboratories) и кетамина (1,3 мг/мышь; Henry Schein animal health), разбавленной PBS с получением общего объема 50 мкл на мышь. При достижении анестезии мышам интраназально инокулировали либо PBS, либо 2×10^5 БОЕ MERS-CoV (Jordan), разведенных в PBS с получением общего объема инокулята 50 мкл. В ходе эксперимента мышшей взвешивали перед инфицированием и в каждый день эксперимента для оценки потери массы тела, индуцированной MERS-CoV. Мышей подвергали эвтаназии на 2 день или 4 день после инфицирования с использованием летальной дозы изофлурана (Butler Animal Health Supply). Легкие отбирали для дальнейшего анализа репликации MERS-CoV и гистопатологического анализа.

Анализ РНК MERS-CoV.

РНК экстрагировали из легких мышшей путем гомогенизации в 1 мл Trizol® (Life Technologies Inc) с использованием Magnalyzer (Roche) в соответствии с инструкциями изготовителя. Уровни РНК MERS-CoV оценивали с использованием мастер-микса Taqman® Fast virus one-step master mix (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями изготовителя, используя пару праймеров, полученных от Life Technologies, нацеливающихся на участок генома выше гена, кодирующего белок оболочки (UpE); лидерную последовательность матричной РНК нуклеокапсида (лидерный праймер), и сравнивали с мышшиной 18S рРНК (эндогенный контроль). Реакции qPCR в реакционных планшетах Microamp® fast optical reaction plates (Applied Biosystems) считывали с помощью устройства 7500 fast DX realtime PCR instrument (Applied Biosystems) и анализировали данные с использованием методики Ct, при этом неинфицированный контроль принимали как равный 1. Процент детектированной РНК MERS-CoV выражали

по отношению к уровням РНК, детектированным у инфицированных мышей, которых обрабатывали изотипически сходными контрольными антителами.

Анализ бляшкообразования для определения концентрации вируса MERS-CoV.

Мышинные легкие гомогенизировали в 1 мл PBS со стеклянными бусинами в течение 60 с при 6000 об/мин с использованием Magnalyzer (Roche). Затем гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин и супернатант анализировали в анализе бляшкообразования на клетках Vero E6 для количественного определения вируса, оставшегося после обработки. Анализы бляшкообразования проводили, как описано ранее, кроме тех чашек, которые оставляли на 3 дня для появления бляшек.

Гистологический анализ.

Гистологические препараты готовили из срезов толщиной 5 мкм фиксированных, залитых парафином тканей и окрашивали их гематоксилином и эозином. Участки препарата оценивали с помощью световой микроскопии и анализировали. Степени интерстициального, перибронхиального и периваскулярного воспаления оценивали в баллах от 0 до 5. Для каждой экспериментальной группы анализ проводили при заслеплении препаратов и их оценивали в баллах от 0 до 5 и группировали для сравнения по штаммам, точкам времени и обработкам. Другие гистологические характеристики, такие как наличие повреждения эпителия бронхоиол и альвеолярного повреждения, изменения в плевре и степень перибронховаскулярного воспаления, также отмечали для каждой группы в тексте. Общий балл воспаления для каждой мыши усредняли по каждой группе и представляли в виде среднего балла для всех мышей в каждой группе и точке времени.

Результаты.

Мыши с гуманизированной DPP4 являются восприимчивыми к инфекции MERS-CoV.

Для тестирования *in vivo* противовирусных молекул требуется модель на маленьком животном, которое восприимчиво к инфекции MERS-CoV. Мыши не восприимчивы к инфекции MERS-CoV. Сравнение последовательностей мышиной и человеческой DPP4 выявило, что аминокислоты, которые ранее идентифицировали как сайты контакта между S-белком MERS-CoV и его рецепторами, отличаются у двух видов. Кроме того, экспрессия человеческой DPP4 в мышиных клетках обеспечивает возможность проникновения MERSpp и размножения MERS-CoV, свидетельствуя о том, что проникновение вируса является лимитирующей стадией в инфицировании мышиных клеток и что отсутствие взаимодействия между мышиной DPP4 и гликопротеином MERS-CoV определяет видовой тропизм *in vitro*.

Авторы настоящего изобретения выдвинули гипотезу о том, что мыши, экспрессирующие человеческую DPP4 вместо мышиной DPP4, будут восприимчивы к MERS-CoV, и это обеспечивает возможность тестирования *in vivo* терапевтических средств против MERS-CoV. Технологию VelociGene® использовали для замены мышиного гена *Dpp4* размером 79 т.п.о. его человеческим ортологом размером 82 т.п.о. Полученные в результате мыши экспрессируют полностью человеческую DPP4 под контролем мышиных регуляторных элементов с сохранением надлежащей регуляции экспрессии и тканевого распределения белка.

Для тестирования, могут ли гуманизированные мыши и трансгенные мыши поддерживать инфекцию MERS-CoV, в одном первоначальном эксперименте трансгенных мышей обрабатывали интраперитонеальным введением 200 мкг антител к MERS-CoV-S или изотипического контроля в день -1 и их интраназально инфицировали MERS-CoV (~10⁶ БОЕ EMC2012) в день 0. Через четыре дня после инфицирования отбирали легкие и измеряли уровни РНК вируса посредством RT-PCR для проверки эффективности антител в отношении вирусной нагрузки. В табл. 13 показаны средние уровни вирусной геномной РНК и реплицирующейся РНК, выраженные в виде процента по отношению к изотипическим контролям. Обработка с использованием H1H15211P в результате приводила приблизительно к 500-кратному снижению вирусной РНК у инфицированных мышей.

Таблица 13

Антитело	Геномная РНК	Реплицирующаяся РНК (лидерная)
H1H15177P	0,356839562	0,273565089
H1H15211P	0,254493202	0,206006238
H4sH15211P	1,989548316	1,112094283
Изотипический контроль IgG1	104,0889287	101,2578723
Изотипический контроль IgG4	100	100

В другом эксперименте гуманизированным DPP4 мышам (huDPP4) 6-8 недельного возраста интраназально инокулировали MERS-CoV. Хотя отсутствие смертности или клинических признаков наблюдали до 4 дня включительно, на 2 и 4 день после инокуляции мышей подвергали эвтаназии и вырезали их легкие. Для получения данных об уровнях вирусной РНК легкие гомогенизировали в Trizol® и анализировали с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров, специфичных к MERS-CoV (фиг. 4 и 5). Для получения данных о концентрации вируса легкие гомогенизировали в PBS, осветляли путем центрифугирования и титровали на клетках Vero E6 (фиг. 6). Устойчивая репликация MERS-CoV в легких была выраженной на 2 и 4 день после инфицирования. Количественное определение

РНК с использованием набора праймеров, специфичных к лидерной РНК MERS-CoV, которые сконструировали только для амплификации реплицирующейся РНК MERS-CoV, продемонстрировало высокие уровни реплицирующейся РНК MERS-CoV в легких, отобранных на 2 день, и эти уровни сохранялись по 4 день включительно после инфицирования (фиг. 5). С помощью анализа бляшкообразования гомогената легких на клетках Vero E6 количественно определяли уровни MERS-CoV (Jordan), составляющие $\sim 7,27 \times 10^4$ БОЕ/г легкого на 2 день и $\sim 3,75 \times 10^5$ БОЕ/г легкого на 4 день после инфицирования (фиг. 6), что демонстрирует активную репликацию MERS-CoV в легких мышей huDPP4. Эти данные свидетельствуют о том, что посредством гуманизации рецептора DPP4 с использованием технологии VelociGene® создали полноценную мышиную модель MERS-CoV, которую можно использовать для оценки лечения MERS-CoV *in vivo*.

Легкие мышей huDPP4, которым интраназально инокулировали либо MERS-CoV (штамм Jordan), либо PBS (неинфицированные), анализировали в отношении гистопатологических изменений. На 2 день после инфицирования было явно выражено перибронхиальное воспаление с изменениями в структуре клеток бронхоиол, выявляемыми по всему объему легких. Минимальное периваскулярное воспаление или воздействие на структуры альвеол отмечали в данные точки времени. На 4 день после инфицирования наблюдали значительную интерстициальную лейкоцитарную инфильтрацию и обширное утолщение альвеол. Также по-прежнему присутствовали изменения в бронхоиолах. Важно, что данная патология заболевания легких, наблюдаемая у людей с MERS-CoV, что свидетельствует о том, что данная *in vivo* модель гуманизированной DPP4 инфекции MERS-CoV повторяет патологические явления, которые наблюдали у людей с инфекцией MERS-CoV.

В дополнительных экспериментах (см. ниже) инфицированным мышам вводили одну или несколько доз очищенных антител (как описано в примере 1) или комбинацию антител с целью профилактики и/или терапии для тестирования их эффективности при инфекции MERS.

H1H15211P и H1H15277N защищают мышей с гуманизированной DPP4 от инфекции MERS-CoV.

Как только установили, что мыши с гуманизированной DPP4 восприимчивы к MERS-CoV, эту модель использовали для оценки активности двух моноклональных антител *in vivo*. Мышам *i.p.* вводили 200, 20 или 2 мкг либо H1H15211P, либо H1H15277N или 200 мкг изотипического контрольного антитела hIgG1 за 24 ч до интраназального инфицирования 1×10^5 БОЕ MERS-CoV (штаммом Jordan). На фиг. 7 и 8 можно увидеть, что оба антитела были способны в значительной степени снижать уровни специфической РНК MERS-CoV в легких на более чем 2 логарифма в дозе 200 мкг на мышью по сравнению с изотипическим контрольным антителом. H1H15211P было более эффективным в снижении уровней РНК MERS-CoV RNA в дозе 20 мкг по сравнению с H1H15277N в той же дозе. Доза каждого антитела в 2 мкг была неэффективной в снижении уровней вирусной РНК по сравнению с обработкой мышью изотипическим контролем. При анализе концентрации MERS-CoV в легких (фиг. 9) было выявлено, что обе дозы 200 и 20 мкг H1H15211P снижают уровни вируса практически до предела детектирования в анализе (2×10^3 БОЕ/мл). H1H15277N является в равной степени эффективным в дозе 200 мкг, что и H1H15211P, тогда как 20 и 2 мкг проявляют дозозависимое подавление вирусной инфекции. Эти данные указывают на то, что H1H15211P и H1H15277N могут эффективно блокировать инфекцию MERS-CoV *in vivo*.

Также проводили гистологический анализ легких, полученных от мышей, который обрабатывали H1H15277N, H1H15211P за 24 ч до инфицирования или изотипическим контрольным антителом hIgG1 на 4 день после инфицирования. В легких мышей, предварительно обработанных изотипическим контрольным hIgG, обнаруживали с помощью антител значительно выраженную легочную патологию с повышенным интерстициальным воспалением, периваскулярной лейкоцитарной инфильтрацией и утолщением межальвеолярных перегородок. Мыши, обработанные 200 мкг либо H1H15277N, либо H1H15211P, имели сниженное воспаление с незначительными очагами клеток воспаления в интерстициальной ткани и слабую бронхолярную лейкоцитарную инфильтрацию. У мышей, предварительно обработанных 20 мкг H1H15277N и H1H15211P, обнаружили периваскулярную лейкоцитарную инфильтрацию и интерстициальное воспаление средней тяжести в сравнении с группой, получившей более высокую дозу антител. В отличие от этого, группа, которую обрабатывали антителом в дозе 2 мкг, имела патологические изменения, подобные изменениям в группе с изотипическим контролем hIgG1, проявляющиеся в выраженном интерстициальном воспалении и преобладающем периваскулярном воспалении. Гистологическое оценивание в баллах с заслеплением (фиг. 10) соответствует баллу менее тяжелого воспаления для обработанных мышей. Эти данные демонстрируют, что H1H15277N и REGN 3051 обеспечивают дозозависимое снижение тяжести легочной патологии после инфицирования MERS-CoV, что подтверждается уровнями вирусной РНК и концентрациями вируса, определенными у этих мышей.

Вместе взятые, эти данные указывают, что H1H15211P и H1H15277N могут блокировать инфекцию MERS-CoV и развитие заболевания *in vivo* при введении за 1 день до инфицирования. По сведениям заявителей, H1H15211P и H1H15277N представляют собой первые полностью человеческие антитела, которые продемонстрировали эффективность в *in vivo* модели инфекции MERS-CoV.

H1H15211P и H1H15277N могут излечивать мышей с гуманизированной DPP4, инфицированных

MERS-CoV.

Требуемым свойством потенциального терапевтического средства является способность подавлять репликацию MERS-CoV и легочную патологию после инфицирования. Чтобы оценить, способно ли H1H15211P оказывать терапевтически эффект, мышей huDPP4 дважды инфицировали MERS-CoV, а затем через 24 ч вводили i.p. либо 500 мкг изотипического контроля hIgG, либо H1H15211P в дозе 500 или 200 мкг. На 4 день после инфицирования мышей подвергали эвтаназии и легкие мышей анализировали в отношении вирусной РНК, концентрации вируса и легочной патологии. Обе дозы 500 и 200 мкг H1H15211P были способны снижать уровни вирусной РНК приблизительно в 10 раз в легких мышей по сравнению с мышами, обработанными контрольным антителом (фиг. 11 и 12). Концентрации вируса в легких тех же мышей демонстрировали значительное снижение концентраций вирусов в легких со снижением более чем в 2 логарифма на 4 день после инфицирования (фиг. 13). Эти данные демонстрируют, что H1H15211P может в значительной степени подавлять вирусную репликацию даже при введении через 24 ч после инокуляции вируса.

Гистологический анализ проводили у мышей, обработанных контрольным антителом hIgG, 500 или 200 мкг H1H15211P через 24 ч после инфицирования. Мыши, обработанные контрольным антителом, демонстрировали патологические изменения, аналогичные изменениям в контрольной группе выше, характеризующиеся значительным интерстициальным воспалением, периваскулярной лейкоцитарной инфильтрацией и утолщением межальвеолярных перегородок. Мыши, обработанные 200 или 500 мкг H1H15211P, имели незначительное интерстициальное воспаление и сниженное и только очаговое периваскулярное воспаление по всему объему легких. Гистологическое оценивание в баллах с заслеплением демонстрирует сниженное воспаление, выраженное в баллах, у обработанных мышей (фиг. 14). Эти данные демонстрируют, что терапевтические дозы H1H15211P снижают индуцированную MERS-CoV легочную патологию даже при введении через 24 ч после инфицирования.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, помимо описанных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники исходя из изложенного выше описания и прилагаемых фигур. Такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается со спайк-белком коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) и содержит пару аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи (HCVR) и переменной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 66/74 и 218/226.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; 68-70-72-76-78-80 и 220-222-224-228-230-232.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где антитело представляет собой антитело IgG1 или IgG4.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, которое обладает одной или несколькими следующими характеристиками:

(a) представляет собой полноразмерное моноклональное антитело человека;

(b) взаимодействует с одним или несколькими аминокислотными остатками в рецепторсвязывающем домене спайк-белка MERS-CoV, выбранными из аминокислотных остатков 367-606 последовательности SEQ ID NO: 457;

(c) связывается со спайк-белком MERS-CoV с константой диссоциации (K_D) менее 18,5 нМ, что измерено посредством анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса;

(d) блокирует связывание спайк-белка MERS-CoV с дипептидилпептидазой-4 (DPP4) более чем на 90%, что измерено посредством анализа блокирования с помощью ELISA;

(e) нейтрализует способность MERS-CoV инфицировать клетки-хозяева человека более чем на 90% и при IC_{50} менее чем 4 нМ, что измерено посредством анализа нейтрализации вирусоподобных частиц (VLP).

6. Фармацевтическая композиция для профилактики, лечения или облегчения течения по меньшей мере одного симптома или показания при инфекции MERS-CoV, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVH) с парой аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66/74 или

(ii) набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) SEQ ID NO: 68-70-72-76-78-80.

8. Фармацевтическая композиция по п.6, также содержащая второе антитело против MERS-CoV-S или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не способно к перекрестному конкурентному связыванию со вторым антителом в отношении связывания спайк-белка MERS-CoV, и фармацевтически приемлемый носитель или растворитель.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, в которой:

(a) одно из антител содержит:

(i) набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) SEQ ID NO: 68-70-72-76-78-80 или

(ii) пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 66/74; и

(b) другое антитело содержит:

(i) набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) SEQ ID NO: 220-222-224-228-230-232 или

(ii) пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 218/226.

10. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR и LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5.

11. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность по п.10.

12. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.11.

13. Способ профилактики, лечения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома или признака инфекции MERS-CoV, который включает введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5 или фармацевтической композиции по любому из пп.6-9.

14. Способ по п.13, где по меньшей мере один симптом или признак выбран из группы, состоящей из воспаления легкого, альвеолярного повреждения, вирусной нагрузки, повышенной температуры, кашля, затруднения дыхания, пневмонии, диареи, функциональной недостаточности органов, септического шока и летального исхода.

15. Способ по п.13 или 14, где фармацевтическую композицию или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту с профилактической или терапевтической целью.

16. Способ по п.15, где фармацевтическую композицию или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят с профилактической целью пациенту, выбранному из группы, состоящей из индивида с ослабленным иммунитетом, пожилого человека (возрастом старше 65 лет), туриста, посещающего области Ближнего Востока, работника сферы здравоохранения, индивида с нарушениями состояния здоровья в анамнезе (например, с нарушениями сердечно-сосудистой системы и с диабетом), индивида, контактирующего с верблюдами или летучими мышами по роду деятельности или с целью развлечения, и индивида, контактирующего с индивидом(индивидами) с подтвержденной инфекцией MERS или с подозрением на нее.

17. Способ по любому из пп.13-16, где фармацевтическую композицию или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством, где второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из противовоспалительного лекарственного средства (такого как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), противовирусного лекарственного средства, другого антитела к спайк-белку MERS-CoV, вакцины против MERS-CoV, антибиотиков, пищевой добавки, такой как антиоксиданты, и любого другого паллиативного терапевтического средства для лечения инфекции MERS.

18. Способ по любому из пп.13-16, где фармацевтическую композицию или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, интраперитонеально, перорально, внутримышечно или интракраниально.

19. Способ по любому из пп.13-16, где фармацевтическую композицию или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 мг/кг массы тела пациента и/или в одной или нескольких дозах, содержащих от 50 до 600 мг.

20. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5 в комбинации со вторым антителом против MERS-CoV-S или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело по любому из пп.1-5 не обладает способностью перекрестно конкурентно связываться с указанным вторым антителом, для лечения или облегчения течения инфекции MERS.

21. Применение композиции по любому из пп.6-9 в комбинации со вторым антителом против MERS-CoV-S или его антигенсвязывающим фрагментом для лечения или облегчения течения инфекции MERS.

22. Применение по п.20 или 21, в котором:

(a) одно из антител содержит:

(i) набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) SEQ ID NO: 68-70-72-76-

78-80 или

(ii) пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 66/74; и

(b) другое антитело содержит:

(i) набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) SEQ ID NO: 220-222-224-228-230-232 или

(ii) пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 218/226.

ID Образца	ELISA Связывание	ELISA Блокирование	% Нейтрализация (0,025 мкг/мл)	Нейтрализация IC50 (М)	KD (М)	t 1/2(мин)
HBV X06H05	2,676	99,7	99%	1,328E-10	1,72E-09	11,1
HBV X11H04	2,623	99,7	99%	1,492E-10	3,28E-10	94,1
HBV X11D02	2,420	97,8	98%	2,108E-10	2,05E-09	13,5
HBV Z10E10	2,537	90,8	98%	4,636E-10	2,77E-09	10,4
HBV Y09F08	2,044	99,3	98%	3,245E-10	1,79E-09	17,3
HBV Z05G02	2,515	92,7	97%	2,212E-10	2,72E-09	9,5
HBV Z09B06	2,751	100,2	97%	1,759E-10	6,53E-09	7,4
HBV Y01F08	2,182	99,0	97%	1,377E-10	2,66E-10	96,0
HBV Y10G02	2,587	100,1	97%	2,737E-10	3,73E-09	7,7
HBV Y04B06	2,463	100,1	96%	6,845E-11	1,51E-09	13,3
HBV Y07D10	2,417	25,9	40%	1,02E-09	9,39E-09	29,5
HBV Z08A09	2,782	100,1	91%	3,567E-10	5,93E-10	67,8
HBV Z05G04	2,675	99,8	90%	3,054E-10	4,77E-10	≥115
HBV Y06C07	2,508	90,9	89%	5,56E-10	3,94E-10	≥115
HBV Y03H06	2,735	97,6	89%	4,253E-10	6,69E-10	≥115
HBV Z10G06	2,383	98,7	86%	4,357E-10	4,72E-10	≥115
HBV Z04F10	2,756	96,3	83%	5,843E-10	7,78E-10	80,7
HBV X11E09	2,533	100,3	5%	3,587E-09	2,45E-10	≥115
HBV Y06H09	2,806	7,4	2%	-	7,12E-09	18,8
HBV Z05B11	2,677	2,6	-6%	-	2,97E-09	94,8
HBV Y02E05	2,644	74,4	-10%	-	2,15E-08	13,3
HBV Z04C07	2,405	14,8	40%	1,534E-09	IC	IC

Фиг. 1

Связывание mAb-2 с предварительно образовавшимся комплексом mAb-1 в MERS.hFc

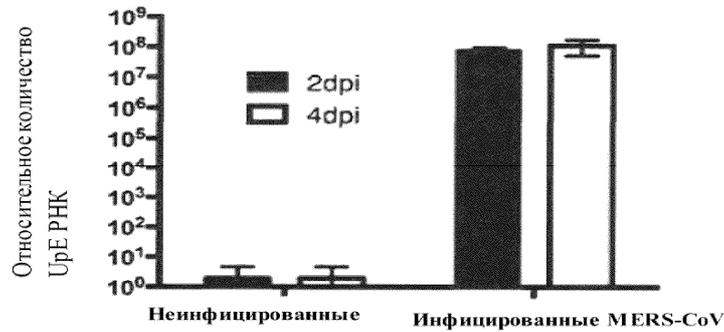
mAb-1	Липиды	KD (нМ) в (m In) при 25 °C	Уровет. связывания MERS.hFc (нМ)	Связывание mAb 1(нМ)	mAb №	Связывание mAb 2																		
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
H2aM15281N	1633	0,39 / 14	0,67 ± 0,03	0,67 ± 0,02	1	0,08	0,11	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,41	0,36	0,56	0,53	0,55	0,51	0,61	0,62	0,41	0,50	0,48	0,02
H1M15290N	1633	0,44 / 55	0,68 ± 0,02	0,71 ± 0,02	2	0,08	0,08	0,06	0,08	0,08	0,07	0,07	0,39	0,29	0,52	0,50	0,50	0,44	0,60	0,61	0,39	0,49	0,55	0,03
H1M15293N	1633	0,33 / 58	0,67 ± 0,03	0,67 ± 0,02	3	0,11	0,10	0,08	0,10	0,11	0,10	0,09	0,47	0,35	0,57	0,53	0,54	0,48	0,64	0,61	0,39	0,51	0,51	0,03
H2bM15291N	1633	0,56 / 82	0,73 ± 0,07	0,62 ± 0,01	4	0,09	0,09	0,08	0,11	0,09	0,08	0,09	0,33	0,32	0,55	0,53	0,53	0,47	0,69	0,59	0,41	0,52	0,60	0,04
H2aM15272N	1633	0,44 / 16	0,68 ± 0,04	0,67 ± 0,03	5	0,08	0,11	0,07	0,07	0,09	0,07	0,07	0,15	0,38	0,56	0,53	0,54	0,49	0,63	0,60	0,38	0,52	0,46	0,03
H2bM15292N	1633	0,34 / 75	0,64 ± 0,03	0,62 ± 0,02	6	0,10	0,11	0,08	0,09	0,10	0,14	0,08	0,33	0,39	0,57	0,52	0,55	0,48	0,61	0,62	0,43	0,53	0,54	0,04
H2aM15271N	Adam6/VT.3	1,37 / 9	0,68 ± 0,04	0,68 ± 0,02	7	0,09	0,10	0,07	0,08	0,08	0,07	0,08	0,11	0,40	0,52	0,50	0,23	0,47	0,58	0,60	0,39	0,50	0,46	0,00
H2aM15270N	Adam6/VT.3	0,78 / 19	0,69 ± 0,03	0,74 ± 0,02	8	0,32	0,27	0,21	0,16	0,09	0,14	0,06	0,10	0,11	0,06	0,06	0,06	0,05	0,09	0,05	0,40	0,49	0,50	0,02
H1M15280N	1633	18,5 / 2	0,56 ± 0,02	0,63 ± 0,02	9	0,45	0,49	0,44	0,48	0,48	0,48	0,50	0,29	0,18	0,24	0,24	0,25	0,22	0,26	0,27	0,38	0,42	0,42	0,04
H2aM15268N	Adam6/VI.3	0,36 / 12	0,82 ± 0,10	0,69 ± 0,01	10	0,60	0,62	0,53	0,53	0,56	0,53	0,55	0,14	0,14	0,08	0,08	0,07	0,09	0,11	0,59	0,42	0,55	0,65	0,03
H1M15267N	Adam6/VI.3	0,18 / 75	0,80 ± 0,10	0,68 ± 0,02	11	0,57	0,58	0,53	0,52	0,58	0,50	0,58	0,13	0,14	0,08	0,07	0,09	0,06	0,10	0,55	0,43	0,53	0,60	0,05
H2aM15279N	Adam6/VI.3	0,1 / 130	0,68 ± 0,03	0,66 ± 0,02	12	0,58	0,58	0,50	0,53	0,55	0,49	0,39	0,12	0,14	0,06	0,08	0,08	0,07	0,09	0,55	0,42	0,52	0,54	0,03
H1M15289N	Adam6/VI.3	0,21 / 262	0,78 ± 0,09	0,67 ± 0,02	13	0,60	0,58	0,54	0,55	0,56	0,55	0,54	0,14	0,13	0,08	0,07	0,08	0,05	0,10	0,59	0,44	0,52	0,57	0,03
H1M15277N	Adam6/VI.3	0,35 / 13	0,54 ± 0,01	0,72 ± 0,02	14	0,62	0,61	0,52	0,58	0,63	0,54	0,57	0,10	0,10	0,06	0,05	0,07	0,05	0,07	0,64	0,33	0,42	0,38	0,01
H2aM15278N	Adam6/VI.3	0,51 / 13	0,79 ± 0,09	0,67 ± 0,01	15	0,61	0,64	0,58	0,56	0,60	0,58	0,58	0,13	0,11	0,55	0,46	0,48	0,51	0,60	0,07	0,41	0,50	0,61	0,00
H2aM15287N	Adam6/VI.3	6,98 / 26	0,66 ± 0,03	0,59 ± 0,02	16	0,60	0,57	0,50	0,53	0,56	0,57	0,57	0,62	0,44	0,58	0,55	0,55	0,51	0,66	0,58	0,10	0,14	0,49	0,03
H1M15288N	Adam6/VI.3	4,15 / 16	0,66 ± 0,04	0,66 ± 0,02	17	0,59	0,56	0,48	0,52	0,54	0,53	0,56	0,60	0,41	0,56	0,51	0,56	0,51	0,60	0,61	0,08	0,08	0,40	0,03
H1M15269N	Adam6/VI.3	0,62 / 107	0,62 ± 0,05	0,66 ± 0,11	18	0,61	0,58	0,51	0,58	0,62	0,59	0,60	0,59	0,49	0,49	0,49	0,49	0,47	0,53	0,58	0,31	0,41	0,08	0,04
Буфер	н.д.	н.д.	0,63 ± 0,03	0,11 ± 0,01	19	0,61	0,61	0,56	0,58	0,57	0,61	0,58	0,61	0,50	0,56	0,57	0,59	0,55	0,61	0,61	0,51	0,58	0,50	0,04

Фиг. 2

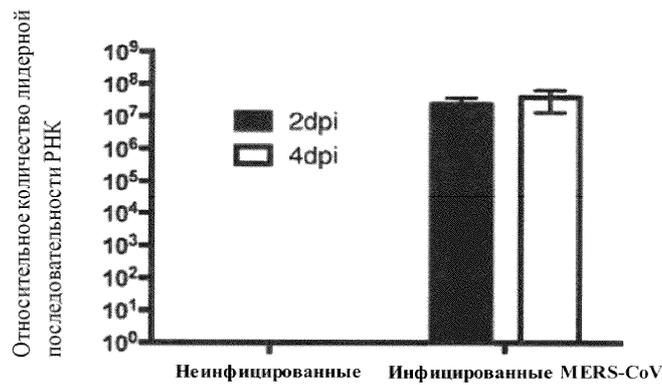
Связывание mAb-2 с предварительно образовавшимся комплексом mAb-1 b MERS.mFc

Игр. mAb	mAb-1	Уровень связывания MERS.mFc (нм)	Связывание mAb-1 (нм)	mAb №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
9,18	H1N15215P	0,38 ± 0,01	0,56 ± 0,02	1	0,02	0,04	0,02	0,19	0,03	0,03	0,04	0,05	0,04	0,03	0,03	0,30	0,29	0,12	0,33	0,04	
16,6	H1N15177P	0,45 ± 0,01	0,60 ± 0,02	2	0,04	0,06	0,03	0,22	0,05	0,03	0,05	0,05	0,07	0,07	0,06	0,39	0,36	0,21	0,36	0,06	
9,7	H1N15203P	0,36 ± 0,02	0,51 ± 0,02	3	0,01	0,04	0,02	0,20	0,04	0,01	0,02	0,03	0,04	0,01	0,03	0,31	0,33	0,19	0,34	0,04	
11	H1N15211P	0,45 ± 0,01	0,76 ± 0,03	4	0,01	0,02	-0,01	0,14	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	-0,01	0,02	0,35	0,32	0,18	0,36	0,02	
6,64	H1N15188P	0,38 ± 0,02	0,54 ± 0,02	5	0,02	0,05	0,03	0,19	0,04	0,03	0,03	0,02	0,04	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,06	
6,63	H1N15208P	0,35 ± 0,02	0,46 ± 0,03	6	0,02	0,03	0,03	0,25	0,04	0,01	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	
8,29	H1N15228P2	0,37 ± 0,01	0,52 ± 0,02	7	0,00	0,03	0,01	0,19	0,03	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	
8,51	H1N15233P2	0,34 ± 0,02	0,46 ± 0,03	8	0,01	0,03	0,01	0,23	0,04	0,02	0,01	0,02	0,03	0,00	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,03	
9,43	H1N15237P2	0,32 ± 0,02	0,39 ± 0,02	9	0,01	0,05	0,01	0,21	0,03	-0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,04
9,56	H1N15253P2	0,32 ± 0,02	0,38 ± 0,02	10	0,03	0,06	0,05	0,27	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,00	0,01	0,02	0,03
9,13	H1N15259P2	0,33 ± 0,01	0,42 ± 0,01	11	0,12	0,15	0,12	0,30	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	
6,32	H1N15231P2	0,37 ± 0,01	0,50 ± 0,02	12	0,33	0,38	0,35	0,53	0,02	0,01	0,02	0,03	0,01	-0,01	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	
7,45	H1N15249P2	0,32 ± 0,02	0,40 ± 0,02	13	0,29	0,33	0,30	0,52	0,04	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	
0,24	H1N15260P2	0,32 ± 0,01	0,39 ± 0,01	14	0,28	0,39	0,35	0,54	0,04	0,02	0,04	0,04	0,05	0,02	0,03	0,04	0,02	0,03	0,04	0,02	
7,22	H1N15264P2	0,33 ± 0,01	0,41 ± 0,01	15	0,32	0,38	0,34	0,55	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01	0,02	0,02	
10	REGN1536	0,33 ± 0,01	0,12 ± 0,01	16	0,35	0,38	0,33	0,55	0,25	0,27	0,28	0,29	0,28	0,24	0,30	0,29	0,27	0,24	0,30	0,03	

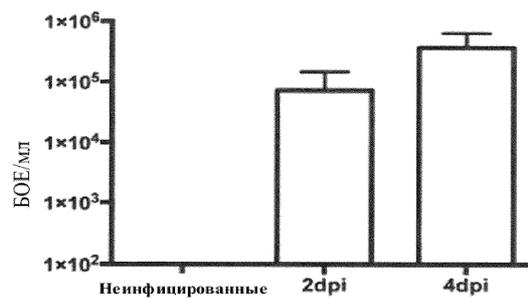
Фиг. 3



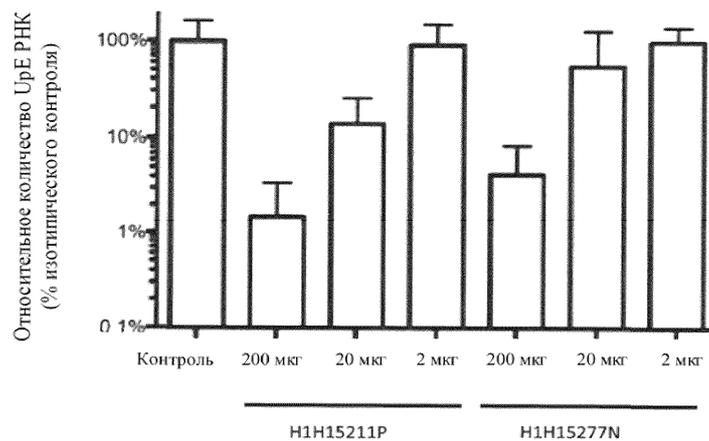
Фиг. 4



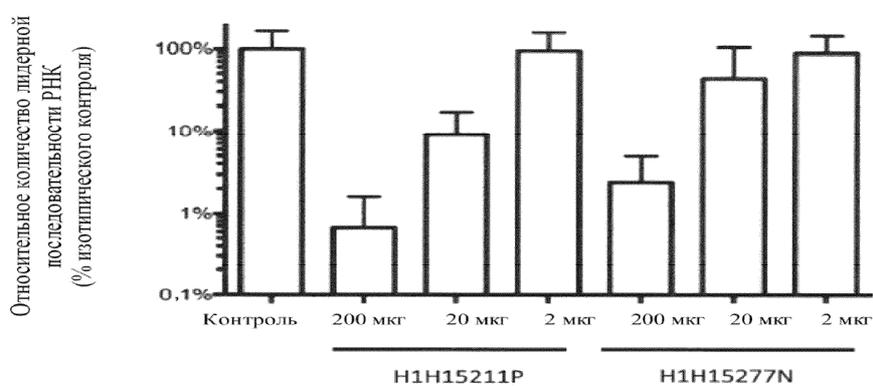
Фиг. 5



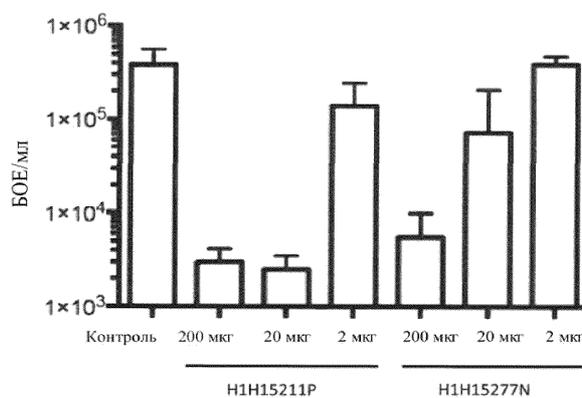
Фиг. 6



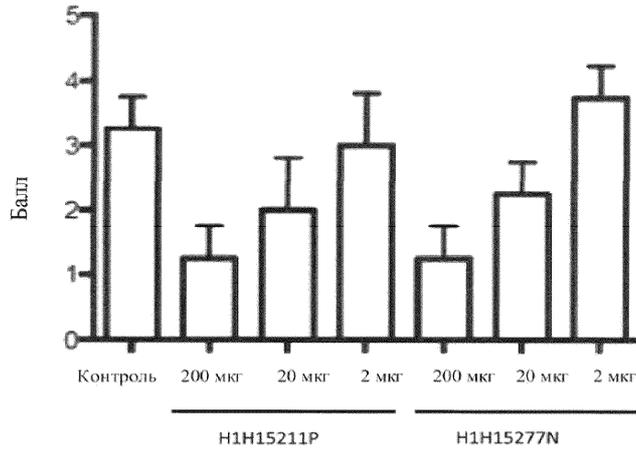
Фиг. 7



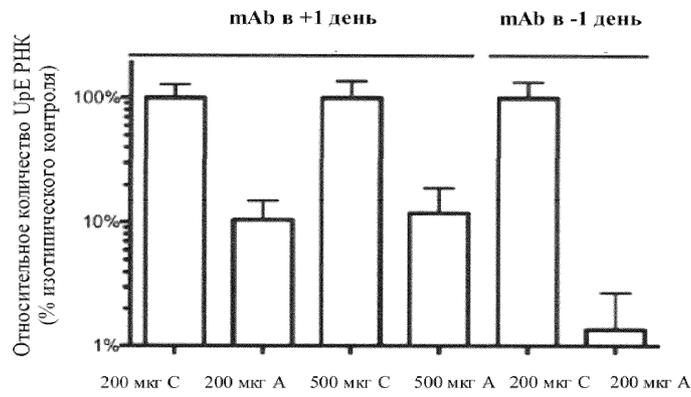
Фиг. 8



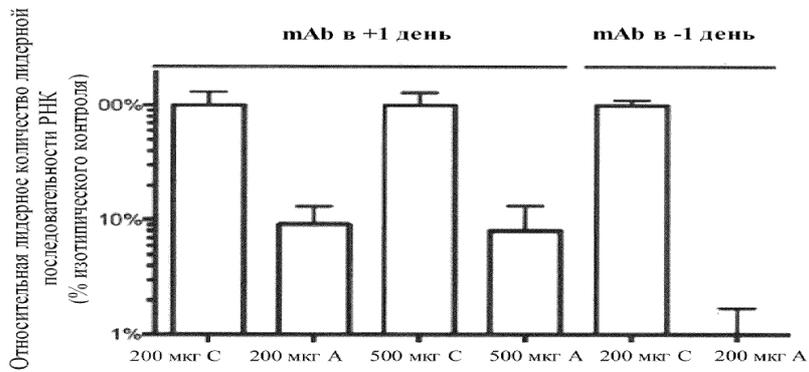
Фиг. 9



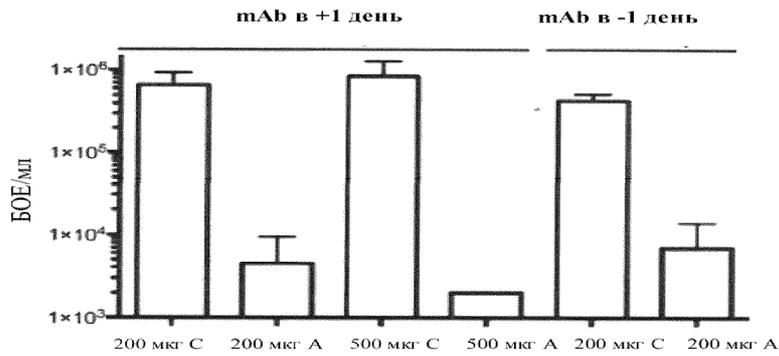
Фиг. 10



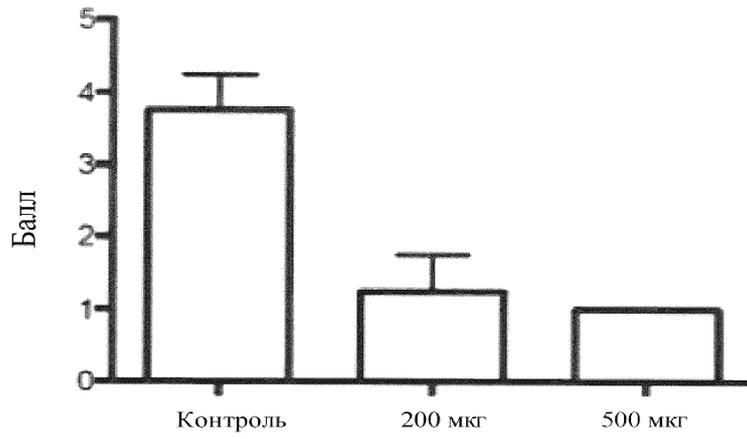
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

