

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202091781 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.10.21

(51) Int. Cl. C07K 16/10 (2006.01)  
G01N 33/569 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.11.30

(54) СВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, ОБЛАДАЮЩАЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ КОРОНАВИРУСА БЛИЖНЕВОСТОЧНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА

(31) 10-2018-0011776; 10-2018-0108125;  
10-2018-0138228

(72) Изобретатель:  
Ли Соо Йоунг, Йи Кие Соок, Ким Чеол  
Мин, Сонг Кيونг Мин, Бае Йеон  
Дзин, Ким Воо Дзоо, Чеонг Хе Дзин,  
Сонг Дзун Йоунг, Парк Ман Сеонг,  
Нох Джи Йоунг (KR)

(32) 2018.01.31; 2018.09.11; 2018.11.12

(33) KR

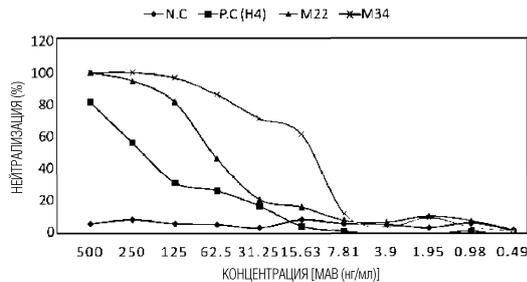
(86) PCT/KR2018/015141

(87) WO 2019/151632 2019.08.08

(71) Заявитель:  
СЕЛЛТРИОН ИНК. (KR)

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

(57) Настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, обладающей нейтрализующей активностью в отношении коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). Более конкретно, настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, обладающей сильной способностью связываться с S-белком MERS-CoV и нейтрализующей активностью в отношении MERS-CoV, и, следовательно, очень полезной в предупреждении, лечении или диагностике инфекции MERS-CoV.



A1

202091781

202091781

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563971EA/042

### СВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, ОБЛАДАЮЩАЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ КОРОНАВИРУСА БЛИЖНЕВОСТОЧНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА

Область техники

**[0001]** Настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, обладающей нейтрализующей активностью в отношении коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). Более конкретно, настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, обладающей сильной способностью связываться с шиповидным белком (S-белком) на поверхности MERS-CoV и нейтрализующей активностью в отношении MERS-CoV, и, следовательно, очень полезной в предупреждении, лечении или диагностике инфекции MERS-CoV.

**[0002]**

Уровень техники

**[0003]** Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) представляет собой инфекционное заболевание, вызываемое коронавирусом, относящемуся к Betacoronavirus, и первый вызывающий это заболевание вирус был обнаружен у пациента с пневмонией неясной этиологии на Ближнем Востоке в 2012. Считается, что MERS-CoV произошел от летучих мышей, и на сегодняшний день известно, что он попадет в человека через верблюдов. Хотя путь его распространения не был полностью охарактеризован, представляется, что этот вирус неоднократно передавался от верблюдов людям на Ближнем Востоке, и что происходит ограниченная и непостоянная передача от человека человеку.

**[0004]**

**[0005]** До сих пор MERS-CoV имел место в 27 странах, причем было 2078 пациентов с сентября 2012 г. до 29 сентября 2017 г. Из этих пациентов 730 умерло, что указывает на уровень летальности 35,1% (ВОЗ). Специальных терапевтических или профилактических средств пока нет, а роль противовирусных препаратов не была четко продемонстрирована. Учитывая высокую летальность и заболеваемость MERS-CoV, активное лечение с использованием противовирусных препаратов, такое как комбинированная терапия с рибавирином, интерфероном альфа-2а и лопинавиром/ритонавиром, рекомендуется на ранних стадиях заболевания, но является проблематичным из-за его побочных эффектов.

**[0006]**

**[0007]** Между тем, в качестве традиционной технологии для связывающих MERS-CoV антител корейский патент № 10-1593641 раскрывает антитело, которое распознает нуклеокапсид MERS-CoV, содержащую его диагностическую композицию, набор и способ детектирования MERS-CoV с его использованием. Этот документ относится к определению инфицирования MERS-CoV с использованием антитела, которое

специфически связывается с нуклеокапсидом MERS-CoV, но нейтрализующая активность этого антитела в отношении MERS-CoV неизвестна, поэтому имеет место неудовлетворенная потребность в антителах, оказывающих терапевтический эффект на MERS-CoV.

**[0008]**

### **Раскрытие**

#### **Техническая проблема**

**[0009]** Таким образом, авторы настоящего изобретения разработали связывающую молекулу, обладающую способностью связываться с S-белком MERS-CoV, для решения проблем, с которыми сталкиваются в данной области техники, и установили, что связывающая молекула обладает нейтрализующей эффективностью в отношении MERS-CoV, тем самым завершив настоящее изобретение.

**[0010]**

**[0011]** Целью настоящего изобретения является обеспечение связывающей молекулы, которая связывается с S-белком MERS-CoV и, следовательно, обладает нейтрализующей активностью в отношении MERS-CoV.

**[0012]**

**[0013]** Другой целью настоящего изобретения является обеспечение композиции для предотвращения или лечения MERS-CoV, содержащей данную связывающую молекулу.

**[0014]**

**[0015]** Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение набора для диагностики MERS-CoV, содержащего данную связывающую молекулу.

**[0016]**

#### **Техническое решение**

**[0017]** Для достижения вышеуказанных целей вариант осуществления настоящего изобретения предлагает нейтрализующую связывающую молекулу, которая связывается с шиповидным белком (S-белком) на поверхности MERS-CoV (коронавирус ближневосточного респираторного синдрома).

**[0018]**

**[0019]** Другой вариант осуществления настоящего изобретения предлагает композицию для предотвращения или лечения MERS-CoV, содержащую данную связывающую молекулу.

**[0020]**

**[0021]** Еще один вариант осуществления настоящего изобретения предлагает набор для диагностики MERS-CoV, содержащий данную связывающую молекулу.

**[0022]**

**[0023]** Далее будет приведено подробное описание настоящего изобретения.

**[0024]**

**[0025]** Вариант осуществления настоящего изобретения относится к

нейтрализующей связывающей молекуле, которая связывается с S-белком MERS-CoV.

**[0026]**

**[0027]** Вариант осуществления настоящего изобретения относится к нейтрализующей связывающей молекуле, которая представляет собой любую молекулу, выбранную из группы, состоящей из связывающих молекул с i) по vi) ниже.

**[0028]** i) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 1, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 2 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 3, и б) переменную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 4, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 5 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 6

**[0029]** ii) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 7, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 8 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 9, и б) переменную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 10, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 11 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 12

**[0030]** iii) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 13, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 14 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 15, и б) переменную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 16, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 17 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 18

**[0031]** iv) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 19, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 20 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 21, и б) переменную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 22, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 23 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 24

**[0032]** v) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 25, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 26 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 27, и б) переменную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 28, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 29 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 30

**[0033]** vi) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 31, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 32 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 33, и б) переменную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 34, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 35 и область CDR3 в соответствии с

SEQ ID NO: 36

**[0034]**

**[0035]** В варианте осуществления настоящего изобретения связывающая молекула содержит антитела с 1 по 36, как показано в таблице 1 ниже.

**[0036]** [Таблица 1]

Классификация	CDR1 тяжелой цепи	CDR2 тяжелой цепи	CDR3 тяжелой цепи	CDR1 легкой цепи	CDR2 легкой цепи	CDR3 легкой цепи
Антитело 1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
Антитело 2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
Антитело 3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
Антитело 4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
Антитело 5	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
Антитело 6	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36

**[0037]** В настоящем изобретении CDR переменных областей были определены с помощью стандартного метода с использованием системы, разработанной Кабатом и др. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (5<sup>th</sup>), National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Нумерация CDR, используемая в настоящем изобретении, определяется с использованием способа Кабата, но настоящее изобретение также охватывает связывающие молекулы, содержащие CDR, определенные с помощью других методов, таких как метод IMGT, метод Чотиа, метод AbM и т.п.

**[0038]**

**[0039]** Вариант осуществления настоящего изобретения относится к нейтрализующей связывающей молекуле, которая представляет собой любую молекулу, выбранную из группы, состоящей из связывающих молекул с i) по vi) ниже.

**[0040]** i) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью тяжелой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 37, и b) переменную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью легкой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 38

**[0041]** ii) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью тяжелой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 39, и б) переменную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью легкой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 40

**[0042]** iii) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью тяжелой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 41, и б) переменную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью легкой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 42

**[0043]** iv) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью тяжелой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 43, и б) переменную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью легкой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 44

**[0044]** v) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью тяжелой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 45, и б) переменную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью легкой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 46

**[0045]** vi) связывающая молекула, содержащая а) переменную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью тяжелой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 47, и б) переменную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности 95% или больше с переменной областью легкой цепи полипептидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 48

**[0046]**

**[0047]** В варианте осуществления настоящего изобретения связывающая молекула содержит антитела с 1 по 6, как показано в таблице 2 ниже.

**[0048]** [Таблица 2]

Классификация	Переменная область тяжелой цепи	Переменная область легкой цепи	Классификация	Переменная область тяжелой цепи	Переменная область легкой цепи
Антитело 1	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	Антитело 4	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44

Антитело 2	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	Антитело 5	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46
Антитело 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	Антитело 6	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48

**[0049]** В варианте осуществления настоящего изобретения связывающая молекула может представлять собой Fab-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело, химерное антитело, гуманизированное антитело или человеческое антитело, но без ограничения ими. Вариант осуществления настоящего изобретения предлагает полностью человеческое антитело, которое связывается с S-белком. При использовании в настоящем документе термин "антитело" используют в настолько широком значении, насколько возможно, и, в частности, он включает интактное моноклональное антитело, поликлональное антитело, полиспецифическое антитело, образованное из двух или более интактных антител (например, биспецифическое антитело), и фрагмент антитела, который демонстрирует желаемую биологическую активность. Антитело представляет собой белок, который вырабатывается иммунной системой, способный распознавать специфический антиген и связываться с ним. Антитело обычно имеет вид Y-образного белка, содержащего четыре аминокислотные цепи (две тяжелые цепи и две легкие цепи). Каждое антитело имеет две области, а именно переменную область и константную область. Переменная область, которая расположена на концах плеч Y, связывается с антигеном-мишенью и взаимодействует с ним. Переменная область включает в себя определяющую комплементарность область (CDR), которая распознает сайт специфического связывания на конкретном антигене и связывается с ним. Константная область, которая расположена в ножке Y, распознается иммунной системой и взаимодействует с ней. Антиген-мишень имеет множество сайтов связывания, называемых эпитопами, которые распознаются CDR на антителах. Соответствующие антитела, специфически связывающиеся с разными эпитопами, имеют разную структуру. Поэтому один антиген может иметь по меньшей мере одно соответствующее ему антитело.

**[0050]**

**[0051]** Кроме того, настоящее изобретение включает в себя функциональный вариант связывающей молекулы. Такие связывающие молекулы рассматриваются как функциональные варианты связывающей молекулы настоящего изобретения, при условии, что эти варианты способны конкурировать со связывающей молекулой настоящего изобретения, чтобы специфически связываться с MERS-CoV или с его S-белком, а также обладают нейтрализующей активностью в отношении MERS-CoV. Такие функциональные варианты включают, но без ограничения, производные, первичные конформационные последовательности которых по существу сходны, и их примеры включают модификации *in vitro* или *in vivo*, химические вещества и/или биохимические вещества, и они не обнаруживаются в исходном моноклональном антителе настоящего изобретения. Примеры таких модификаций могут включать ацетилирование,

ацилирование, ковалентное связывание нуклеотидов или производных нуклеотидов, ковалентное связывание липидов или производных липидов, сшивание, дисульфидное связывание, гликозилирование, гидроксильное, метилирование, окисление, пегилирование, протеолиз и фосфорилирование. Функциональный вариант может выборочно представлять собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность, полученную в результате подвергания по меньшей мере одной аминокислоты замене, вставке, делеции или их комбинации по сравнению с аминокислотной последовательностью исходного антитела. Кроме того, функциональный вариант может включать усеченную форму аминокислотной последовательности на одном или обоих из аминоконца и карбоксильного конца. Функциональный вариант настоящего изобретения может иметь аффинность связывания, такую же как у исходного антитела настоящего изобретения или отличающуюся от нее, т.е. более высокую или более низкую, но все же может связываться с MERS-CoV или с его S-белком. Например, может быть модифицирована аминокислотная последовательность варибельной области, включая, но без ограничения, каркасную структуру или гиперварибельную область, в частности CDR (определяющую комплементарность область) легкой цепи или тяжелой цепи. Как правило, область легкой цепи или тяжелой цепи включает в себя три гиперварибельные области, содержащие три CDR, и более консервативные области, а именно каркасные области (FR). Гиперварибельная область включает в себя аминокислотный остаток из CDR и аминокислотный остаток из гиперварибельной петли. Функциональный вариант, который входит в объем настоящего изобретения, может иметь гомологию аминокислотной последовательности приблизительно 50%-99%, приблизительно 60%-99%, приблизительно 80%-99%, приблизительно 90%-99%, приблизительно 95%-99% или приблизительно 97%-99% с исходным антителом настоящего изобретения. Для оптимального расположения сравниваемых аминокислотных последовательностей, а также для определения сходных или идентичных аминокислотных остатков из компьютерных алгоритмов можно использовать Gap или Best-fit, известные специалистам в данной области техники. Функциональный вариант можно получить, подвергая исходное антитело или его часть известному молекулярно-биологическому процессу, включая ПЦР или мутагенез/частичный мутагенез с использованием олигомерного нуклеотида, или процессу органического синтеза, но настоящее изобретение не ограничено этим.

**[0052]**

**[0053]** Кроме того, к связывающей молекуле может быть дополнительно присоединено лекарственное средство. В частности, связывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением может быть использована в форме конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего конъюгированное с ним лекарственное средство. Когда для местной доставки лекарственного средства используют конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), то есть иммуноконъюгат, становится возможной целенаправленная доставка лекарственного фрагмента в инфицированные клетки. При

введении лекарственного средства без конъюгирования могут возникать неприемлемые для нормальных клеток уровни токсичности. Увеличивая не только конъюгацию с лекарственным средством и высвобождаемость лекарственного средства, но также и селективность поликлонального антитела и моноклонального антитела (mAb), можно получать максимальную эффективность и минимальную токсичность.

**[0054]**

**[0055]** Использование типичных средств для прикрепления лекарственного фрагмента к антителу, например, ковалентного связывания, может приводить к образованию гетерогенных молекулярных смесей, в который лекарственный фрагмент прикреплен ко множеству сайтов антитела. Например, цитотоксическое лекарственное средство конъюгируют с антителом через множество остатков лизина антитела, чтобы таким образом получить гетерогенную смесь конъюгатов антитело-лекарственное средство. В зависимости от условий реакции такая гетерогенная смесь обычно имеет распределение, при котором число антител, прикрепленных к лекарственному фрагменту, находится в диапазоне от 0 до приблизительно 8 или более. Кроме того, каждая подгруппа конъюгата, содержащая лекарственный фрагмент и антитело в определенном целочисленном соотношении, представляет собой потенциальную гетерогенную смесь, в которой лекарственный фрагмент присоединен к различным сайтам антитела. Антитела представляют собой биомолекулы, которые являются большими, сложными и структурно различными, и часто имеют множество реактивных функциональных групп. Реакционная способность линкерного реагента и промежуточного соединения лекарственное средство-линкер зависит от таких факторов, как pH, концентрация, концентрация соли и соразтворители.

**[0056]**

**[0057]** Кроме того, вариант осуществления настоящего изобретения предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающую молекулу.

**[0058]**

**[0059]** Молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения включает любую молекулу нуклеиновой кислоты, в которой аминокислотная последовательность антитела, предлагаемого настоящим изобретением, транслирована в полинуклеотидную последовательность, как известно специалистам в данной области техники. Таким образом, с использованием ORF (открытая рамка считывания) могут быть получены различные полинуклеотидные последовательности, и они могут быть также включены в молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения.

**[0060]**

**[0061]** Кроме того, вариант осуществления настоящего изобретения предлагает вектор экспрессии, в который вставлена данная молекула нуклеиновой кислоты.

**[0062]**

**[0063]** Вектор экспрессии может включать, но без ограничения, любой вектор, выбранный из группы, состоящей из вектора экспрессии, доступного от Celltrion, такого

как вектор MagEx (корейский патент № 10-1076602), и коммерчески широко используемого вектора pCDNA, вектора F, R1, RP1, Co1, pBR322, ToL и Ti; космиды; фагов, таких как лямбда, лямбдоид, M13, Mu, p1 P22, Q $\mu$ , T-even, T2, T3, T7 и т.д.; и вирусов растений, и в настоящем изобретении можно использовать любой вектор экспрессии, известный специалистам в данной области техники, а вектор экспрессии может быть выбран в зависимости от свойств представляющей интерес клетки-хозяина. Введение вектора в клетку-хозяина может быть осуществлено с помощью трансфекции фосфатом кальция, вирусной инфекции, опосредованной ДЭАЭ-декстраном трансфекции, липофектаминовой трансфекции или электропорации, но настоящее изобретение не ограничено этим, и специалисты в данной области техники могут выбрать способ введения, подходящий для вектора экспрессии и клетки-хозяина. Например, вектор экспрессии может содержать по меньшей мере один маркер отбора, но без ограничения этим, и отбор возможен в зависимости от того, может ли продукт быть получен с использованием вектора, не содержащего маркер отбора, или нет. Выбор маркера отбора зависит от представляющей интерес клетки-хозяина и выполняется с использованием любого способа, известного специалистам в данной области техники, и, таким образом, настоящее изобретение не ограничено в этом отношении.

**[0064]**

**[0065]** Для легкой очитки связывающей молекулы настоящего изобретения последовательность метки может быть вставлена в вектор экспрессии и, следовательно, слита с ним. Метка может включать, но без ограничения, гексагистидиновую метку, гемагглютининовую метку, метку тус или метку flag, и любую метку можно использовать в настоящем изобретении, если она облегчает очистку, как известно специалистам в данной области техники.

**[0066]**

**[0067]** Кроме того, вариант осуществления настоящего изобретения предлагает клеточную линию, в которой вектор экспрессии подвергается трансформации в клетку-хозяина с получением связывающей молекулы, которая связывается с MERS-CoV и, следовательно, обладает нейтрализующей активностью.

**[0068]**

**[0069]** В настоящем изобретении клеточная линия может включать, но без ограничения, клетки млекопитающих, растений, насекомых, грибов или клетки клеточного происхождения. В качестве клеток-хозяев можно использовать любые клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток млекопитающих, таких как клетки CHO, клетки F2N, клетки COS, клетки ВНК, клетки меланомы Боуэса, клетки HeLa, клетки 911, клетки HT1080, клетки A549, клетки НЕК 293 и клетки НЕК293Т, но настоящее изобретение не ограничено ими, и можно использовать любые клетки, при условии, что они могут быть использованы в качестве клеток-хозяев для млекопитающих, как известно специалистам в данной области техники.

**[0070]**

**[0071]** Кроме того, вариант осуществления настоящего изобретения относится к композиции для предупреждения или лечения инфекции MERS-CoV, содержащей связывающую молекулу. Композиция настоящего изобретения может включать в себя в дополнение к связывающей молекуле фармацевтически приемлемый эксципиент. Такие фармацевтически приемлемые эксципиенты хорошо известны специалистам в данной области техники.

**[0072]**

**[0073]** Композиция настоящего изобретения может дополнительно включать в себя по меньшей мере одно другое терапевтическое средство или диагностическое средство. Например, композиция настоящего изобретения может дополнительно включать в себя в дополнение к связывающей молекуле в качестве противовирусного препарата интерферон, моноклональное антитело против S-белка, поликлональное антитело против S-белка, нуклеозидный аналог, ингибитор ДНК-полимеразы, препарат миРНК или терапевтическую вакцину.

**[0074]**

**[0075]** Композиция настоящего изобретения, содержащая связывающую молекулу, может быть посредством соответствующих стандартных способов представлена в виде такой композиции, как стерильный раствор для инъекций, лиофилизованная композиция, раствор в предварительно заполненном шприце, композиция для перорального применения, композиция для наружного применения или суппозиторий, но настоящее изобретение не ограничено ими.

**[0076]**

**[0077]** Кроме того, композицию настоящего изобретения, содержащая связывающую молекулу, можно вводить пероральным или парентеральным способом. Например, путь введения может представлять собой внутривенное введение, но без ограничения им.

**[0078]**

**[0079]** Композицию настоящего изобретения вводят млекопитающему, включая человека, что предотвращает или лечит инфекцию MERS-CoV и заболевания, вызванные инфицированием MERS-CoV. В данном случае количество вводимой связывающей молекулы (например, антитела) зависит от объекта лечения, тяжести заболевания или состояния, скорости введения и предписания врача.

**[0080]**

**[0081]** Кроме того, вариант осуществления настоящего изобретения относится к диагностическому набору, содержащему связывающую молекулу. Связывающая молекула настоящего изобретения, используемая в диагностическом наборе, может быть детектируемым образом помечена. Различные способы, которые можно использовать для мечения биомолекул, хорошо известны специалистам в данной области техники и считаются находящимися в пределах объема настоящего изобретения. Примеры меток, используемых в настоящем изобретении, могут включать ферменты, радиоизотопы,

коллоидные металлы, флуоресцентные соединения, хемилюминесцентные соединения и биолюминесцентные соединения. Обычно используемые метки включают флуоресцентные вещества (например, флуоресцеин, родамин, тexasский красный и т.д.), ферменты (такие как пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза или щелочная фосфатаза), радиоизотопы (например,  $^{32}\text{P}$  или  $^{125}\text{I}$ ), биотин, дигоксигенин, коллоидные металлы или хемилюминесцентные или биолюминесцентные соединения (такие как диоксетан, люминол или акридиний). Способы мечения, такие как ковалентное связывание, йодирование, фосфорилирование, биотинилирование и т.д. ферментов или биотинильных групп, хорошо известны в данной области техники. Способы детектирования включают, но без ограничения, автордиографию, флуоресцентную микроскопию, прямые и непрямые ферментативные реакции и т.п. Обычно используемым способом обнаружения является радиоизотопный или нерадиоизотопный метод. Особенно полезными являются вестерн-блоттинг, оверлейный анализ, RIA (радиоиммуноанализ), IRMA (иммунорадиоиммунометрический анализ), EIA (иммуноферментный анализ), ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), FIA (флуоресцентный иммуноанализ) и CLIA (хемилюминесцентный иммуноанализ).

**[0082]**

**[0083]** Диагностический набор настоящего изобретения можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия MERS-CoV путем приведения образца в контакт со связывающей молекулой и наблюдения за реакцией.

**[0084]**

**[0085]** Образец может представлять собой, но без ограничения, любой образец, выбранный из группы, состоящей из мокроты, слюны, крови, пота, клеток легких, слизи легочной ткани, воздухоносной ткани и плевка субъекта, и образец может быть получен с использованием способа, обычно известного специалистам в данной области техники.

**[0086]**

**[0087]** Кроме того, вариант осуществления настоящего изобретения предлагает набор для диагностики, предупреждения или лечения заболевания, вызванного MERS-CoV, содержащий:

**[0088]** а) связывающую молекулу; и

**[0089]** б) сосуд.

**[0090]**

**[0091]**

**[0092]** В наборе для диагностики, предупреждения или лечения в соответствии с настоящим изобретением твердый носитель может быть заключен в его сосуд. Антитело настоящего изобретения может быть присоединено к твердому носителю, и твердый носитель может быть пористым или непористым или может быть плоским или неплоским.

**[0093]**

**[0094]** Кроме того, настоящее изобретение предлагает способ диагностики, предотвращения или лечения заболевания, вызванного инфицированием MERS-CoV,

содержащий введение вышеуказанной композиции в терапевтически эффективном количестве субъекту, имеющему заболевание, вызванное инфицированием MERS-CoV.

**[0095]**

**[0096]** В варианте осуществления настоящего изобретения способ диагностики, предупреждения или лечения может дополнительно включать в себя введение противовирусного препарата, ингибитора проникновения вирусов или ингибитора адгезии вирусов.

**[0097]**

**[0098]** Термины, используемые в настоящем изобретении, определяются следующим образом.

**[0099]**

**[00100]** При использовании в настоящем документе термин "связывающая молекула" относится к интактному иммуноглобулину, включая моноклональные антитела, такие как химерные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела, или к антигенсвязывающему фрагменту, который представляет собой иммуноглобулин, который связывается с антигеном. Например, он обозначает переменную область, фермент, рецептор или белок, который содержит фрагмент иммуноглобулина, который конкурирует с интактным иммуноглобулином за связывание с шиповидным белком MERS-CoV. Независимо от структуры антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же антигеном, который распознается интактным иммуноглобулином. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность антитела, состоящую из 2 или более смежных аминокислотных остатков, 20 или более смежных аминокислотных остатков, 25 или более смежных аминокислотных остатков, 30 или более смежных аминокислотных остатков, 35 или более смежных аминокислотных остатков, 40 или более смежных аминокислотных остатков, 50 или более смежных аминокислотных остатков, 60 или более смежных аминокислотных остатков, 70 или более смежных аминокислотных остатков, 80 или более смежных аминокислотных остатков, 90 или более смежных аминокислотных остатков, 100 или более смежных аминокислотных остатков, 125 или более смежных аминокислотных остатков, 150 или более смежных аминокислотных остатков, 175 или более смежных аминокислотных остатков, 200 или более смежных аминокислотных остатков или 250 или более смежных аминокислотных остатков.

**[00101]**

**[00102]** При использовании в настоящем документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" обозначает Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dAb, Fd, фрагменты определяющей комплементарности области (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), двухвалентные одноцепочечные антитела, одноцепочечные фаговые антитела, диатела, триатела, тетраатела, полипептиды, которые содержат по меньшей мере один фрагмент иммуноглобулина, достаточный для придания полипептиду специфического связывания антигена, и т.д. Вышеуказанные фрагменты могут быть получены синтетически или

посредством ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов, или они могут быть получены с помощью генной инженерии посредством методов рекомбинантной ДНК. Такие способы получения хорошо известны в данной области техники.

**[00103]**

**[00104]** При использовании в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" означает любое инертное вещество, которое объединяют с активной молекулой, такой как лекарственное средство, средство или антитело, для получения приемлемой или удобной лекарственной формы. Фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой эксципиент, который нетоксичен или, по меньшей мере, обладает пониженной токсичностью для реципиентов при типичных дозировках и концентрациях и совместим с другими ингредиентами композиции, содержащей лекарственное средство, средство или связывающую молекулу.

**[00105]**

**[00106]** При использовании в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству связывающей молекулы настоящего изобретения, которое эффективно для предупреждения или лечения до или после воздействия MERS-CoV.

**[00107]**

**Полезные эффекты**

**[00108]** В соответствии с настоящим изобретением связывающая молекула обладает сильной способностью связываться с S-белком MERS-CoV и, таким образом, проявляет нейтрализующую активность и, следовательно, очень полезна в предупреждении, лечении или диагностике инфекции MERS-CoV.

**[00109]**

**Краткое описание чертежей**

**[00110]** Фиг. 1 показывает нейтрализующую активность в зависимости от концентрации антитела против корейского изолята MERS-CoV (MERS-CoV/Korea/KNIH/002\_05\_2015) по анализу бляшкообразования с двумя окончательно отобранными антителами;

**[00111]** фиг. 2 показывает титр вируса по анализу бляшкообразования после тканевого культивирования путем инфицирования человеческой легочной ткани корейским изолятом MERS-CoV и антителом для оценки нейтрализующей активности антитела с использованием модели инфицирования человеческой легочной ткани (ex vivo);

**[00112]** фиг. 3а показывает результаты количественной ПЦР для оценки эффективности лечения животного с использованием модели на животном, способной к инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь) и связывания антитела с вирусом;

**[00113]** фиг. 3б показывает результаты анализа бляшкообразования для оценки эффективности лечения животного с использованием модели на животном, способной к

инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь), и связывания антитела с вирусом;

**[00114]** фиг. 4а показывает результаты количественной ПЦР для оценки превентивной эффективности антитела против MERS-CoV с использованием модели на животном, способной к инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ );

**[00115]** фиг. 4б показывает результаты анализа бляшкообразования для оценки превентивной эффективности антитела против MERS-CoV с использованием модели на животном, способной к инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ );

**[00116]** фиг. 5 показывает гистологические изменения в легком мыши для оценки превентивной эффективности антитела против MERS-CoV с использованием модели на животном, способной к инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь);

**[00117]** фиг. 6а показывает уменьшение веса тела мыши для оценки терапевтической эффективности антитела против MERS-CoV с использованием модели на животном, способной к инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ );

**[00118]** фиг. 6б показывает выживаемость мышей для оценки терапевтической эффективности антитела против MERS-CoV с использованием модели на животном, способной к инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ );

**[00119]** фиг. 6с показывает результаты количественной ПЦР для оценки терапевтической эффективности антитела против MERS-CoV с использованием модели на животном, способной к инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ); и

**[00120]** фиг. 6д показывает результаты анализа бляшкообразования для оценки терапевтической эффективности антитела против MERS-CoV с использованием модели на животном, способной к инфицированию и пролиферации MERS-CoV (сверхэкспрессирующая рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышь) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

**[00121]**

#### **Способ осуществления изобретения**

**[00122]** Лучшее понимание настоящего изобретения может быть достигнуто с помощью следующих примеров, которые приведены для иллюстрации и не должны

рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Документы, процитированные в настоящем документе, включены в настоящую заявку посредством ссылки.

**[00123]**

**[00124]** Пример 1: Выделение PBMC из крови пациентов, выздоровевших после MERS-CoV

**[00125]** Донорами крови были те, у кого было подтверждено инфицирование MERS-CoV в 2015 г., и у кого больше не наблюдали вирусов в результате лечения, и процессы отбора доноров и забора крови проводили с одобрения Институционального наблюдательного совета (IRB). После отбора доноров было собрано приблизительно 30 мл цельной крови, и были выделены PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови) с использованием метода Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare). Выделенные PBMC дважды промывали фосфатным буферным раствором и затем хранили в резервуаре с жидким азотом в концентрации  $1 \times 10^7$  клеток на мл в замораживающей среде (RPMI:FBS:DMSO=5:4:1).

**[00126]**

**[00127]** Пример 2: Получение библиотеки фагового отображения антител

**[00128]** Общую РНК экстрагировали из PBMC, выделенных в примере 1, с использованием реагента TRIzol (Invitrogen), после чего синтезировали кДНК с использованием системы синтеза одноцепочечной кДНК SuperScript™ III (Invitrogen, США).

**[00129]**

**[00130]** Получение библиотеки антител из синтезированной кДНК осуществляли согласно соответствующей литературе (Barbas C. et. al. Phage Display: A Laboratory Manual. 2001. CSHL Press). Кратко говоря, переменные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела амплифицировали из синтезированной кДНК с помощью метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) с использованием высокоточной Taq-полимеразы (Roche) и набора дегенеративных праймеров (IDT). Выделенные фрагменты переменной области легкой цепи и тяжелой цепи превращали в ген scFv посредством метода ПЦР с перекрыванием, чтобы соединить их в одну последовательность в случайной комбинации с последующей амплификацией, расщеплением ферментом рестрикции и выделением scFv с использованием электрофореза в 1% агарозном геле и набора для экстракции из геля (Qiagen). Фаговый вектор расщепляли тем же ферментом рестрикции, выделяли, смешивали с геном scFv, добавляли ДНК-лигазу T4 (New England Biolabs) и затем давали прореагировать при 16°C в течение 12 часов или больше. Полученный реакционный раствор смешивали с компетентными клетками ER2738, а затем трансформировали с помощью способа электропорации. Трансформированные ER2738 подвергали культивированию при встряхивании, добавляли вспомогательный фаг VCSM13 (Agilent Technologies) и культивировали в течение 12 часов или более.

**[00131]**

**[00132]** Пример 3: Отбор с использованием фагового иммуноферментного анализа

**[00133]** Культуральный раствор фаговой библиотеки, полученный в примере 2, центрифугировали для удаления таким образом клеток-хозяев, добавляли 4% ПЭГ и 0,5 М NaCl, центрифугировали, чтобы осадить фаг, и удаляли супернатант. Осажденный фаг разводили 1% BSA/TBS для получения фаговой библиотеки, после чего независимо проводили пэннинг путем связывания и диссоциации с различными шиповидными белками (S-белками) MERS-CoV, таким образом выделяя scFv-фаг, имеющий способность связываться с S-белком MERS-CoV. Например, фаговую библиотеку добавляли в планшет для ELISA, к которому прикрепляли область RBD (остатки 367-588 гликопротеина S1), которая является частью S-белка MERS-CoV, с последующей реакцией при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционный раствор удаляли, после чего планшет для ELISA промывали ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20, и затем добавляли 60 мкл 0,1 М глицина-HCl (pH 2,2), так что scFv-фаг отсоединялся от антигена, и его нейтрализовывали с использованием 2М Tris (pH 9,1). Нейтрализованный таким образом scFv-фаг инфицировали ER2738, культивировали с вспомогательным фагом и использовали для последующего пэннинга. Часть инфицированных ER2738 распределяли на планшете LB перед добавлением вспомогательного фага, и на следующий день получали колонию.

**[00134]**

**[00135]** В общей сложности 1200 колоний, сформированных каждый раз, когда проводили пэннинг, добавляли к культуральной среде в 96-луночном планшете с глубокими лунками (Axygen), подвергали культивированию со встряхиванием, и добавляли вспомогательный фаг, когда OD<sub>600</sub> достигала 0,7 или более, с последующим культивированием со встряхиванием при 37°C в течение 12 часов или более. Культуральный раствор центрифугировали, чтобы удалить клетки-хозяева, и получали супернатант, содержащий scFv-фаг.

**[00136]**

**[00137]** Полученный таким образом супернатант с scFv-фагом разводили 1:1 6% БСА/ФСБ, помещали в каждую лунку 96-луночного планшета для микротитрования, в котором адсорбировали S-белки MERS-CoV, и затем блокировали и оставляли при 37°C на 2 часа. Каждую лунку трижды промывали ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20, добавляли антитело против M13, меченное HRP (пероксидаза хрена), и оставляли при 37°C на 1 час. Каждую лунку трижды промывали ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20, и затем добавляли ABTS (диаммониевая соль 2,2'-азинобис[3--этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты]), после чего измеряли поглощение на 405 нм, посредством чего было отобрано 444 scFv-фага, имеющие способность связываться с S-белками MERS-CoV.

**[00138]**

**[00139]** Пример 4: Оценка способности к связыванию фрагмента антитела (scFv-Fc)

**[00140]** Для 444 scFv-фагов, отобранных в примере 3, получали ДНК путем культивирования колоний со встряхиванием, после чего анализировали последовательности переменных областей антител. Из их числа 118 scFv-фагов,

отобранных путем исключения клонов с перекрывающимися аминокислотными последовательностями, клонировали в вектор, содержащий Fc-область, и переводили в форму фрагмента антитела (scFv-Fc) для оценки способности к экспрессии и нейтрализующей активности антител-кандидатов в линиях клеток животных. После трансфекции и экспрессии в клетках F2N (корейский патент № 10-1005967, патентообладатель Celltrion Inc.) с использованием реагента для трансфекции, использовали их культуральный раствор, и измеряли способность фрагмента антитела (scFv-Fc) связываться с тремя S-белками MERS-CoV с помощью ELISA. Кратко говоря, S-белки MERS-CoV прикрепляли к планшету для ELISA, и туда добавляли экспрессированные фрагменты антител. После отмывания несвязанного антитела с помощью ФСБ, содержащего 0,05% Tween 20, фрагменты антител, связанные с антигеном, отбирали с использованием антитела против человеческого Fc, связанного с HRP (пероксидаза хрена). Таким образом, было подтверждено, что 111 фрагментов антител специфически связан с S-белками MERS-CoV.

**[00141]**

**[00142]** Пример 5: Оценка нейтрализующей активности фрагмента антитела в отношении MERS-CoV (первая оценка нейтрализующей активности *in vitro*)

**[00143]** 1) **Измерение нейтрализующей активности в отношении саудовского изолята вируса**

**[00144]** Растворы культур 111 фрагментов антитела, экспрессированных с помощью способа примера 4, последовательно разбавляли в 2 раза, чтобы таким образом получить образцы с 12 концентрациями. Для саудовского изолята вируса (MERS/НСоV/KSA/EMC/2012) исходный вирусный раствор растворяли, разбавляли до концентрации 25 TCID<sub>50</sub> на лунку, смешивали с каждым из растворов культур фрагментов антител в 12 концентрациях, полученных выше, оставляли при 37°C на 2 часа, переносили в 96-луночный планшет, содержащий культивируемые клетки Vero, и оставляли при 37°C на 1 час, чтобы таким образом вызвать инфицирование. Смешанный раствор вируса и раствора культуры фрагмента антитела удаляли, помещали культуральную среду в каждую лунку, и проводили культивирование в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 3 дней, после чего наблюдали цитопатический эффект в каждой лунке с использованием микроскопа и рассчитывали нейтрализующую вирус активность (концентрация антитела в лунке, при которой наблюдается 50% нейтрализующая активность) (метод Reed и Muench). Количество используемого вируса на лунку (25 TCID<sub>50</sub> на лунку) определяли путем обратного расчета. Чем ниже концентрация антитела, демонстрирующая 50% нейтрализующий вирус эффект, тем лучше нейтрализующая активность.

**[00145]**

**[00146]** Как показано в таблице 3 ниже, было подтверждено, что 36 фрагментов антител обладали лучшей нейтрализующей активностью, чем антитела положительного контроля 1 и 2 (связывающиеся с S-белком MERS-CoV и обладающие известным нейтрализующим эффектом).

[00147]

[00148] [Таблица 3]

Классификация	Концентрация 50% нейтрализации вируса (мкг/мл)
Антитело 1	0,022
Антитело 2	<=0,01
Антитело 3	0,014
Антитело 4	0,010
Антитело 5	0,003
Антитело 6	0,021
Антитело 7	0,014
Антитело 8	0,056
Антитело 9	0,022
Антитело 10	0,061
Антитело 11	0,034
Антитело 12	0,051
Антитело 13	0,050
Антитело 14	0,011
Антитело 15	0,086
Антитело 16	0,016
Антитело 17	0,047
Антитело 18	0,011
Антитело 19	0,021
Антитело 20	0,023
Антитело 21	0,024
Антитело 22	0,053
Антитело 23	0,019
Антитело 24	0,067
Антитело 25	0,031
Антитело 26	0,011
Антитело 27	0,020
Антитело 28	0,035
Антитело 29	0,048
Антитело 30	0,007

Антитело 31	0,021
Антитело 32	0,060
Антитело 33	0,010
Антитело 34	0,061
Антитело 35	0,033
Антитело 36	0,031
Антитело положительного контроля 1	0,09
Антитело положительного контроля 2	1,69

**[00149] 2) Измерение нейтрализующей активности в отношении корейского изолята вируса**

**[00150]** 36 фрагментов антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении саудовского вируса, подтвержденной в 1) выше, подвергали PRNT (тест на нейтрализацию по уменьшению числа бляшек) с корейский изолятом вируса (MERS-CoV/Korea/KNH/002\_05\_2015).

**[00151]**

**[00152]** Для PRNT образец антитела разбавляли, смешивали с 100 PFU вируса в равных количествах, давали возможность прореагировать при 37°C в течение 1 часа, использовали для инфицирования клеточной линии и подвергали анализу бляшкообразования. После культивирования в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 3 дней, а затем окрашивания с использованием кристаллического фиолетового сравнительно анализировали количество образовавшихся бляшек и оценивали нейтрализующую активность образца антитела.

**[00153]**

**[00154]** На основании результатов сравнительного анализа было подтверждено, что выбранные фрагменты антител уменьшали образование бляшек по сравнению с двумя антителами положительного контроля, что указывает на то, что данные 36 фрагментов антител настоящего изобретения обладали лучшей нейтрализующей активностью, чем два антитела положительного контроля (результаты не показаны).

**[00155]**

**[00156]** Пример 6. Оценка уровня экспрессии антител и специфичности связывания антител после превращения в полностью человеческое антитело

**[00157]** Отобранные фрагменты антител превращали в полностью человеческие антитела с использованием их генетической информации, растворы культур антител получали с помощью способа примера 4, и сравнивали антигенсвязывающие сайты, уровни экспрессии антител и т.д. в полностью человеческих антителах. На основании совокупных результатов, включая вышеуказанные результаты оценки нейтрализующей вирус активности, было отобрано 18 полностью человеческих антител из 36.

**[00158]**

**[00159]**

**[00160]** Пример 7. Оценка нейтрализующей активности полностью человеческого антитела против MERS-CoV (вторая оценка нейтрализующей активности *in vitro*)

**[00161] 1) Оценка нейтрализующей активности в отношении саудовского изолята вируса**

**[00162]** 18 антител, отобранных в примере 6, превращали в полностью человеческие антитела, после чего их нейтрализующую вирус активность в отношении саудовского изолята вируса оценивали таким же образом, как в 1) примера 5. Как показано в таблице 4 ниже, было подтверждено, что 16 из 18 антител обладали лучшей нейтрализующей вирус активностью, чем антитело положительного контроля 1 (связывающееся с S-белком MERS-CoV и обладающее известным нейтрализующим эффектом).

**[00163]**

**[00164]** [Таблица 4]

Классификация	Концентрация 50% нейтрализации вируса (мкг/мл) (обратное титрование вируса 36,1 TCID <sub>50</sub> на лунку)	Концентрация 50% нейтрализации вируса (мкг/мл) (обратное титрование вируса 114,8 TCID <sub>50</sub> на лунку)
Антитело 1	0,08	0,16
Антитело 2	0,07	0,07
Антитело 3	0,07	0,38
Антитело 4	0,08	0,12
Антитело 5	0,02	0,04
Антитело 6	0,42	н.о.
Антитело 7	0,06	0,13
Антитело 9	0,08	0,18
Антитело 14	0,15	0,25
Антитело 18	0,19	0,20
Антитело 21	0,11	0,16
Антитело 26	0,08	0,11
Антитело 27	0,24	0,31
Антитело 29	0,39	0,78
Антитело 33	2,43	н.о.
Антитело 34	0,38	н.о.
Антитело 35	0,11	0,20
Антитело 36	н.о.	н.о.

Антитело положительного контроля 1	1,75	2,94
--	------	------

**[00165] 2) Оценка нейтрализующей активности полностью человеческого антитела в отношении корейского изолята вируса**

**[00166]** 18 антител, отобранных в примере 6, превращали в полностью человеческие антитела, после чего их нейтрализующую вирус активность в отношении корейского изолята вируса оценивали таким же образом, как в 2) примера 5.

**[00167]** На основании результатов PRNT, как показано в таблице 5 ниже, в отношении 18 антител при первой оценке (7 антител) и при второй оценке (11 антител) было подтверждено, что все 18 антител имели низкие численные значения и, следовательно, более высокую нейтрализующую вирус активность по сравнению с антителами положительного контроля 1 и 2 (связывающимися с S-белком MERS-CoV и обладающими известным нейтрализующим эффектом).

**[00168]**

**[00169]** [Таблица 5]

Классификация	I <sub>c50</sub> (мкг/мл)
Первый эксперимент	
Антитело положительного контроля 1	0,03875
Антитело положительного контроля 2	0,1215
Антитело 1	0,0004
Антитело 2	0,0009
Антитело 7	0,00065
Антитело 9	0,0011
Антитело 14	0,0015
Антитело 18	0,0076
Антитело 21	0,00095
Второй эксперимент	
Антитело положительного контроля 1	0,1038
Антитело положительного контроля 2	0,5195
Антитело 3	0,0032
Антитело 4	0,00165
Антитело 5	0,00025
Антитело 6	0,0008
Антитело 26	0,0039
Антитело 27	0,0018

Антитело 29	0,00375
Антитело 33	0,0232
Антитело 34	0,0006
Антитело 35	0,00275
Антитело 36	0,03325

**[00170]****[00171]** Пример 8. Отбор клона для создания клеточной линии

**[00172]** Для отбора антитела для создания клеточной линии в дополнение к оценке нейтрализующей активности проводили также оценку свойств. Оценка свойств была выполнена для сайта-мишени антитела, уровня экспрессии антитела и теплостойкости. Для оценки теплостойкости, кратко говоря, антитело и Sypro Orange (Thermo Fisher Scientific) разводили до соответствующих концентраций и смешивали, после чего полученный образец помещали в 96-луночный планшет для ПЦР и измеряли значение флуоресценции путем формирования кривой плавления от 25°C до 99°C с использованием 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). На основании совокупных результатов вышеуказанной оценки нейтрализующей активности и оценки свойств, показанной в таблице 6 ниже, 6 антител, указанных в таблице 5, были отобраны и клонированы в вектор, подходящий для создания клеточной линии.

**[00173]****[00174]** [Таблица 6]

Классификация	Сайт-мишень антитела	Уровень экспрессии антитела (мкг/мл)	Теплостойкость (°C)
Антитело 1	MERS-RBD	3,142	53
Антитело 2	MERS-RBD	6,16	59
Антитело 3	MERS-RBD	4,296	57
Антитело 4	MERS-RBD	3,687	55
Антитело 5	MERS-RBD	3,558	57
Антитело 6	MERS-другой	4,014	57
Антитело 7	MERS-RBD	2,556	н.д.
Антитело 9	MERS-RBD	2,088	н.д.
Антитело 14	MERS-RBD	5,611	н.д.
Антитело 18	MERS-RBD	3,6	55
Антитело 21	MERS-RBD	2,494	55
Антитело 26	MERS-RBD	3,753	53
Антитело 27	MERS-RBD	6,894	57
Антитело 29	MERS-RBD	3,897	н.д.

Антитело 33	MERS-S2	6,894	н.д.
Антитело 34	MERS-другой	3,897	53
Антитело 35	MERS-RBD	4,014	н.д.
Антитело 36	MERS-S2	3,558	51

**[00175]**

**[00176]** Пример 9. Оценка нейтрализующей активности в отношении саудовского и иорданского вируса (третья оценка нейтрализующей активности *in vitro*)

**[00177]** Для 6 антител, отобранных в примере 8, их нейтрализующую активность в отношении саудовского изолята вируса и иорданского изолята вируса (MERS-HCoV/Jordan/01) оценивали таким же образом, как в 1) примера 5. Как показано в таблице 7 ниже, их нейтрализующая вирус активность оказалась выше, чем у четырех антител положительного контроля (связывающихся с S-белком MERS-CoV и обладающих известным нейтрализующим эффектом).

**[00178]****[00179]** [Таблица 7]

Классификация	Нейтрализующая активность в отношении саудовского вируса (MERS-CoV_KSA/EMC/2012) IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	Нейтрализующая активность в отношении иорданского вируса (MERS-HCoV/Jordan/01) IC <sub>50</sub> (мкг/мл)
Антитело 1	0,44	0,11
Антитело 2	0,09	0,06
Антитело 3	0,13	0,11
Антитело 4	0,06	0,05
Антитело 5	0,06	0,09
Антитело 6	1,11	1,54
Антитело положительного контроля 1	0,76	0,43
Антитело положительного контроля 2	н.о.	н.о.
Антитело положительного контроля 3	0,26	0,13
Антитело положительного	0,22	0,26

контроля 4		
------------	--	--

**[00180]**

**[00181]** Пример 10. Оценка нейтрализующей активности в отношении корейского изолята вируса (третья оценка нейтрализующей активности *in vitro*)

**[00182]** Для двух антител, отобранных в примере 9, анализ бляшкообразования осуществляли таким же образом, как в 2) примера 5, и оценивали нейтрализующую активность антител при различных концентрациях в отношении корейского изолята MERS-CoV (MERS-CoV/Korea/KNIH/002\_05\_2015). Таким образом, было подтверждено, что данные два антитела обладали лучшей нейтрализующей вирус активностью по сравнению с антителом положительного контроля 4 (связывающимся с S-белком MERS-CoV и обладающим известным нейтрализующим эффектом) (фиг. 1).

**[00183]**

**[00184]** Пример 11. Оценка нейтрализующей вирус активности (*ex vivo*)

**[00185]** Нейтрализующую активность антитела для создания клеточной линии оценивали с использованием модели инфицирования человеческой легочной ткани (*ex vivo*) (Таблица 8). Кратко говоря, получали корейский изолят MERS-CoV (MERS-CoV/Korea/KNIH/002\_05\_2015) и образец антитела для оценки на основании значений IC<sub>50</sub> и давали им прореагировать в течение 1 часа, после чего человеческую легочную ткань инфицировали продуктом реакции вируса и антитела и проводили культивирование ткани. Затем проводили культивирование в течение 3 дней, во время которого культуральный супернатант собирали с интервалами 24 часа, и титр вируса измеряли с помощью анализа бляшкообразования. После того, как 100 нг каждого из двух антител, имеющих эффективность, подтвержденную в примере 10, реагировали с MERS-CoV, а затем ими инфицировали человеческую легочную ткань, как показано в таблице 8 ниже, было подтверждено, что рост MERS-CoV в супернатанте через 24, 48 и 72 часа был ингибирован по сравнению с антителами отрицательного и положительного контроля, не обработанными антителами (фиг. 2).

**[00186]**

**[00187]** [Таблица 8]

Классификация	Вес легкого (мг)	Содержание вируса (log <sub>10</sub> PFU/мл/нг)		
		24 часа после инфицирования	48 часов после инфицирования	72 часа после инфицирования
Антитело 3 (100 нг)	4,1	0	0	0
Антитело 5 (100 нг)	5,4	0	0	0
Антитело положительного контроля 4 (100 нг)	3,9	2,1	3,1	3,2
Антитело отрицательного контроля (100 нг)	4,2	3,4	3,9	3,5

[00188]

[00189] Пример 12. Оценка свойств антител и характеристик связывания

[00190] На основании результатов измерения свойств антител, таких как нейтрализующая вирус активность и т.д., было отобрано два итоговых антитела для создания клеточной линии, и их свойства подвергли оценке. В качестве элементов оценки измеряли оценку образования агрегатов, анализ последовательности, анализ поддержания дисульфидной связи, оценку расщепления сигнального пептида и нормальное связывание тяжелой цепи и легкой цепи. Как показано в таблице 9 ниже, в свойствах антител не было каких-то особенностей.

[00191]

[00192] [Таблица 9]

Способ оценки	Связывание ELISA	Оценка DSF	ЭВЭЖХ			Пептидное картирование ЖХ-МС			ДСН-КЭ	
			Начало (°C)	Главный пик (%)	HM W (%)	LM W (%)	Расщепление (%)	Образование связи	Расщепление (%)	Интактный IgG (%)
Антитело 3	MERS-RBD	57	97,5	2,5	0	100	Нормально	H(99,6),L(100)	80,31	19,69
Антитело 5	MERS-RBD	57	99,61	0,39	0	100	Нормально	H(99,98),L(99,96)	81,86	18,14

[00193]

[00194] Также оценивали антигенсвязывающую способность в отношении поверхностного белка MERS-CoV (RBD) (SPR, поверхностный плазмонный резонанс). Как показано в таблице 10 ниже, нейтрализующая активность антитела и свойства антитела были всесторонне рассмотрены, и характеристики связывания двух окончательно отобранных антител были оценены по сравнению с антителом положительного контроля 4. Было подтверждено, что антитело 5 обладало лучшими характеристиками связывания по сравнению с антителом положительного контроля 4.

[00195]

[00196] [Таблица 10]

Образец	ka1 (1/мс)	kd1 (1/с)	ka2 (1/с)	kd2 (1/с)	Rmax (OE)	$\chi^2$ (OE <sup>2</sup> )	KD (M)	Среднее	CO	CV (%)	Отн. (%)
Антитело 3	1,137E+06	1,379E-03	8,156E-03	4,380E-03	77,63	1,310	1,21E-09	1,03E-09	2,55E-10	24,7	78

	1,277E+0 6	1,089E- 03	7,265E- 03	4,515E- 03	71,71	0,751	8,53E- 10				
Антитело 5	2,115E+0 6	2,830E- 04	2,837E- 02	2,329E- 03	87,69	0,539	1,34E- 10	1,36E- 10	2,90E- 12	2,1	589
	2,060E+0 6	2,841E- 04	2,420E- 02	2,142E- 03	86,82	0,463	1,38E- 10				
Антитело положительного контроля 4	1,674E+0 5	1,343E- 04	9,841E- 03	8,071E- 03	75,88	0,041	8,02E- 10	8,01E- 10	1,77E- 12	0,2	100
	1,723E+0 5	1,378E- 04	1,241E- 02	1,082E- 02	74,87	0,031	8,00E- 10				

**[00197]**

**[00198]** Пример 13. Оценка нейтрализующей вирус активности (in vivo)

**[00199]** Нейтрализующую активность двух антител для создания клеточной линии против MERS-CoV оценивали с использованием модели на животном. Конкретнее, антитело вводили сверхэкспрессирующим рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышам (мыши TG), необходимым для инфицирования человеческого организма вирусом, проводили инфицирование корейским изолятом MERS-CoV (MERS-CoV/Korea/KNIH/002\_05\_2015) и, таким образом, оценивали превентивную и терапевтическую эффективность двух окончательно отобранных антител.

**[00200]** Конкретнее, условия инфицирования MERS-CoV мышей hDPP4 TG и эффект антитела положительного контроля 4 определяли с использованием антител 3 и 5 и антитела отрицательного контроля (фиг. 3). Для этого животных инфицировали вирусом и на следующий день им внутрибрюшинно вводили каждое антитело в соответствующей дозе. Через определенное количество дней после инфицирования извлекали легочную ткань мышей и определяли количество вируса с помощью количественной ПЦР (фиг. 3а) и анализа бляшкообразования (фиг. 3б). Предварительно было подтверждено, что эксперимент по инфицированию животных проходил должным образом, а также что антитело 3 и антитело 5 были способны проявлять лучшую или такую же терапевтическую эффективность, как антитело положительного контроля 4.

**[00201]**

**[00202]** Для оценки превентивной эффективности каждое из антитела 5, антитела положительного контроля 4 и антитела отрицательного контроля внутрибрюшинно инъецировали сверхэкспрессирующим рецептор hDPP4 (дипептидилпептидаза-4 человека) мышам (мыши hDPP4 TG), необходимым для инфицирования человеческого организма MERS-CoV, и на следующий день проводили инфицирование корейским изолятом MERS-CoV (MERS-CoV/Korea/KNIH/002\_05\_2015). Через определенное количество дней после инфицирования извлекали легочную ткань мышей и определяли количество вируса (фиг.

4). На основании результатов количественного определения MERS-CoV посредством количественной ПЦР (фиг. 4а) и анализа бляшкообразования (фиг. 4б) было подтверждено, что антитело 5 обладает лучшей превентивной эффективностью по сравнению с антителом положительного контроля 4.

**[00203]**

**[00204]** Кроме того, легкие мыши извлекали на 7 день инфицирования, после чего непосредственно наблюдали изменения в ткани посредством окрашивания ГЭ (фиг. 5). Таким образом, в группе, получавшей антитело отрицательного контроля, диафрагма дыхательных путей была утолщена и появилось много воспалительных клеток, что указывает на серьезные гистопатологические изменения (а и d на фиг. 5). Хотя группа, получавшая антитело положительного контроля, не подверглась такому сильному воздействию, как группа, получавшая антитело отрицательного контроля, было подтверждено появление воспалительных клеток и утолщенной диафрагмы дыхательных путей (b и e на фиг. 5). Напротив, в группе, получавшей антитело 5, было подтверждено меньшее количество гистопатологических изменений по сравнению с другими группами (c и f на фиг. 5).

**[00205]**

**[00206]** Кроме того, для оценки терапевтической эффективности животных инфицировали вышеуказанным вирусом и на следующий день им внутрибрюшинно инъецировали каждое из антитела 5, антитела положительного контроля 4 и антитела отрицательного контроля. Через определенное количество дней после инфицирования наблюдали за уменьшением веса тела мышей и выживаемостью мышей, а также извлекали легочную ткань мышей и, таким образом, определяли количество вируса (фиг. 6). Исходя из результатов оценки уменьшения веса тела мышей (фиг. 6а) и выживаемости мышей (фиг. 6б), потеря веса и смертность наблюдались только при самой низкой дозе (2 мкг) антитела отрицательного контроля и антитела 5. Кроме того, на основании результатов количественного определения MERS-CoV посредством количественной ПЦР (фиг. 6с) и анализа бляшкообразования (фиг. 6d) было подтверждено, что антитело 5 обладает лучшей или такой же терапевтической эффективностью, как антитело положительного контроля 4.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Нейтрализующая связывающая молекула, которая связывается с шиповидным белком (S-белком) на поверхности коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV).

2. Связывающая молекула по п. 1, причем данная связывающая молекула представляет собой любую молекулу, выбранную из группы, состоящей из связывающих молекул с i) по vi) ниже:

i) связывающая молекула, содержащая а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 1, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 2 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 3, и б) вариабельную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 4, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 5 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 6;

ii) связывающая молекула, содержащая а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 7, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 8 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 9, и б) вариабельную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 10, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 11 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 12;

iii) связывающая молекула, содержащая а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 13, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 14 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 15, и б) вариабельную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 16, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 17 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 18;

iv) связывающая молекула, содержащая а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 19, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 20 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 21, и б) вариабельную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 22, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 23 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 24;

v) связывающая молекула, содержащая а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 25, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 26 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 27, и б) вариабельную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 28, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 29 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 30; и

vi) связывающая молекула, содержащая а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 31, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 32 и область CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 33, и б) вариабельную область легкой цепи, содержащую область CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 34, область CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 35 и область CDR3 в соответствии с



4. Связывающая молекула по любому из п.п. 1-3, причем данная связывающая молекула представляет собой Fab-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело, химерное антитело, гуманизированное антитело или человеческое антитело.

5. Иммуноконъюгат, в котором по меньшей мере одна метка дополнительно связана со связывающей молекулой по любому из п.п. 1-3.

6. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающую молекулу по любому из п.п. 1-3.

7. Вектор экспрессии, в который вставлена молекула нуклеиновой кислоты по п. 6.

8. Клеточная линия, в который вектор экспрессии по п. 7 подвергается трансформации в клетку-хозяина с получением связывающей молекулы, которая связывается с MERS-CoV и, следовательно, обладает нейтрализующей активностью.

9. Клеточная линия по п. 8, причем клетка-хозяин представляет собой любую клетку, выбранную из группы, состоящей из клетки CHO, клетки F2N, клетки COS, клетки ВНК, клетки меланомы Боуэса, клетки HeLa, клетки 911, клетки HT1080, клетки A549, клетки HEK 293 и клетки HEK293T.

10. Композиция для предотвращения или лечения инфекции MERS-CoV, содержащая связывающую молекулу по любому из п.п. 1-3.

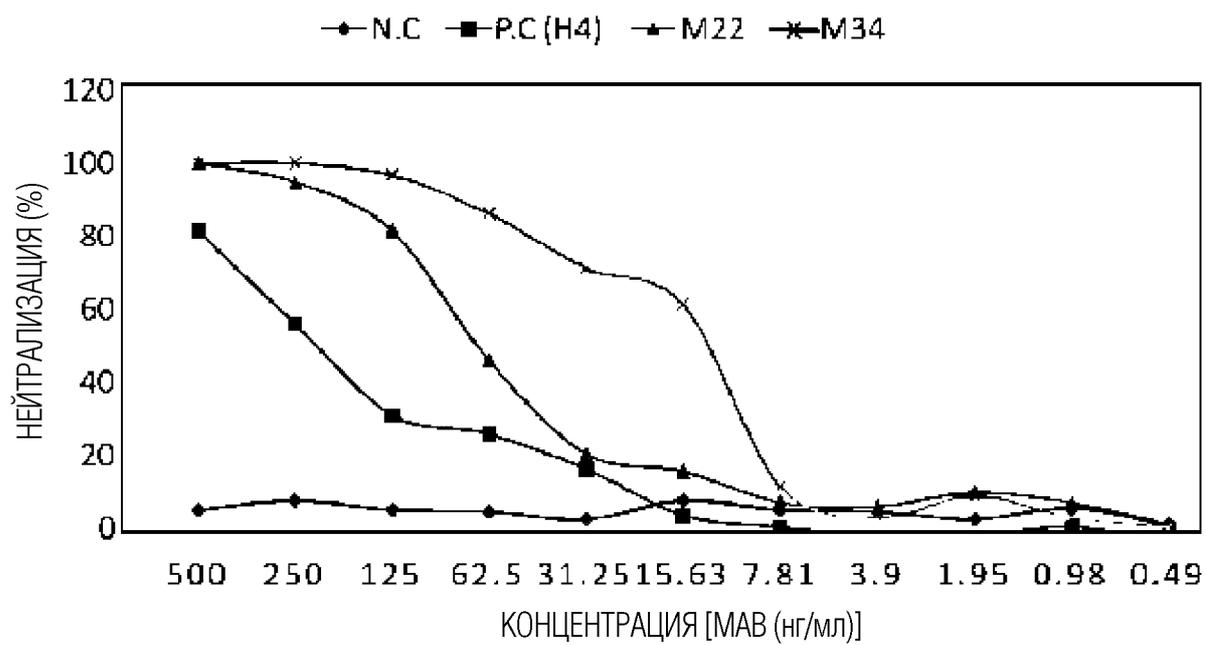
11. Композиция по п. 10, причем данная композиция представляет собой стерильный раствор для инъекций, лиофилизированную композицию, раствор в предварительно заполненном шприце, композицию для перорального применения, композицию для наружного применения, или суппозиторий.

12. Способ диагностики, предотвращения или лечения заболевания, вызванного инфицированием MERS-CoV, содержащий введение субъекту, имеющему заболевание, вызванное инфицированием MERS-CoV, композиции по п. 10 или 11 в терапевтически эффективном количестве.

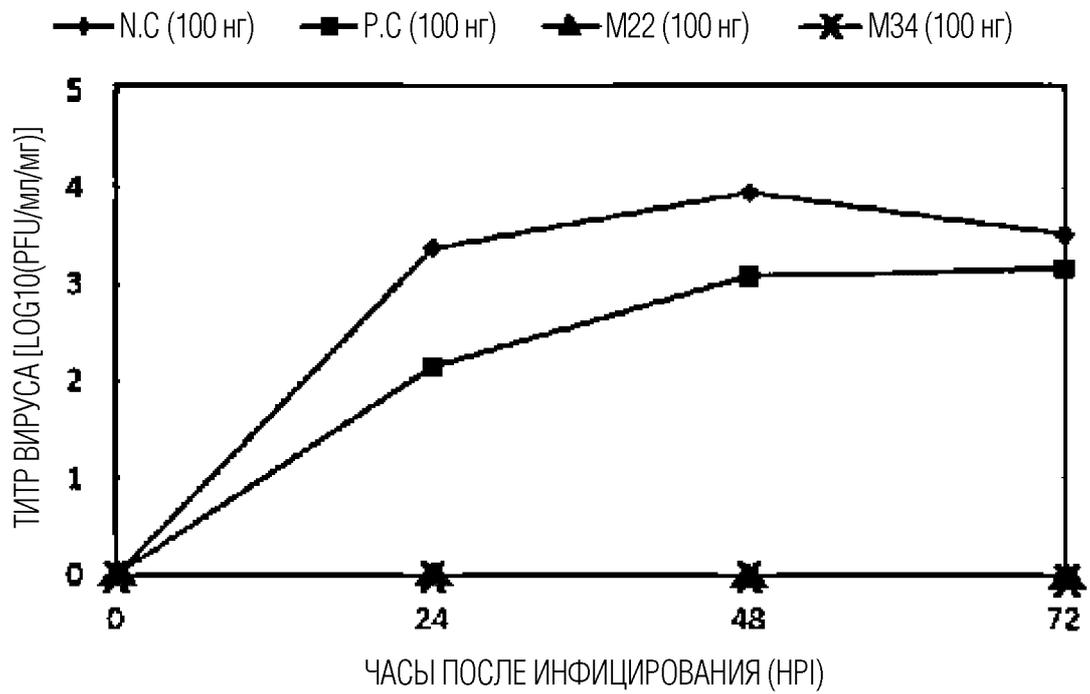
13. Набор для диагностики MERS-CoV, содержащий связывающую молекулу по любому из п.п. 1-3.

По доверенности

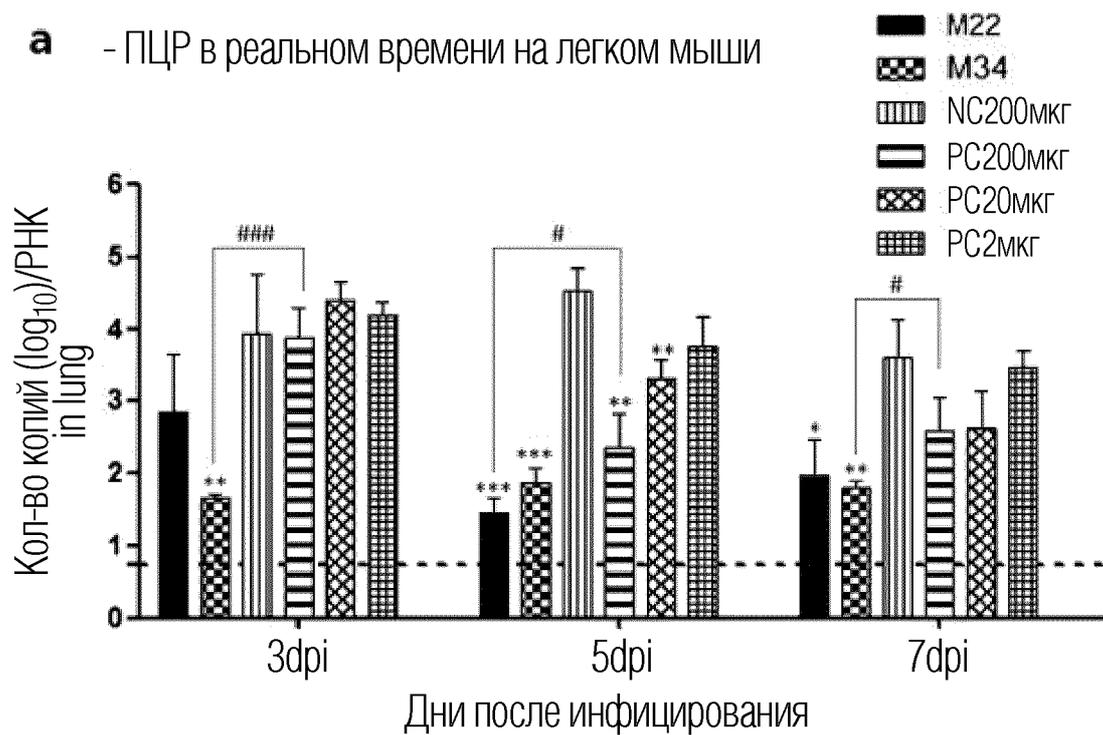
ФИГ. 1



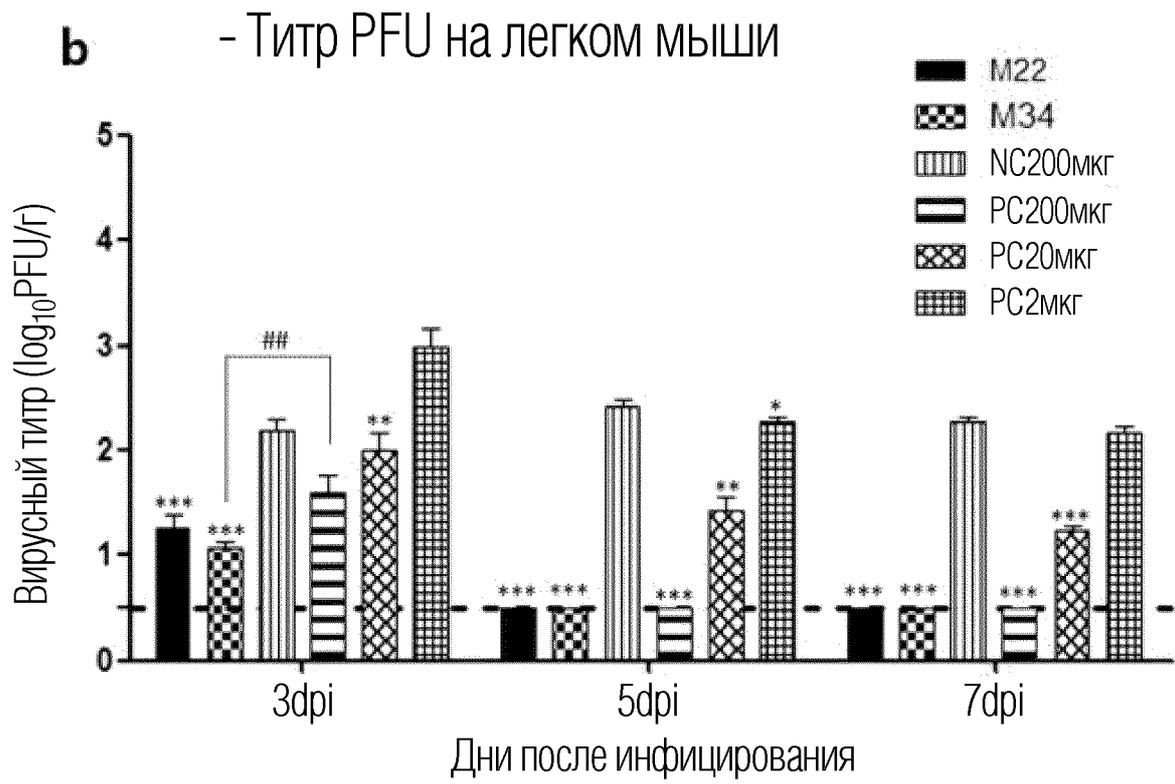
ФИГ. 2



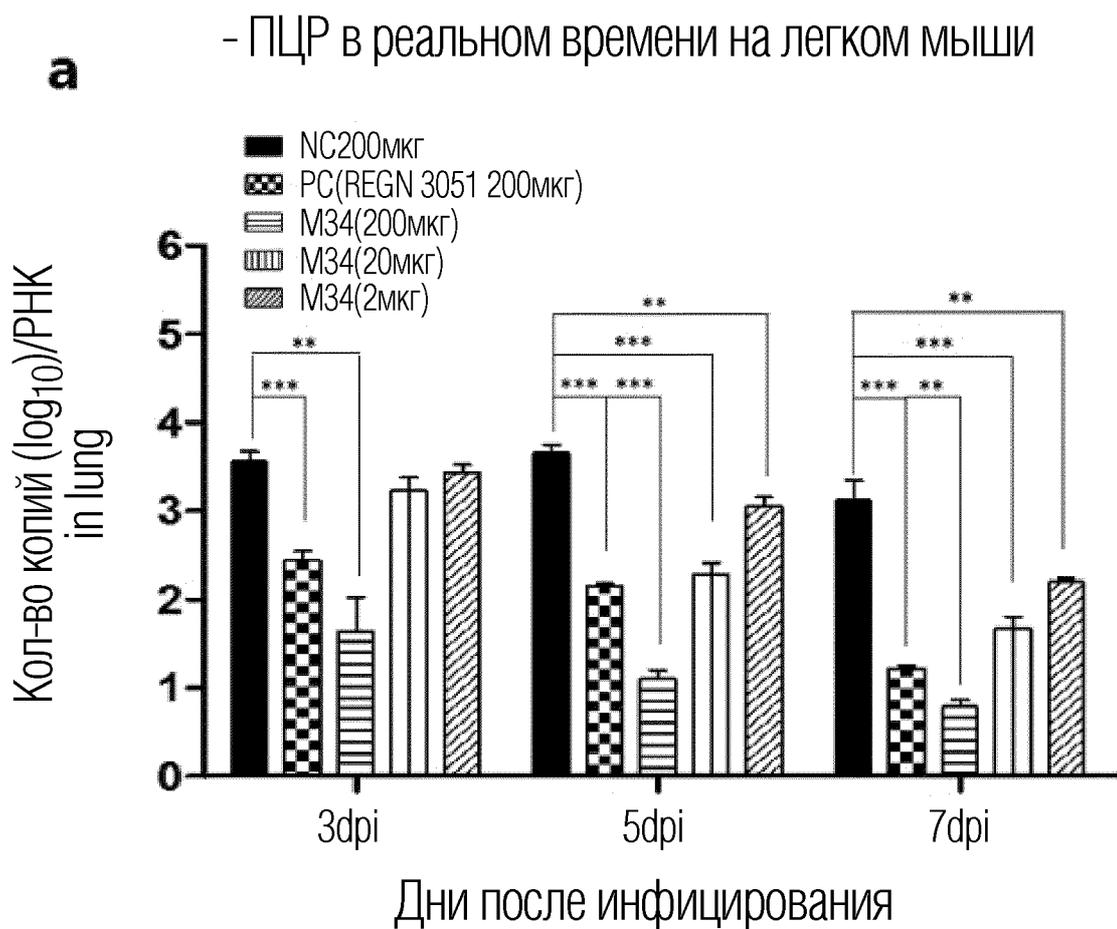
## ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

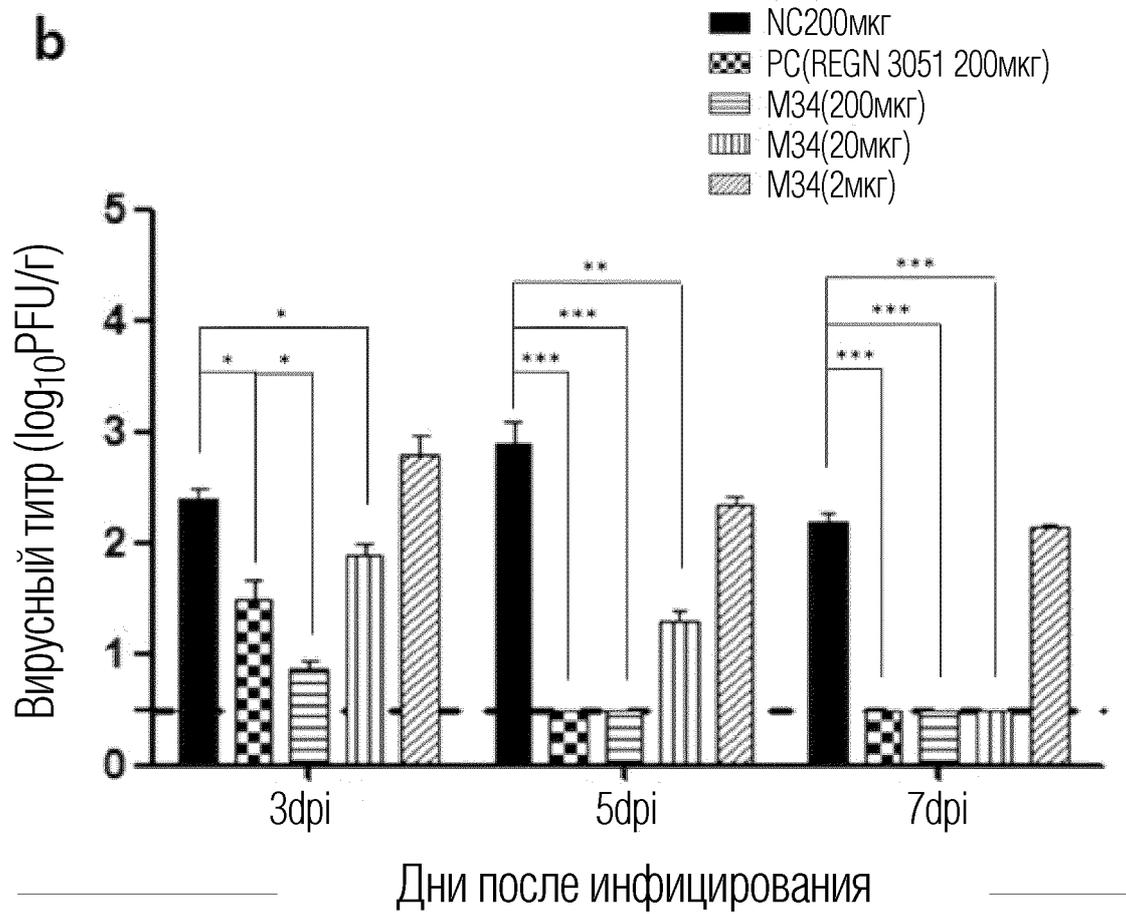


ФИГ. 4А

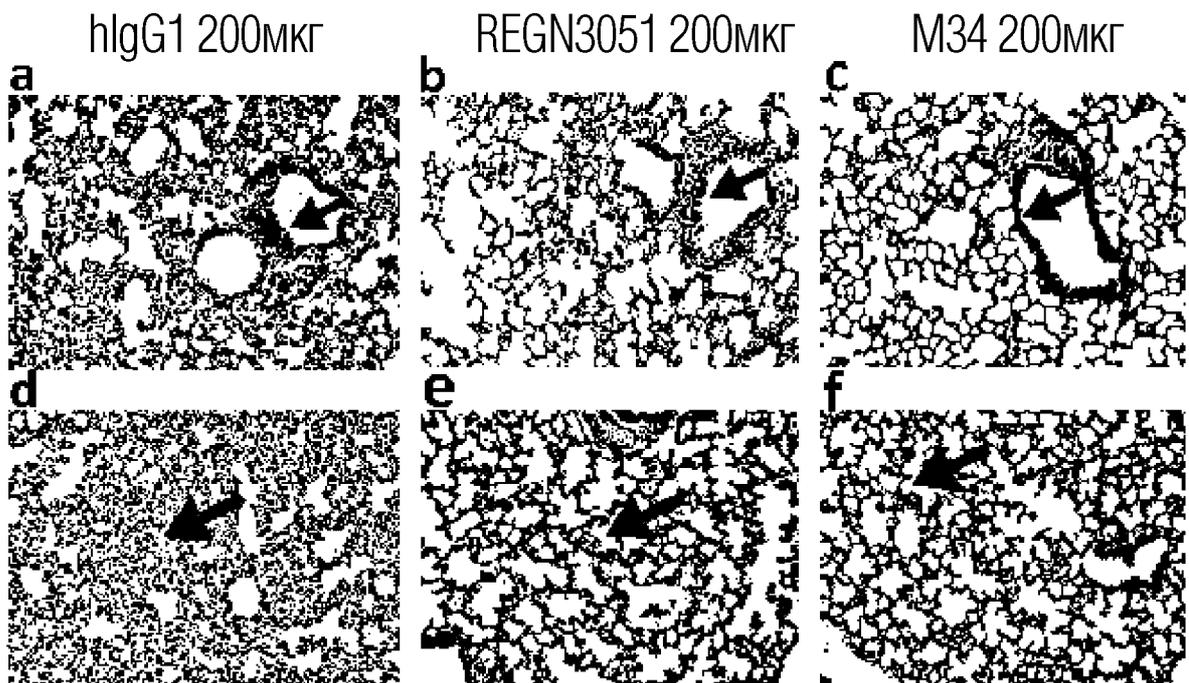


ФИГ. 4В

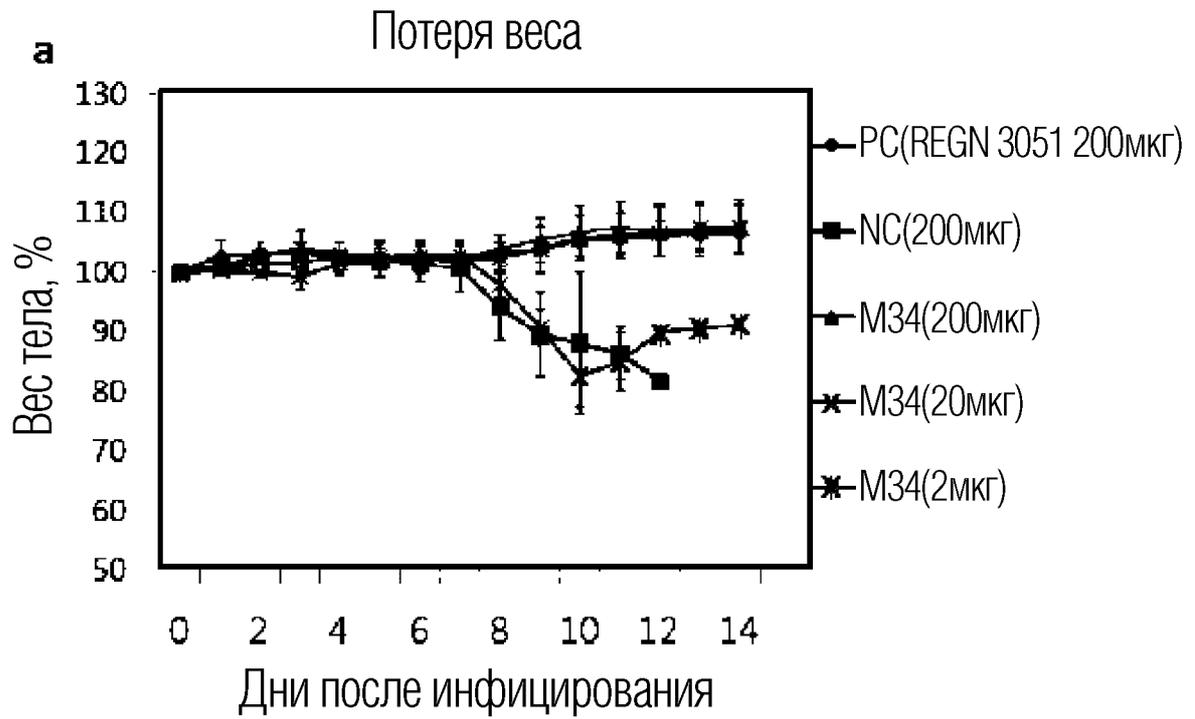
- Титр PFU на легком мыши



ФИГ. 5



ФИГ. 6А

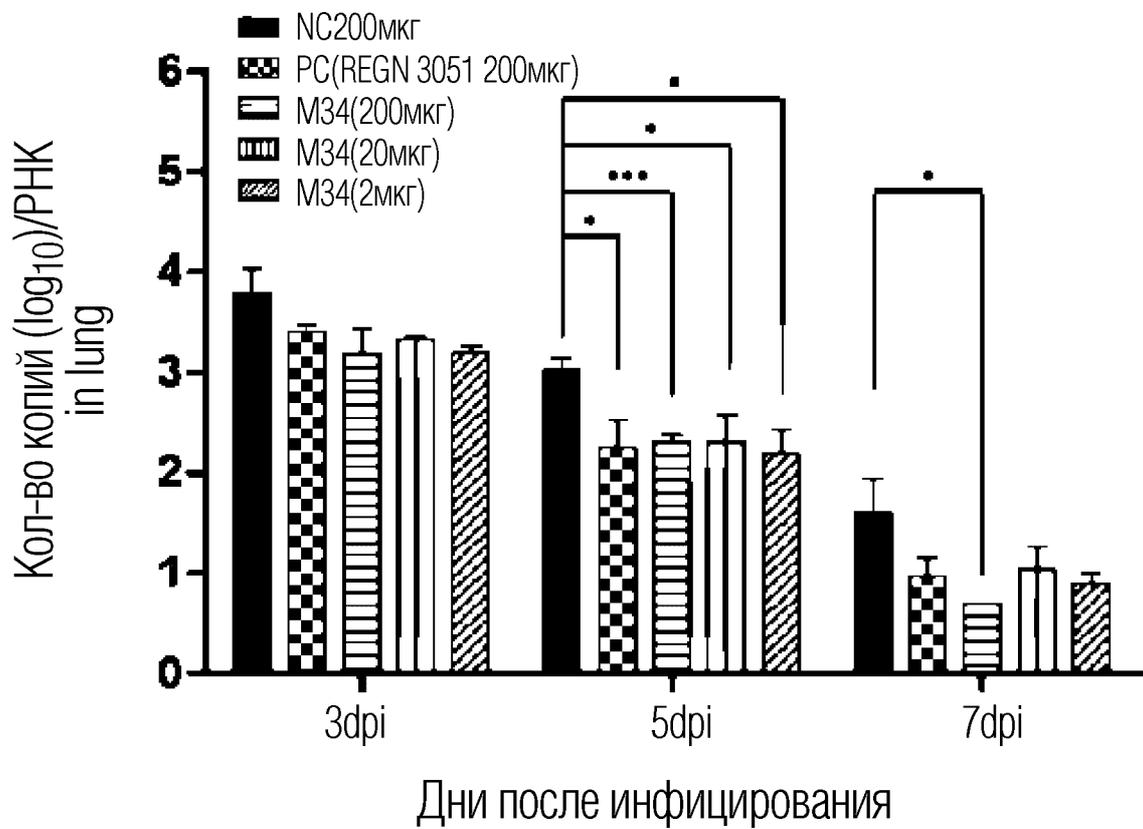


ФИГ. 6В



## ФИГ. 6С

с - ПЦР в реальном времени на легком мыши



ФИГ. 6D

