

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292620 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.05(51) Int. Cl. A61P 31/14 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.03.16

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ 2 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/989,976; 63/022,151; 63/042,907;
63/089,895

(72) Изобретатель:

Проко Эрик, Малик Асрар, Рехман
Джалес, Чжан Лянхуэй, Сюн Шицинь
(US)

(32) 2020.03.16; 2020.05.08; 2020.06.23;
2020.10.09

(33) US

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

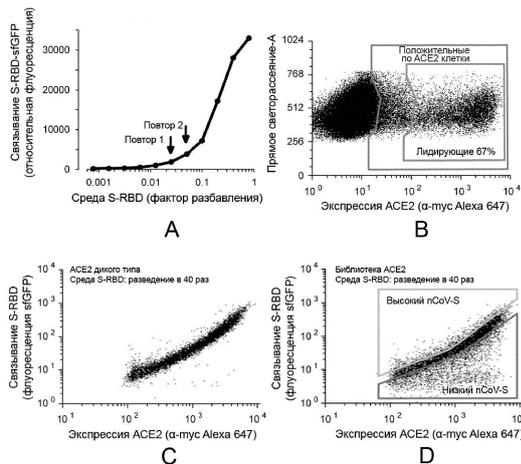
(86) PCT/US2021/022611

(87) WO 2021/188576 2021.09.23

(71) Заявитель:

ТЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ТИ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЛЛИНОЙС
(US)

(57) Описаны модифицированные полипептиды ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). Модифицированные полипептиды включают по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая позволяет полипептиду лучше связываться с поверхностным гликопротеином S коронавируса, которые используют ACE2 в качестве рецептора входа в клетку, либо за счет прямого увеличения аффинности, либо за счет улучшенного фолдинга и экспрессии ACE2. Также описано использование модифицированных полипептидов ACE2 для ингибирования проникновения, репликации и/или распространения CoV, для доконтактной и постконтактной профилактики CoV, а также для лечения инфекции CoV (например, COVID-19).



A1

202292620

202292620

A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ 2 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет для предварительной заявки США № 63/089,895, поданной 9 октября 2020, предварительной заявки США № 63/042,907, поданной 23 июня 2020, предварительной заявки США № 63/022,151, поданной 8 мая 2020, и предварительной заявки США № 62/989,976, поданной 16 марта 2020, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается модифицированных белков ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) с усиленным фолдингом и повышенным связыванием с SARS-CoV-2 и другими коронавирусами, которые используют ACE2 в качестве рецептора входа в клетку.

Признание государственной поддержки

Настоящее изобретение было сделано при государственной поддержке в рамках гранта № 5R01AI129719-03, выданного Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Предшествующий уровень техники

В декабре 2019 года новый зоонозный бета-коронавирус, тесно связанный с коронавирусами летучих мышей, попал к людям на рынке морепродуктов Хуанань в китайском городе Ухань (Zhu et al., *N Engl J Med.* 2020 Feb 20;382(8):727–733; Zhou et al., *Nature.* 2020 Feb 3;579(7798):270–273). Вирус, названный SARS-CoV-2 из-за его сходства с коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), ответственным за меньшую вспышку почти два десятилетия назад (Peiris et al., *Lancet.* 2003 Apr 19;361(9366):1319–1325; Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, *Nat Microbiol.* 2020 Mar 2;4(5):3), с тех пор быстро распространился от человека к человеку по всему миру, вызвав чрезвычайные меры сдерживания со стороны правительств (Patel et al., *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020 Feb 7;69(5):140–146). Фондовые рынки упали, введены ограничения на поездки, отменены массовые собрания, большое количество людей помещено в карантин. Эти события не похожи ни на что, ранее пережитое поколениями людей. Проявления коронавирусной болезни 2019 (COVID-19) варьируют от легких симптомов до сухого кашля, лихорадки, пневмонии и смерти, и SARS-CoV-2 губителен для пожилых людей и других уязвимых групп (Wang et al., *J Med Virol.* 2020 Apr; 92(4):441–447; Huang et al., *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):497–

506). В настоящее время не существует вакцины для предотвращения заражения SARS-CoV-2 и одобренных лекарств для лечения инфекции, вызванной этим вирусом. Таким образом, имеется потребность в разработке эффективных способов лечения инфекции SARS-CoV-2.

Изложение сущности изобретения

В настоящей заявке описаны полипептиды ACE2 человека, которые демонстрируют усиленное связывание с белком S SARS-CoV-2 за счет усиленного фолдинга и структурной стабилизации ACE2, устранения модификации гликана, или за счет повышенной аффинности. Модифицированные полипептиды можно использовать в качестве диагностических или терапевтических средств для выявления, профилактики (до- и постконтактной профилактики) или лечения COVID-19 или заболевания, вызванного любым коронавирусом, который использует ACE2 в качестве клеточного рецептора.

В настоящей заявке предусмотрены модифицированные полипептиды ACE2, которые включают ACE2 или его фрагмент, такой как внеклеточный фрагмент. Полипептиды включают по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с ACE2 дикого типа и обладают повышенной способностью связывать коронавирусный белок S либо напрямую из-за изменения аффинности, либо опосредованно (например, за счет стабилизации S-распознаваемой структуры). В конкретных примерах ACE2 представляет собой ACE2 человека. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена выбрана из любой из замен, показанных в таблице 1, таблице 2 и/или таблице 3. В некоторых примерах по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой остаток, расположенный на границе раздела ACE2 и S. В некоторых примерах по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой остаток, расположенный в мотиве гликозилирования N90. В некоторых примерах по меньшей мере одна аминокислотная замена удалена от границы раздела и усиливает презентацию S-распознаваемой складчатой структуры. В некоторых примерах модифицированные полипептиды ACE2 являются димерными. В одном примере димерный ACE2 содержит аминокислотные замены T27Y, L79T и N330Y.

Также в настоящей заявке обеспечены гибридные белки, которые включают модифицированный полипептид ACE2, описанный в настоящей заявке, и гетерологичный полипептид. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид представляет собой белок Fc или сывороточный альбумин человека, например, для рекрутирования эффекторных функций и/или повышения стабильности в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид представляет собой

белок, который можно использовать в качестве реагента для диагностики/детекции, такой как флуоресцентный белок (например, GFP (зеленый флуоресцентный белок)) или фермент (например, пероксидаза хрена (HRP) или щелочная фосфатаза).

Кроме того, предложен способ ингибирования проникновения коронавируса в клетки путем контакта вируса с модифицированным полипептидом ACE2 или гибридным белком, описанным в настоящей заявке. Также предложены способы ингибирования репликации и/или распространения коронавируса у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида ACE2 или гибридного белка, описанного в настоящей заявке. Модифицированный полипептид ACE2 можно применять до инфицирования (например, у субъекта, подверженного риску заражения) в качестве доконтактного профилактического лечения, вскоре после инфицирования в качестве постконтактной профилактики, или после проявления у субъекта одного или нескольких признаков или симптомов инфекции.

Также обеспечен способ лечения коронавирусной инфекции (например, COVID-19) у субъекта путем применения у субъекта терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида ACE2 или гибридного белка, раскрытого в настоящей заявке. Коронавирус может быть любым человеческим или зоонозным коронавирусом, включая новые штаммы коронавируса, которые используют ACE2 в качестве рецептора входа в клетку. В некоторых примерах модифицированный полипептид ACE2 вводят внутривенно, интратрахеально или путем ингаляции. Способ лечения может представлять собой способ доконтактного профилактического лечения, способ постконтактного профилактического лечения, или способ лечения COVID-19.

Также обеспечены молекулы нуклеиновой кислоты и векторы, которые кодируют модифицированный полипептид ACE2 или гибридный белок, описанный в настоящей заявке. Кроме того, предлагаются способы ингибирования репликации и/или распространения CoV (или лечения инфекции CoV) у субъекта путем введения молекулы нуклеиновой кислоты или вектора. В некоторых примерах молекулу нуклеиновой кислоты или вектор вводят внутривенно, интратрахеально или путем ингаляции.

Далее представлены способы детекции CoV в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение контакта биологического образца с модифицированным полипептидом или гибридным белком, описанным в настоящей заявке; и детекцию связывания модифицированного полипептида или слитого белка с биологическим образцом.

Также предусмотрены наборы, которые включают модифицированный полипептид

или гибридный белок, описанные в настоящей заявке, связанные с твердой подложкой.

Вышеупомянутые и другие цели и признаки изобретения станут более очевидными из следующего подробного описания, которое продолжается со ссылкой на прилагаемые чертежи.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A-1D: стратегия селекции вариантов ACE2 с высокой степенью связывания с RBD S SARS-CoV-2. (Фиг. 1A) среду от клеток Expi293F, секретирующих S-RBD SARS-CoV-2, слитый с sfGFP, собирали и инкубировали в различных разведениях с клетками Expi293F, экспрессирующими ACE2 с меткой мус. Связывание S-RBD-sfGFP измеряли с помощью проточной цитометрии. Разведения среды, содержащей S-RBD-sfGFP, используемые для селекции методом анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), указаны стрелками. (Фиг. 1B-1C) клетки Expi293F временно трансфицировали плазмидой ACE2 дикого типа, разведенной большим избытком ДНК-носителя. В этих условиях клетки обычно приобретают не более одной кодирующей плазмиды, и большинство клеток являются отрицательными. Клетки инкубировали со средой, содержащей S-RBD-sfGFP, и совместно окрашивали флуоресцентным анти-мус антителом для обнаружения поверхностного ACE2 с помощью проточной цитометрии. Во время анализа 67% клеток с наибольшей экспрессией выбирали из ACE2-положительной популяции (фиг. 1B). Связанный S-RBD впоследствии измеряли по отношению к поверхностной экспрессии ACE2 (фиг. 1C). (Фиг. 1D) клетки Expi293F трансфицировали библиотекой, полученной насыщающим мутагенезом ACE2 по единичным сайтам, и анализировали, как указано на фиг. 1B. При проведении FACS было собрано 15% клеток с максимальным связыванием S-RBD по отношению к экспрессии ACE2 (сортировка nCoV-S-High), а 20% клеток с минимальным связыванием было собрано отдельно (сортировка nCoV-S-Low).

Фиг. 2: мутационный профиль ACE2 для сигнала высокого связывания с RBD из S SARS-CoV-2. Log₂ коэффициенты обогащения для отбора nCoV-S-High построены на графике от ≤ -3 (т.е. истощенные/вредные) до нейтральных и $\geq +3$ (т.е. обогащенные). Первичная структура ACE2 построена по вертикальной оси, аминокислотные замены нанесены по горизонтальной оси. *- стоп-кодон.

Фиг. 3A-3F: данные из независимых повторов демонстрируют близкое соответствие. (фиг. 3A-3B) Log₂ коэффициенты обогащения для мутаций ACE2 в популяциях nCoV-S-High (фиг. 3A) и nCoV-S-Low (фиг. 3B) хорошо согласуются между двумя независимыми экспериментами FACS. В повторе 1 использовали разведение 1/40, а в повторе 2 использовали разведение 1/20 среды, содержащей S-RBD-sfGFP. Значения R²

относятся к несинонимичным мутациям. (Фиг. 3С) средние Log_2 коэффициенты обогащения имеют тенденцию к отрицательной корреляции между типами nCoV-S-High и nCoV-S-Low. Нонсенс-мутации и небольшое количество несинонимичных мутаций не экспрессируются на плазматической мембране и истощаются в обоих видах популяций (т.е. расположены ниже диагонали). (Фиг. 3D-3F) корреляционные графики показателей консервативности остатков для популяций из повторов nCoV-S-High (фиг. 3D) и nCoV-S-Low (фиг. 3E) и из усредненных данных для обеих популяций nCoV-S-High по сравнению с обеими популяциями nCoV-S-Low (фиг. 3F). Показатели консервативности рассчитывают из среднего значения log_2 коэффициентов обогащения для всех аминокислотных замен в каждом положении остатка.

Фиг. 4А-4С: предпочтительная последовательность остатков ACE2 для высокого связывания с RBD из S SARS-CoV-2. (Фиг. 4А) показатели консервативности популяций nCoV-S-High сопоставлены со структурой крио-ЭМ (PDB 6M17) связанного с S-RBD ACE2 (поверхность). Слева показан вид сверху полости связывания с субстратом, и для ясности показан только один протеазный домен. (Фиг. 4В) средние коэффициенты обогащения, взвешенные по гидрофобности, сопоставлены со структурой ACE2, связанной с RBD. (Фиг. 4С) увеличенный вид части ACE2. Прилагаемая тепловая карта отображает Log_2 коэффициенты обогащения от популяции nCoV-S-High для замен ACE2-T27, D30 и K31 от ≤ -3 (истощенные) до $\geq +3$ (обогащенные).

Фиг. 5А-5С: одиночные аминокислотные замены в ACE2, спрогнозированные на основании глубокого мутационного сканирования на предмет повышения связывания RBD, имеют небольшие эффекты. (Фиг. 5А) клетки Expi293F, экспрессирующие полноразмерный ACE2, окрашивали средой, содержащей RBD-sfGFP, и анализировали с помощью проточной цитометрии. Данные сравнивали между ACE2 дикого типа и одиночным мутантом (L79T). Повышенное связывание RBD наиболее заметно в клетках, экспрессирующих низкие уровни ACE2 (меньшее окно). В этом эксперименте ACE2 имеет внеклеточную N-концевую метку тус выше остатка S19, которую используют для обнаружения поверхностной экспрессии. (Фиг. 5В) связывание RBD-sfGFP измеряли для 30 аминокислотных замен в ACE2. Данные представляют собой относительное изменение средней флуоресценции GFP в окне с низким уровнем экспрессии за вычетом фоновой флуоресценции. Среднее значение $n=2$, планки погрешностей представляют собой диапазон. (Фиг. 5С) относительное связывание RBD-sfGFP, измеренное для всей ACE2-положительной популяции (большее окно на фиг. 5А), показано на верхнем графике, а на нижнем графике представлена относительная экспрессия ACE2, измеренная путем детекции внеклеточной метки тус. Связывание RBD-sfGFP с общей положительной

популяцией коррелирует с общей экспрессией ACE2, и поэтому различия в связывании между мутантами наиболее очевидны только после контроля уровней экспрессии, как показано на фиг. 5B.

Фиг. 6A-6B: сконструированный sACE2 с усиленным связыванием с S. (Фиг. 6A) экспрессию мутантов sACE2-sfGFP качественно оценивали по флуоресценции трансфицированных клеточных культур. (Фиг. 6B) клетки, экспрессирующие полноразмерный S, окрашивали разведениями среды, содержащей sACE2-sfGFP, и связывание анализировали с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 7A-7D: аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC) очищенных белков sACE2. (Фиг. 7A) очищенные белки sACE2 (10 мкг) разделяли на 4-20% ДСН-полиакриламидном геле и окрашивали красителем Кумасси. (Фиг. 7B) аналитическая SEC слитых с IgG1 sACE2 дикого типа и sACE2.v2. Молекулярные массы (ММ) стандартов указаны в кДа над пиками. Абсорбция эталонов молекулярных весов увеличена для ясности. (Фиг. 7C) аналитическая SEC белков, меченных 8his. Главный пик соответствует ожидаемой молекулярной массе мономера. Также наблюдается димерный пик, хотя его количество различается между независимыми белковыми препаратами (сравните с фиг. 9D). (Фиг. 7D) растворимые белки ACE2-8h инкубировали при 37°C в течение 40 часов и анализировали с помощью SEC.

Фиг. 8A-8E: вариант sACE2 с высокой аффинностью к S. (Фиг. 8A) клетки Epxi293F, экспрессирующие полноразмерный S, инкубировали с очищенным sACE2 дикого типа или sACE2.v2, гибридным с 8his (сплошные линии) или IgG1-Fc (пунктирные линии). После промывания связанный белок определяли с помощью проточной цитометрии. (Фиг. 8B) связывание 100 нМ sACE2-IgG1 дикого типа (пунктирные линии) было конкурентным с sACE2-8h дикого типа или sACE2.v2-8h. Конкурирующие белки одновременно добавляли к клеткам, экспрессирующим полноразмерный S, и связанные белки определяли с помощью проточной цитометрии. (Фиг. 8C) биослойная интерферометрия (BLI), кинетика ассоциации ($t =$ от 0 до 120 сек) и диссоциации ($t > 120$ сек) sACE2-8h дикого типа с иммобилизованным RBD-IgG1. (Фиг. 8D) кинетика связывания sACE2.v2-8h с иммобилизованным RBD-IgG1, измеренная с помощью BLI. (Фиг. 8E) конкуренция за связывание с иммобилизованным RBD в ИФА между IgG сыворотки выздоровевших пациентов с COVID-19 по сравнению с sACE2-8h дикого типа или sACE2.v2-8h. Были протестированы три разные сыворотки пациентов (от P1 до P3 в оттенках от светлого до темного).

Фиг. 9A-9G: оптимизация высокоаффинного варианта sACE2 для повышения выхода. (Фиг. 9A) разведения среды, содержащей sACE2-sfGFP, инкубировали с клетками

Expri293F, экспрессирующими полноразмерный S. После промывания связанный sACE2-sfGFP анализировали с помощью проточной цитометрии. (Фиг. 9B) окрашенный красителем кумасси ДСН-полиакриламидный гель сравнивает выход вариантов sACE2-IgG1, очищенных из экспрессионной среды с помощью смолы, содержащей белок А. (фиг. 9C) Окрашенный красителем кумасси гель с очищенными вариантами sACE2-8h (10 мкг на дорожку). (Фиг. 9D) по аналитической SEC sACE2.v2.4-8h не отличается от sACE2-8h дикого типа. Поглощение стандартов молекулярных весов увеличено для ясности, при этом молекулярная масса указывается над пиками элюирования в кДа. (Фиг. 9E) аналитическая SEC после хранения при 37°C в течение 60 часов. Вариант sACE2.v2.2 имеет более гидрофобную поверхность и более высокую склонность к частичной агрегации по сравнению с sACE2.v2.4, поэтому частичная нестабильность при хранении может быть неразрывно связана с повышенной гидрофобностью. (Фиг. 9F) ассоциация ($t =$ от 0 до 120 сек) и диссоциация ($t > 120$ сек) sACE2-8h дикого типа с иммобилизованным RBD-IgG1, измеренная с помощью BLI. Данные сопоставимы со вторым независимым препаратом sACE2-8h, показанным на фиг. 8C. (Фиг. 9G) кинетика BLI для sACE2.v2.4-8h с иммобилизованным RBD-IgG1.

Фиг. 10A-10D: димерный вариант sACE2 с улучшенными свойствами связывания вирусного спайк-белка. (фиг. 10A) Аналитическая SEC sACE2-8h дикого типа и sACE2.v2.4-8h после инкубации при 37°C в течение 62 часов. (Фиг. 10B) ИФА сывороточного IgG выздоровевших пациентов (P1-P3 в оттенках от светлого до темного), связывающегося с RBD. Добавляли димерные sACE2₂(WT)-8h или sACE2₂.v2.4-8h для конкуренции с антителами, распознающими сайт связывания рецептора. Концентрации основаны на мономерных субъединицах. (Фиг. 10C) ассоциация ($t =$ от 0 до 120 сек) и диссоциация ($t > 120$ сек) RBD-8h с иммобилизованным sACE2₂(WT)-IgG1, измеренная с помощью BLI. (Фиг. 10D) кинетика BLI связывания RBD-8h с иммобилизованным sACE2₂.v2.4-IgG1.

Фиг. 11: усиленная нейтрализация SARS-CoV-2 и SARS-CoV-1 с помощью сконструированных рецепторов. В анализе микронейтрализации мономерные (сплошные линии) или димерные (пунктирные линии) sACE2(WT)-8h или sACE2.v2.4-8h предварительно инкубировали с вирусом перед добавлением к клеткам VeroE6. Концентрации основаны на мономерных субъединицах. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM (стандартная ошибка среднего значения) для $n=4$ (2 независимых эксперимента с 2 техническими повторами).

Фиг. 12A-12C: связывание гликозилированного мутанта sACE2 с RBD SARS-CoV-2. (Фиг. 12A) протеазный домен растворимого ACE2, несущий мутацию T92Q, очищали в

виде гибрида с 8his-меткой. Шесть мкг разделяли на окрашенном кумасси 4-20% ДСН-полиакриламидном геле для оценки чистоты. (Фиг. 12В) аналитическая SEC показывает, что главный пик элюируется в виде мономера, а меньшая фракция элюируется при ожидаемой молекулярной массе димера. (Фиг. 12С) в экспериментах по биослойной интерферометрии (BLI) RBD-IgG1 иммобилизовали на поверхности сенсора, и измеряли ассоциацию и диссоциацию sACE2-T92Q-8h. Зарегистрированная аффинность (80 нМ) выше, чем у эквивалентного белка дикого типа (140-150 нМ, фиг. 8С и 9F).

Фиг. 13А-13С: измерения проточной цитометрией связывания sACE2 с меченым тус S, экспрессированным на плазматической мембране. (Фиг. 13А) клетки Expi293F, экспрессирующие полноразмерный S, либо немеченый (фиг. 8А), либо с внеклеточной меткой эпитопа тус, были выделены по свойствам прямого светорассеяния для основной клеточной популяции (область окна). (Фиг. 13В) гистограммы, демонстрирующие типичные необработанные данные анализа проточной цитометрии экспрессирующих тус-S клеток, инкубированных с 200 нМ sACE2-8h дикого типа или sACE2.v2. После промывания связанный белок выявляли вторично с помощью флуоресцентного анти-HIS-FITC. Флуоресценция тус-S-экспрессирующих клеток, обработанных без sACE2, показана черным цветом. (Фиг. 13С) связывание очищенного sACE2 дикого типа или sACE2.v2, гибридного с 8his (сплошные линии) или IgG1-Fc (пунктирные линии), с клетками, экспрессирующими тус-S.

Фиг. 14А-14D: димерный sACE2₂ активно связывается с RBD. (Фиг. 14А) ДСН-электрофорез на полиакриламидном геле очищенных димерных белков sACE2₂-8h (10 мкг на дорожку, краситель кумасси). (Фиг. 14В) препаративная SEC белков sACE2₂-8h. Элюат после аффинной хроматографии NiNTA концентрировали и вводили в колонку для гель-фильтрации. Поглощение стандартов молекулярной массы увеличено, а масса в кДа указана над пиками элюирования. (Фиг. 14С) клетки Expi293F, экспрессирующие полноразмерный S, инкубировали с sACE2₂-8h дикого типа и v2.4, промывали и окрашивали флуоресцентным анти-his. Среднее значение n=2, планки погрешностей представляют собой диапазон. Связывание напоминает связывание, наблюдаемое для гибридов IgG1 с sACE2 (фиг. 8А и 13С), что указывает на активные взаимодействия между димерным sACE2₂-8h и тримерным спайком на клеточной поверхности. (Фиг. 14D) кинетика BLI для димерных sACE2₂(WT)-8h и sACE2₂.v2.4-8h, avidно связывающихся с димерным RBD-IgG1, иммобилизованным на поверхности сенсора.

Фиг. 15А-15В: очищенный sACE2₂-IgG1 представляет собой димер. (Фиг. 15А) окрашенный кумасси гель для очищенных белков sACE2₂-IgG1 (10 мкг на дорожку). (Фиг. 15В) аналитическая SEC очищенного sACE2₂-IgG1, наложенная на шкалу поглощения

стандартов молекулярной массы (масса в кДа указана над пиками элюции). Обратите внимание на отсутствие пиков с высокой молекулярной массой, которые могут соответствовать конкатемерам, опосредованным димеризацией sACE2₂ и IgG1 между различными субъединицами.

Фиг. 16А-16D: немеченый sACE2₂.v2.4, экспрессируемый в нечеловеческих клетках, прочно связывает S. (Фиг. 16А) сравнение электрофореграмм от ДСН-ПАГЭ для sACE2₂.v2.4, очищенного из клеток Expi293F человека с 8h-меткой, и немеченого белка, полученного в линии ExpiCHO-S не происходящей от человека. 10 мкг на дорожку. (Фиг. 16В) аналитическая SEC sACE2₂.v2.4 до и после инкубации при 37°C в течение 146 часов. Поглощение стандартов молекулярной массы увеличено, и указана масса в кДа. (Фиг. 16С) S-экспрессирующие клетки Expi293F совместно инкубировали со 100 нМ sACE2₂-IgG1 дикого типа и увеличивающимися концентрациями sACE2₂(WT)-8h, полученного из клеток человека, sACE2₂.v2.4-8h, полученного из клеток человека, или полученного из ExpiCHO-S sACE2₂.v2.4. Связанные his-меченые белки (сплошные линии) и sACE2₂(WT)-IgG1 (пунктирные линии) измеряли с помощью проточной цитометрии. (Фиг. 16D) авидное связывание немеченого sACE2₂.v2.4 с иммобилизованным RBD-IgG1, измеренное с помощью ВЛ.

Фиг. 17: сконструированный рецептор имеет пониженную каталитическую активность. Расщепление пептидного субстрата с высвобождением флуоресцентного продукта измеряли для sACE2₂(WT)-8h, полученного из клеток человека (слева), sACE2₂.v2.4-8h, полученного из клеток человека (в центре) и sACE2₂.v2.4, полученного из ExpiCHO-S (справа). Удельную активность определяли в начальные моменты времени, когда высвобождение продукта было линейным, и данные для самой высокой концентрации белка дикого типа (22 нМ) исключали. Время = 0 мин указывает, когда началась запись флуоресценции.

Фиг. 18: SARS-ассоциированные коронавирусы имеют большое разнообразие последовательностей в сайте связывания ACE2. RBD из SARS-CoV-2 (PDB 6M17) окрашен по разнообразию между 7 штаммами CoV, связанными с SARS.

Фиг. 19: сайт связывания ACE2 бета-коронавирусов, ассоциированных с SARS, представляет собой область с высоким разнообразием последовательностей. Последовательности RBD из 2 бета-коронавирусов человека и 5 бета-коронавирусов летучих мышей, которые используют ACE2 в качестве рецептора входа, выравняли (SEQ ID NO: 3-9). Нумерация основана на белке S SARS-CoV-2. Звездочками отмечены остатки RBD SARS-CoV-2, которые находятся в пределах 6,0 Å от ACE2 в PDB 6M17.

Фиг. 20А-20С: FACS-селекция вариантов S с высоким или низким сигналом

связывания с ACE2. (фиг. 20А) Анализ проточной цитометрией клеток Expi293F, экспрессирующих полноразмерный S SARS-CoV-2 с N-концевой меткой с-тус. Окрашивание тус-эпитопов представлено на горизонтальной оси, а детекция связанного sACE2_{2-8h} (2,5 нМ) - на вертикальной оси. S-плазмиду разбавляли в 1500 раз по массе ДНК-носителем, так что клетки обычно экспрессировали не более одного кодирующего варианта; в этих условиях большинство клеток являются отрицательными. (фиг. 20В) Проточная цитометрия клеток, трансфицированных библиотекой RBD для мутагенеза насыщения одного сайта (SSM), показывает клетки, экспрессирующие варианты S со сниженным связыванием sACE2_{2-8h}. (Фиг. 20С) стратегия гейтинга для FACS. Отбирали S-экспрессирующие клетки, положительные в отношении эпитопа с-тус, и было собрано 20% клеток с самой высокой («ACE2-High») и самой низкой («ACE2-Low») флуоресценцией со связанным sACE2_{2-8h} по отношению к экспрессии тус-S.

Фиг. 21: мутационный профиль в RBD полноразмерного S из SARS-CoV-2 для связывания с растворимым ACE2. Log₂ коэффициенты обогащения из глубокого мутационного сканирования RBD в полноразмерном S нанесены на график от ≤ -3 (истощенные/вредные) до 0 (нейтральные) и $\geq +3$ (обогащенные). Аминокислоты дикого типа указаны черным цветом. Последовательность RBD отложена по вертикальной оси, а аминокислотные замены отложены по горизонтальной оси. * - стоп-кодона.

Фиг. 22А-22D: глубокий мутагенез показывает, что сайт связывания ACE2 SARS-CoV-2 допускает множество мутаций. (Фиг. 22А) Позиционные оценки поверхностной экспрессии сопоставлены со структурой RBD SARS-CoV-2 (PDB 6M17, ориентировано как на фиг. 18). Некоторые остатки в сердцевине белка являются высококонсервативными при отборе FACS для поверхностной экспрессии S (судя по истощению мутаций в окнах ACE2-High и ACE2-Low), в то время как некоторые поверхностные остатки допускают мутации. (Фиг. 22В) график корреляции показателей экспрессии в результате селекции мутантов в клетках человека полноразмерного S (ось X) по сравнению с показателями консервативности (среднее значение log₂ коэффициентов обогащения в положении остатка) в результате селекции мутантов в выделенном RBD с помощью дрожжевого дисплея (ось Y). Указаны заметные экстремальные значения. (Фиг. 22С) показатели консервативности отобранной популяции клеток ACE2-High сопоставлены со структурой RBD. (Фиг. 22D) график корреляции показателей консервативности RBD для высокого связывания ACE2 в результате глубокого мутагенеза S в клетках человека (ось X) по сравнению с глубоким мутагенезом RBD на поверхности дрожжей (среднее значение ΔK_D app; ось Y).

Фиг. 23А-23С: аланиновые замены дисульфидно-связанных цистеинов в RBD

снижают поверхностную экспрессию S в клетках человека. (Фиг. 23А) RBD, окрашенный по показателю экспрессии в результате глубокого мутагенеза (консервативный или устойчивый к мутациям), образует непрерывное гидрофобное ядро с остальной частью субъединицы S1 в закрытой конформации (PDB 6VSB, цепь В). (Фиг. 23В) на основании анализа поверхностного иммунного окрашивания и проточной цитометрии клетки Expi293F, трансфицированные цистеиновыми мутантами тус-S, демонстрировали снижение как процента тус-положительных клеток (зона окна), так и средней флуоресценции в положительной популяции. Чтобы зафиксировать оба эффекта в одном числе, изменение среднего значения флуоресценции (ΔMFU) по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными вектором, рассчитывали для всей клеточной популяции после первого гейтинга путем рассеяния для жизнеспособных клеток. (Фиг. 23С) поверхностная экспрессия цистеиновых мутантов тус-S по сравнению с тус-S дикого типа. Данные представляют собой среднее значение \pm диапазон, $n = 2$ независимых повтора.

Фиг. 24А-24Г: конкурентная селекция для выявления мутаций RBD в S SARS-CoV-2, которые преимущественно связываются с рецепторами ACE2 дикого типа или сконструированными рецепторами. (Фиг. 24А) клетки Expi293F трансфицировали тус-S дикого типа и инкубировали с конкурирующими sACE2₂(WT)-IgG1 (25 нМ) и sACE2_{2.v2.4-8h} (20 нМ). Связанный белок выявляли с помощью проточной цитометрии после иммунного окрашивания на соответствующие метки эпитопов. (фиг. 24В) Как и на фиг. 24А, за исключением того, что клетки трансфицировали библиотекой RBD SSM. Видна популяция клеток, экспрессирующих варианты S с повышенной специфичностью к sACE2_{2.v2.4} (клетки смещены в верхнюю левую часть основной популяции). (Фиг. 24С) окна, используемые для FACS клеток, экспрессирующих библиотеку RBD SSM. После исключения клеток без связанного белка было собрано 20% клеток с максимальным связыванием sACE2_{2.v2.4-8h} (верхнее окно) и максимальным связыванием sACE2₂(WT)-IgG1 (нижнее окно). (Фиг. 24D-24Е) соответствие между \log_2 коэффициентами обогащения из двух независимых выборок FACS для клеток, экспрессирующих варианты S с повышенной специфичностью в отношении sACE2₂(WT) (фиг. 24D) или sACE2_{2.v2.4} (фиг. 24Е). Значения R^2 рассчитаны для несинонимичных мутаций. (фиг. 24F-24Г) Показатели консервативности рассчитаны из среднего значения \log_2 коэффициентов обогащения для всех несинонимичных замен в данном положении остатка. Графики корреляции показывают соответствие между показателями консервативности для двух независимых отборов клеток в пределах окон, специфичных для sACE2₂(WT) (фиг. 24D) или sACE2_{2.v2.4} (фиг. 24Е).

Фиг. 25А-25С: мутации в RBD, которые придают специфичность в отношении

ACE2 дикого типа, являются редкими. (Фиг. 25A) RBD SARS-CoV-2 окрашен по показателю специфичности (разнице между показателями консервативности для клеток, собранных в специфических окнах sACE2₂(WT) и sACE2₂.v2.4). Некоторые остатки являются горячими точками для мутаций с повышенной специфичностью в отношении sACE2₂(WT) или sACE2₂.v2.4. Контактующая поверхность ACE2 показана в виде ленты, а сайты мутаций в sACE2₂.v2.4 помечены и показаны в виде сфер. (Фиг. 25B) Log₂ коэффициенты обогащения для мутаций в S, экспрессированных клеточными популяциями, собранными в специфических окнах sACE2₂(WT) (ось X) и sACE2₂.v2.4 (ось Y). Данные представляют собой среднее значение от двух независимых экспериментов по сортировке. Мутанты S, для которых спрогнозирована повышенная специфичность в отношении sACE2₂(WT), тестировали с помощью направленного мутагенеза на фиг. 26. Мутанты S, для которых прогнозирована повышенная специфичность в отношении sACE2₂.v2.4, тестировали с помощью направленного мутагенеза на фиг. 27. (фиг. 25C) Мус-S дикого типа и два варианта, N501W и N501Y, экспрессировали в клетках Epr1293F и тестировали с помощью проточной цитометрии на связывание с sACE2₂(WT)-8h (пунктирные линии) или sACE2₂.v2.4-8h (сплошные линии). Наблюдается незначительное увеличение специфического связывания для sACE2₂ дикого типа.

Фиг. 26A-26B: скрининговые мутации S SARS-CoV-2, спрогнозированные глубоким мутагенезом как обеспечивающие повышенную специфичность в отношении sACE2₂ дикого типа по сравнению с sACE2₂.v2.4. (Фиг. 26A) относительная поверхностная экспрессия мутантов мус-S, определенная, как описано на фиг. 23. Данные представляют собой среднее значение ± диапазон, n = 2 независимых повтора. (фиг. 26B) Конкурентное связывание между sACE2₂(WT)-IgG1 (ось X) и sACE2₂.v2.4-8h (ось Y) на клетках Epr1293F, экспрессирующих указанные мус-меченые S-белки. Клетки, экспрессирующие варианты S с повышенной специфичностью по отношению к рецептору дикого типа, будут сдвинуты в правую нижнюю часть; наблюдаются лишь незначительные сдвиги. Клетки, экспрессирующие варианты S со сниженной поверхностной экспрессией и/или аффинностью к ACE2, имеют меньший процент в области гейтинга. Результаты представлены для 2 повторов.

Фиг. 27A-27B: скрининговые мутации S SARS-CoV-2, спрогнозированные глубоким мутагенезом как обеспечивающие повышенную специфичность в отношении sACE2₂.v2.4 по сравнению с sACE2₂ дикого типа. (Фиг. 27A) относительная поверхностная экспрессия мутантов мус-S, измеренная с помощью проточной цитометрии. Данные представляют собой среднее значение ± диапазон, n = 2. (фиг. 27B)

Анализ проточной цитометрией клеток, экспрессирующих варианты тус-S, связанные с конкурирующими sACE2₂(WT)-IgG1 (ось x) и sACE2_{2.v2.4-8h} (ось y). Клетки, экспрессирующие S с повышенной специфичностью по отношению к sACE2_{2.v2.4}, будут сдвинуты в верхнюю левую часть. Результаты представлены для 2 повторов.

Фиг. 28А-28В: время полужизни пептидов sACE2 в сыворотке после внутривенного введения. Неслитый sACE2_{2.v2.4} вводили в хвостовые вены мышей (3 самца и 3 самки на момент времени; 0,5 мг/кг). Сыворотку собирали и анализировали с помощью ИФА ACE2 (фиг. 28А) и на протеолитическую активность по отношению к флуорогенному субстрату (фиг. 28В). Данные представляют собой средние значения \pm SE.

Фиг. 29: фармакокинетика sACE2, слитого с Fc IgG1 человека, после внутривенного введения. Внутривенное введение 2,0 мг/кг sACE2₂-IgG1 дикого типа (незаштрихованные кружки) или sACE2_{2.v2.4}-IgG1 (закрашенные кружки) 3 самцам мышей в момент времени. Белок в сыворотке определяли количественно с помощью ИФА IgG1 человека. Данные представляют собой средние значения \pm SE.

Фиг. 30А-30D: фармакокинетика sACE2_{2.v2.4}-IgG1 в сыворотке после внутривенного введения. sACE2_{2.v2.4}-IgG1 вводили внутривенно мышам (3 самца и 3 самки на момент времени; 2,0 мг/кг). Сыворотку собирали и анализировали с помощью ИФА IgG1 человека (фиг. 30А), ИФА ACE2 (фиг. 30В) и на каталитическую активность ACE2 (фиг. 30С). Данные представляют собой среднее значение \pm SE. (фиг. 30D). Образцы сыворотки типичных самцов мышей разделяли в невозстанавливающих условиях на ДСН-геле для электрофореза и обрабатывали антисывороткой к IgG1 человека. Стандартом является 10 нг очищенного sACE2_{2.v2.4}-IgG1. Прогнозируемая молекулярная масса (исключая гликаны) составляет 216 кДа.

Фиг. 31А-31F: фармакокинетика белков ACE2, доставленных непосредственно в легкие. (фиг. 31А и 31В). sACE2₂-IgG1 дикого типа (незакрашенные кружки) и sACE2_{2.v2.4}-IgG1 (закрашенные кружки) вводили интратрахеально в дозе 1,0 мг/кг. Собирали легочную ткань, экстрагировали белки и анализировали с помощью ИФА для человеческого IgG1 (фиг. 31А) и ИФА ACE2 (фиг. 31В). Данные представляют собой среднее значение \pm SE, n = 3 самца на момент времени. (Фиг. 31С) экстракты легких типичных мышей, которым интратрахеально вводили sACE2_{2.v2.4}-IgG1, анализировали в невозстанавливающих условиях с помощью антител против IgG1 человека посредством иммуноблоттинга. (Фиг. 31D и 31Е) мышам вводили посредством ингаляции распыленный sACE2_{2.v2.4}-IgG1. Экстракты из легочной ткани анализировали с помощью ИФА ACE2 (фиг. 31D) и ИФА человеческого IgG1 (фиг. 31Е). Данные представляют собой среднее значение \pm SE, n = 3 самца на момент времени. (Фиг. 31F) типичные

экстракты из легочной ткани мышей, получавших распыленный sACE2₂.v2.4-IgG1, анализировали с помощью иммуноблоттинга с антителами против IgG1 человека.

Фиг. 32: нейтрализация проникновения псевдовируса в клетки легких человека с помощью sACE2₂-IgG1. Эпителиальные клетки легких человека A549, сверхэкспрессирующие рецептор ACE2, эпителиальные клетки легких человека A549 и эндотелиальные клетки легких человека инкубировали с псевдотипом вируса VSV-SARS-CoV-2-люциферазой и с sACE2₂-IgG1 дикого типа или сконструированным sACE2₂.v2.4-IgG1 в указанных концентрациях. Каждый эксперимент включал контроль без вируса (крайний левый столбец на каждом графике), все остальные образцы содержали дозу вируса с указанной множественностью инфицирования (MOI). Степень проникновения вируса определяли количественно на основе активности люциферазы.

Фиг. 33: эффективность sACE2₂-IgG1 для ингибирования проникновения псевдовируса в легкие и печень на модели инфекции *in vivo*. Мышам K18-hACE2, которые экспрессируют человеческий рецептор ACE2 в эпителиальных клетках, внутривенно вводили sACE2₂-IgG1 (дикий тип, средняя полоса; сконструированный v2.4, правая полоса) и интраперитонеально вводили псевдотип вируса VSV-SARS-CoV-2-люциферазу. Через 24 часа собирали легкие и печень, и количественно определяли степень проникновения вируса на основе экспрессии люциферазы.

Список последовательностей

Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности, перечисленные в прилагаемом перечне последовательностей, показаны с использованием стандартных буквенных сокращений для нуклеотидных оснований и трехбуквенного кода для аминокислот, как определено в 37 C.F.R. 1.822. Показана только одна цепь каждой последовательности нуклеиновой кислоты, но комплементарная цепь понимается как включенная любой ссылкой на показанную цепь. Перечень последовательностей представлен в виде текстового файла ASCII, созданного 11 марта 2021, размером 43,7 КБ, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В прилагаемом списке последовательностей:

SEQ ID NO: 1 представляет собой аминокислотную последовательность ACE2 человека (также называемого пептидил-дипептидазой А; депонирована под инвентарным номером GenBank NP_068576.1):

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEE
 NVQNMNNAAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSSEDK
 SKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWR
 SEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLI

EDVEHTFEEIKPL YEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYS
 LTVPPGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTD
 PGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQP
 FLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTIVG
 TLPFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPAS
 LFHVSNDYSFIRYYTRTL YQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLR
 LGKSEPWTLAENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYA
 DQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDEMMLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEDV
 RVANLKPRISTNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPT
 LGPPNQPPVSIWLVFVGMGVIVVGIVILIFTGIRDK KKNKARSGENPYASIDISKGE
 NNPGFQNTDDVQTSF

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность
 поверхностного гликопротеина (белок S) коронавируса 2 тяжелого острого
 респираторного синдрома (депонирована под инвентарным номером GenBank
 YP_009724390.1):

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPF
 FSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDŠKTQS
 LLIVN NATNVVIK VCEFQFCNDPFLGVY YHKNNK SWMESEFRVYSSANNCTFEYVS
 QPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLP
 IGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDA
 VDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRF
 ASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRG
 DEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSN
 LKPFERDISTEYIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELL
 HAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTD
 AVRDPQTL EILDITPCSF GGVS VJTPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPT
 WRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVAS
 QSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC
 SNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILP
 DPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFENGLTVLPPLLT
 DEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLI
 ANQFN SAIGKI QDSL SSTA SALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDIL
 SRLDKVEAEVQIDRLITGR LQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSK

**RVDFCGKGYHLMSPQSAHPGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGV
FVSNNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEEL
DKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYI
KWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKG
VKLHYT**

SEQ ID NO: 3-9 представляют собой аминокислотные последовательности последовательностей RBD из бета-коронавирусов человека и летучих мышей (см. фиг. 19).

SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность sACE2.v2.4, состоящую из остатков 19-732 человеческого ACE2 (включая домены протеазы и димеризации) с тремя аминокислотными заменами по сравнению с человеческим ACE2: T27Y, L79T и N330Y.

**STIEEQAKYFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLK
EQSTTAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGK
VCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLK
NEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHA
YVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMV
DQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWEYSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLG
KGDFRILMCTKVTMDDFLTAAHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEI
MSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTI VGTLPFTYMLEKWRWMVF
KGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTL
YQFQFQEALCQA AKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLAENVVGA
KNMNV RPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKA
YEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVANLKPRISFNFFVTAP
KNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLG**

SEQ ID NO: 11 представляет собой аминокислотную последовательность sACE2.v2.4-IgG1, состоящую из sACE2.v2.4, слитого с Fc IgG1 человека.

**STIEEQAKYFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLK
EQSTTAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGK
VCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLK
NEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHA
YVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMV
DQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWEYSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLG**

KGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEI
 MSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQAL TIVGTL PFTYMLEKWRWMVF
 KGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRL
 YQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGA
 KNMNVRLNLYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKA
 YEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVANLKPRI SFNFFVTAP
 KNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGSDKTHITCPPCPAPPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Подробное описание изобретения

I. Сокращения

ACE2	ангиотензинпревращающий фермент 2
BLI	биослойная интерферометрия
CoV	коронавирус
COVID-19	коронавирусная болезнь 2019
и/т	интратрахеальное
в/в	внутривенное
MOI	множественность инфицирования
RBD	домен связывания рецептора
sACE2	растворимый ангиотензинпревращающий фермент 2
SARS	тяжелый острый респираторный синдром
SARS-CoV-2	Коронавирус атипичной пневмонии 2
SEC	эксклюзионная хроматография
sfGFP	зеленый флуоресцентный белок-суперфолдер

II. Термины и методы

Если не указано иное, технические термины используются в соответствии с общепринятым употреблением. Определения общих терминов в молекулярной биологии можно найти в Benjamin Lewin, *Genes X*, published by Jones & Bartlett Publishers, 2009; and Meyers et al. (eds.), *The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine*, опубликованной Wiley-VCH в 16 томах, 2008; и других подобных источниках.

Используемые в настоящей заявке формы единственного числа относятся как к единственному, так и к множественному числу, если в контексте явно не указано иное. Например, термин «антиген» включает один или несколько антигенов, и может считаться

эквивалентным фразе «по меньшей мере один антиген». Используемый в настоящей заявке термин «содержит» означает «включает». Кроме того, следует понимать, что любые и все размеры оснований или аминокислот, а также все значения молекулярной массы, указанные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и приведены для описательных целей, если не указано иное. Хотя многие способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, могут быть использованы, здесь описаны конкретные подходящие способы и материалы. В случае конфликта настоящее описание, включая пояснения терминов, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения. Для облегчения обзора различных вариантов осуществления предоставляются следующие пояснения терминов:

Аэрозоль: взвесь мелких твердых частиц или капель жидкости в газе (например, в воздухе).

Введение: обеспечить субъекта агентом, таким как модифицированный полипептид ACE2 человека, или дать ему этот агент любым эффективным путем. Типичные способы введения включают, без ограничения указанными, инъекции (такие как подкожные, внутримышечные, внутрикожные, интраперитонеальные, внутриопухолевые и внутривенные), трансдермальные, интраназальные, интратрахеальные и ингаляционные пути.

Биологический образец: образец, полученный от субъекта (например, человека или субъекта ветеринарии). Биологические образцы включают, например, образцы жидкости, клеток и/или тканей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биологический образец представляет собой образец жидкости. Образцы жидкости включают, помимо прочего, сыворотку, кровь, плазму, мочу, фекалии, слюну, спинномозговую жидкость (СМЖ), бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), мазок из носа или другую жидкость организма. Биологические образцы также могут относиться к образцам клеток или тканей, таким как образцы биопсии или срезы тканей.

Контактирование: размещение в непосредственной физической близости; включает контакт как в твердом, так и в жидком виде.

Коронавирус: большое семейство вирусов с положительной смысловой одноцепочечной РНК, которые могут заражать людей и животных. Коронавирусы получили свое название из-за похожих на корону шипов на их поверхности. Вирусная оболочка состоит из двойного липидного слоя, содержащего белки вирусной мембраны (М), оболочки (Е) и шипа (S). Большинство коронавирусов вызывают заболевания

верхних дыхательных путей легкой или средней тяжести, такие как простуда. Однако появились три коронавируса, которые могут вызывать более серьезные заболевания и смерть у людей: коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), SARS-CoV-2 и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). Другие коронавирусы, которые заражают людей, включают человеческий коронавирус HKU1 (HKU1-CoV), человеческий коронавирус OC43 (OC43-CoV), человеческий коронавирус 229E (229E-CoV), человеческий коронавирус NL63 (NL63-CoV). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения «коронавирус» включает любой коронавирус человека или зоонозный коронавирус, который использует ACE2 в качестве клеточного рецептора, включая известные и появляющиеся штаммы коронавируса. Зоонозные коронавирусы включают, помимо прочего, коронавирусы летучих мышей и грызунов.

Слитый белок: белок, содержащий по меньшей мере часть двух разных (гетерологичных) белков. В некоторых вариантах осуществления гибрида состоит из модифицированного полипептида ACE2 и белка Fc, такого как Fc из IgG1 человека.

Гетерологичный: происходящий из отдельного генетического источника или вида.

Выделенный: «выделенный» («изолированный») биологический компонент, такой как нуклеиновая кислота или белок, который был в значительной степени отделен или очищен от других биологических компонентов из окружающей среды (например, клетки), в которой этот компонент встречается в природе, например, других хромосомных и экстрахромосомных ДНК и РНК, белков и органелл. Нуклеиновые кислоты и белки, которые были «выделены», включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными методами очистки. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты и белки, полученные с помощью рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

Небулайзер: устройство для преобразования терапевтического агента (такого как полипептид) в жидкой форме в туман или мелкодисперсный спрей (аэрозоль), который можно вводить путем ингаляции в дыхательную систему, например, легкие. Небулайзер также известен как «аэрозольный ингалятор».

Фармацевтически приемлемые носители: используемые фармацевтически приемлемые носители являются обычными носителями. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005), описывает композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки полипептидов и других композиций, раскрытых в настоящей заявке. В общем, природа носителя будет зависеть от

конкретного используемого режима введения. Например, составы для парентерального введения обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные растворы солей, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (таких как формы порошка, пилюли, таблетки или капсулы) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннитол, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтического качества. В дополнение к биологически нейтральным носителям вводимые фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и рН-буферные агенты и т.п., например, ацетат натрия или сорбитан монолаурат.

Полипептид, пептид и белок: относятся к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться соединениями, не являющимися аминокислотами. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован; например, образование дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацелированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями, такими как конъюгация с метящим компонентом. Используемый в настоящей заявке термин «аминокислота» включает природные и/или неприродные или синтетические аминокислоты, включая глицин и оба оптических изомера D или L, а также аминокислотные аналоги и пептидомиметики.

Профилактика, лечение или облегчение болезни: «профилактика» болезни относится к ингибированию полного развития болезни. «Лечение» относится к терапевтическому вмешательству, которое ослабляет признак или симптом заболевания или патологического состояния после того, как оно начало развиваться. «Облегчение» относится к уменьшению количества или тяжести признаков или симптомов заболевания. «Профилактическое» лечение представляет собой лечение, проводимое у субъекта, у которого не проявляются признаки заболевания или проявляются только ранние признаки, с целью снижения риска развития патологии. Профилактическое лечение может быть доконтактным или постконтактным.

Профилактика: использование медицинского лечения для предотвращения (или снижения риска развития) заболевания или инфекции, такой как инфекция CoV или COVID-19. В контексте вирусной инфекции доконтактная профилактика относится к лечению, которое проводится до того, как субъект подвергся воздействию вируса, тогда как постконтактная профилактика относится к лечению, проводимому сразу или вскоре

после контакта с вирусом, но до появления признаков или возникновения симптомов инфекции.

Очищенный: термин «очищенный» не означает абсолютной чистоты; скорее, это относительный термин. Таким образом, например, препарат очищенного полипептида представляет собой препарат, в котором полипептид более обогащен, чем полипептид в его природной среде, такой как внутри клетки. В одном варианте осуществления препарат очищают таким образом, чтобы полипептид составлял по меньшей мере 50% от общего содержания пептидов или белков в препарате. Очистка по существу означает очистку от других белков или клеточных компонентов. Очищенный по существу белок имеет чистоту по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 98%. Таким образом, в одном конкретном неограничивающем примере очищенный по существу белок на 90% свободен от других белков или клеточных компонентов.

Идентичность последовательности: сходство между последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот выражается в терминах сходства между последовательностями, иначе называемого идентичностью последовательностей. Идентичность последовательности часто измеряют с точки зрения процентной идентичности (или сходства, или гомологии); чем выше процент, тем более похожи две последовательности. Гомологи или варианты полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты будут обладать относительно высокой степенью идентичности последовательности при выравнивании с использованием стандартных методов.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; и Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988. Altschul et al., *Nature Genet.* 6:119, 1994, представляющих подробное рассмотрение методов выравнивания последовательностей и расчетов гомологии.

Инструмент NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990) доступен из нескольких источников, включая Национальный центр биотехнологической информации (NCBI, Bethesda, MD) и Интернет, для использования в связи с программами анализа последовательности blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx. Описание того, как определить идентичность последовательности с помощью этой программы, доступно на веб-сайте NCBI в Интернете.

Гомологи и варианты полипептида, такие как модифицированный полипептид

ACE2 человека, обычно характеризуются наличием по меньшей мере примерно 75%, например, по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, при подсчете для полноразмерного выравнивания с аминокислотной последовательностью антитела с использованием NCBI Blast 2.0, с установкой параметров по умолчанию «gapped blastp». Для сравнения аминокислотных последовательностей, содержащих более примерно 30 аминокислот, используют функцию последовательностей Blast 2 с использованием матрицы BLOSUM62 по умолчанию, настроенной на параметры по умолчанию (штраф за наличие гэпа 11 и штраф за гэп на остаток 1). При выравнивании коротких пептидов (менее примерно 30 аминокислот) выравнивание следует выполнять с использованием функции последовательностей Blast 2, используя матрицу PAM30 с параметрами по умолчанию (штрафы за открытый гэп 9, за удлинение гэпа 1). Белки с еще большим сходством с эталонными последовательностями будут демонстрировать возрастающую процентную идентичность при оценке этим методом, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности. Когда не всю последовательность сравнивают на предмет идентичности последовательности, гомологи и варианты обычно обладают идентичностью последовательности по меньшей мере 80% в коротких окнах из 10-20 аминокислот, и могут иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% или 95%, в зависимости от их сходства с эталонной последовательностью. Методы определения идентичности последовательности в таких коротких окнах доступны на веб-сайте NCBI в Интернете. Специалист в данной области техники поймет, что эти диапазоны идентичности последовательностей приведены только для справки; вполне возможно, что могут быть получены выражено значимые гомологи, выходящие за указанные диапазоны.

Субъект: живые многоклеточные позвоночные организмы, категория, включающая как людей, так и животных, в том числе людей и млекопитающих.

Терапевтически эффективное количество: количество конкретного вещества (такого как модифицированный полипептид ACE2 человека), достаточное для достижения необходимого эффекта у субъекта, проходящего лечение. Например, это может быть количество, необходимое для ингибирования репликации CoV или снижения титра CoV у субъекта. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, необходимое для ингибирования репликации CoV по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на

70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (по сравнению с отсутствием лечения). В другом варианте осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, необходимое для снижения титра CoV у субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (по сравнению с отсутствием лечения). Терапевтически эффективным количеством также может быть количество, необходимое для уменьшения или устранения одного или нескольких симптомов инфекции CoV, например количество, необходимое для снижения или устранения лихорадки, кашля или одышки. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество представляет собой количество, необходимое для снижения риска заражения CoV или развития заболевания, такого как COVID-19, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (по сравнению с отсутствием лечения).

Вектор: молекула нуклеиновой кислоты, введенная в клетку-хозяина, в результате чего образуется трансформированная клетка-хозяин. Вектор может включать последовательности нуклеиновой кислоты, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, например, точку начала репликации. Вектор может также включать один или несколько селективных маркерных генов и другие генетические элементы, известные в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

III. Модифицированные полипептиды ACE2 и способы применения

Гликопротеин шипа (S) SARS-CoV-2 связывает ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) на клетках-хозяевах. S представляет собой тримерный гибридный белок вируса класса I, который подвергается протеолитическому процессингу с образованием субъединиц S1 и S2, которые остаются нековалентно связанными в состоянии до слияния (Walls et al., *Cell*. 2020 Mar 6; 181(2):281-292.e6; Hoffmann et al., *Cell*. 2020 Mar 4; 181(2)271-280.e8; Tortorici and Veesler, *Adv Virus Res. Elsevier*; 2019;105:93–116). При взаимодействии ACE2 с рецептор-связывающим доменом (RBD) в S1 (Wong et al., *J Biol Chem*; 2004 Jan 30;279(5):3197–3201) происходят конформационные перестройки, которые вызывают шеддинг S1, расщепление S2 протеазами хозяина и экспозицию слитого пептида, примыкающего к сайту протеолиза S2' (Tortorici and Veesler, *Adv Virus Res. Elsevier*; 2019;105:93–116; Madu et al., *J Virol*; 2009 Aug;83(15):7411–7421;

Walls et al., *Proc Natl Acad Sci USA*; 2017 Oct 17;114(42):11157–11162; Millet and Whittaker, *Proc Natl Acad Sci USA*; 2014 Oct 21;111(42):15214–15219). Оптимальная укладка S в конформацию после слияния связана со слиянием мембраны клетки-хозяина и вируса и высвобождением вирусной РНК в цитозоль. Атомные контакты с RBD ограничены протеазным доменом ACE2 (Yan et al., *Science*. 2020 Mar 4; eabb2762; Li et al., *Science*. 2005 Sep 16;309(5742):1864–1868), и растворимый ACE2 (sACE2), в котором удалены шеечный и трансмембранный домены, достаточен для связывания S и нейтрализации инфекции (Li et al., *Nature*. 2003 Nov 27;426(6965):450–454; Hofmann et al., *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 9;319(4):1216–1221; Lei et al., *bioRxiv*. 2020 Jan 1; :2020.02.01.929976; Moore et al., *J Virol*; 2004 Oct;78(19):10628–10635). В принципе, вирус имеет ограниченный потенциал избежать нейтрализации, опосредованной sACE2, без одновременного снижения аффинности к нативным рецепторам ACE2, которое приведет к ослаблению вирулентности. Кроме того, слияние sACE2 с Fc-областью иммуноглобулина человека может обеспечить повышение авидности при одновременном задействовании иммунных эффекторных функций и повышении стабильности в сыворотке, что является особенно необходимым качеством, если он предназначен для профилактики (Moore et al., *J Virol*; 2004 Oct; 78(19):10628–10635; Liu et al., *Kidney Int*. 2018 Jul;94(1):114–125), а рекомбинантный sACE2 оказался безопасным для здоровых людей (Haschke et al., *Clin Pharmacokinet*. 2013 Sep;52. (9):783–792) и пациентов с заболеваниями легких (Khan et al., *Crit Care*. 2017 Sep 7;21(1):234).

Быстрое и нарастающее распространение коронавируса SARS2 (SARS-CoV-2) представляет собой немедленную чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, и в настоящее время нет утвержденных терапевтических средств или вакцин. Вирусный спайк-белок S связывает ассоциированный с мембраной ACE2 на клетках-хозяевах в легких, чтобы инициировать молекулярные события, которые в конечном итоге высвобождают вирусный геном внутриклеточно. Внеклеточный протеазный домен ACE2 ингибирует проникновение в клетки коронавирусов SARS и SARS-2, действуя как растворимая приманка для сайтов связывания с рецептором на S, и является ведущим кандидатом для терапевтической и профилактической разработки. Эффективность и технологичность ACE2 могут быть улучшены за счет мутаций, повышающих аффинность и экспрессию свернутого функционального белка. Настоящее изобретение решает эту проблему с помощью глубокого мутагенеза и селекции *in vitro*, при этом идентифицированы варианты ACE2 с повышенным связыванием с рецепторсвязывающим доменом S на клеточной поверхности. Мутации обнаруживаются на границе раздела белок-белок, а также в скрытых участках, где они могут усиливать

фолдинг и презентацию эпитопа взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения N90-гликан удален из ACE2, потому что он препятствует ассоциации с S. Мутационный профиль предлагает план создания высокоаффинных рецепторов ACE2 для решения этой беспрецедентной задачи. Раскрытые полипептиды ACE2 имеют преимущество, поскольку существует очень небольшой риск развития устойчивости SARS-CoV-2 или любого другого коронавируса, который связывает ACE2, к этим рецепторам-приманкам.

В настоящей заявке описаны полипептиды ACE2 (такие, как полипептиды ACE2 человека), которые обладают улучшенными свойствами связывания белка S CoV. В частности, в настоящей заявке предусмотрены модифицированные полипептиды ACE2, которые включают человеческий ACE2 или его фрагмент, такой как его внеклеточный фрагмент. Полипептиды включают по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с человеческим ACE2 дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (например, по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или более) аминокислотная замена выбрана из любой из замен, показанных в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (например, по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или более) аминокислотная замена выбрана из любой из замен, показанных в таблице 2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (например, по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или более) аминокислотная замена выбрана из любой из замен, показанных в таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в остатках 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 65, 69, 72, 75, 76, 79, 82, 89, 90, 91, 92, 324, 325, 330, 351, 386, 389, 393 и/или 518 человеческого ACE2 из SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды содержат только одну аминокислотную замену по сравнению с ACE2 человека дикого типа (SEQ ID NO: 1), такую как одна аминокислотная замена, указанная в таблице 1. В других примерах модифицированные полипептиды включают две, три, четыре, пять или более аминокислотных замен, таких как две, три, четыре, пять или более аминокислотных замен, перечисленных в таблице 1. В конкретных примерах модифицированный

полипептид включает только одну замену в остатке 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 65, 69, 72, 75, 76, 79, 82, 89, 90, 91, 92, 324, 325, 330, 351, 386, 389, 393 или 518 ACE2 человека из SEQ ID NO: 1. В других конкретных примерах модифицированный полипептид включает две, три, четыре, пять или более аминокислотных замен в остатках, выбранных из группы, состоящей из остатков 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 65, 69, 72, 75, 76, 79, 82, 89, 90, 91, 92, 324, 325, 330, 351, 386, 389, 393 или 518 ACE2 человека из SEQ ID NO: 1. В других примерах модифицированный полипептид включает комбинацию замен, перечисленных в таблице 4.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды представляют собой полноразмерные полипептиды ACE2 человека. В некоторых примерах аминокислотная последовательность полипептида по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8% или по меньшей мере на 99,9% идентична SEQ ID NO: 1 и включает по меньшей мере одну раскрытую в настоящей заявке аминокислотную замену.

В других вариантах осуществления модифицированные полипептиды состоят из внеклеточного фрагмента ACE2 человека. Например, модифицированный полипептид может состоять из полного внеклеточного протеазного домена ACE2 человека, например, из аминокислотных остатков 19-615 SEQ ID NO: 1, или модифицированные полипептиды могут состоять из части внеклеточного домена, такой как примерно 50 аминокислот, примерно 75 аминокислот, примерно 100 аминокислот, примерно 150 аминокислот, примерно 200 аминокислот, примерно 250 аминокислот, примерно 300 аминокислот, примерно 350 аминокислот, примерно 400 аминокислот, примерно 450 аминокислот, примерно 500 аминокислот, примерно 550 аминокислот или примерно 590 аминокислот из внеклеточного домена. В некоторых примерах аминокислотная последовательность внеклеточного фрагмента по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8% или по меньшей мере на 99,9% идентична остаткам с 19 по 615 SEQ ID NO: 1 и включают по меньшей мере одну

аминокислотную замену, описанную в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды состоят из фрагмента ACE2 человека. В некоторых примерах модифицированные полипептиды содержат примерно 50 аминокислот, примерно 75 аминокислот, примерно 100 аминокислот, примерно 150 аминокислот, примерно 200 аминокислот, примерно 250 аминокислот, примерно 300 аминокислот, примерно 350 аминокислот, примерно 400 аминокислот, примерно 450 аминокислот, примерно 500 аминокислот, примерно 550 аминокислот, примерно 590 аминокислот, примерно 596 аминокислот, примерно 600 аминокислот, примерно 650 аминокислот, примерно 700 аминокислот, примерно 714 аминокислот, примерно 722 аминокислоты, примерно 732 аминокислоты, примерно 740 аминокислот, примерно 750 аминокислот или примерно 800 аминокислот из SEQ ID NO: 1 и включают по меньшей мере одну аминокислотную замену, описанную в настоящей заявке. В конкретных неограничивающих примерах аминокислотная последовательность полипептида по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8% или по меньшей мере на 99,9% идентична фрагменту ACE2 человека, такому как остатки 1–732, 19–732 или 19–740 из SEQ ID NO: 1, и включает по меньшей мере одну аминокислотную замену, описанную в настоящей заявке. В конкретных примерах модифицированный полипептид состоит из аминокислотных остатков 1-732, 19-732 или 19-740 из SEQ ID NO: 1 и включает по меньшей мере одну аминокислотную замену, описанную в настоящей заявке.

В некоторых примерах модифицированный полипептид содержит: аминокислотные замены T27Y, L79T и N330Y; аминокислотные замены H34A, T92Q, Q325P и A386L; аминокислотные замены T27Y, L79T, N330Y и A386L; аминокислотные замены L79T, N330Y и A386L; аминокислотные замены T27Y, N330Y и A386L; аминокислотные замены T27Y, L79T и A386L; аминокислотные замены A25V, T27Y, T92Q, Q325P и A386L; аминокислотные замены H34A, L79T, N330Y и A386L; аминокислотные замены A25V, T92Q и A386L; или аминокислотные замены T27Y, Q42L, L79T, T92Q, Q325P, N330Y и A386L, где аминокислотные замены относятся к SEQ ID NO: 1.

Также предусмотрены димеры модифицированных полипептидов, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления димерный полипептид

включает остатки 1-732 или 19-732 из SEQ ID NO: 1 и по меньшей мере одну аминокислотную замену, описанную в настоящей заявке, такую как одна, две, три, четыре или пять аминокислотных замен. В некоторых примерах димер представляет собой димер варианта sACE2v.2.4, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

Также предложены слитые белки, которые включают модифицированный полипептид ACE2, описанный в настоящей заявке, и гетерологичный полипептид. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид представляет собой белок Fc, такой как белок Fc человека, например, Fc из IgG1 человека. В конкретных неограничивающих примерах гибридный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. В других вариантах осуществления гетерологичный полипептид представляет собой белок, который можно использовать в качестве диагностического/детектирующего реагента, такой как флуоресцентный белок (например, GFP) или фермент (например, щелочная фосфатаза, HRP или люцифераза). В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид представляет собой антитело или антигенсвязывающий белок для avidного связывания со вторым антигеном CoV. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид представляет собой антитело или антигенсвязывающий белок для связывания с клетками или клеточным окружением (например, для рекрутирования иммунных клеток). В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид представляет собой цитокин, лиганд или рецептор, вызывающий биологический ответ. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид представляет собой белок, увеличивающий время полужизни в сыворотке (например, Fc антитела или сывороточный альбумин).

Также предоставлены композиции, которые включают модифицированный полипептид ACE2 или его слитый белок, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид ACE2 или слитый белок готовят для интратрахеального или ингаляционного введения. Интратрахеальные или ингаляционные препараты могут быть жидкими (например, растворы или суспензии) и включать аэрозоли, спреи, аэрозоли и т.п. В конкретных примерах композиция приготовлена для введения с помощью небулайзера. В других вариантах осуществления модифицированный полипептид ACE2 или слитый белок готовят для внутривенного введения.

Кроме того, предложен способ ингибирования репликации CoV *in vitro* путем контакта CoV с модифицированным полипептидом ACE2 или слитым белком, описанным в настоящей заявке. В некоторых примерах инфицированные CoV клетки (такие как культивируемые клеточные линии или первичные клетки) контактируют с

модифицированным полипептидом ACE2, например, для проверки влияния модифицированного полипептида на репликацию CoV.

Также предлагаются способы ингибирования репликации и/или распространения CoV у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида ACE2, слитого белка или композиции, описанных в настоящей заявке. Также обеспечивается способ лечения инфекции CoV (например, COVID-19 или SARS) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида ACE2, слитого белка или композиции, описанных в настоящей заявке. В некоторых примерах субъект является пожилым или имеет основное заболевание (такое как заболевание сердца, заболевание легких, ожирение или диабет). В некоторых примерах у субъекта отмечается COVID-19. В некоторых примерах субъектом является медицинский работник. В некоторых примерах модифицированный полипептид ACE вводят внутривенно. В других примерах модифицированный полипептид ACE вводят интратрахеально (и/т) или путем ингаляции (например, с помощью небулайзера). В конкретных неограничивающих примерах модифицированный полипептид ACE2, слитый белок или композицию вводят по меньшей мере двумя путями, такими как в/в и и/т, или в/в и ингаляцией. Другие пути введения в легкие или дыхательные пути включают бронхиальный, интраназальный или другие ингаляционные пути, такие как прямая инстилляционная в назотрахеальные или эндотрахеальные трубки у интубированных пациентов. В конкретных неограничивающих примерах аминокислотная последовательность модифицированного полипептида ACE2 состоит из SEQ ID NO: 10, или аминокислотная последовательность слитого белка включает или состоит из SEQ ID NO: 11.

Также предложен способ профилактического лечения (например, предотвращения) инфекции CoV у субъекта, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества модифицированного полипептида ACE2, слитого белка или композиции, описанных в настоящей заявке. Профилактическое лечение включает как доконтактную профилактику, так и постконтактную профилактику. В некоторых примерах субъект является пожилым или имеет основное заболевание. В некоторых примерах основным заболеванием является заболевание сердца, заболевание легких, ожирение или диабет. В некоторых примерах субъект контактировал с пациентами с COVID-19. В некоторых примерах субъектом является медицинский работник. В некоторых примерах модифицированный полипептид ACE вводят внутривенно. В других примерах модифицированный полипептид ACE вводят интратрахеально или путем

ингаляции (например, с помощью небулайзера). Другие пути введения в легкие или дыхательные пути включают бронхиальный, интраназальный или другие ингаляционные пути, такие как прямая инстилляционная в назо-трахеальные или эндотрахеальные трубки у интубированных пациентов. В конкретных неограничивающих примерах аминокислотная последовательность модифицированного полипептида ACE2 состоит из SEQ ID NO: 10, или аминокислотная последовательность слитого белка включает или состоит из SEQ ID NO: 11.

В некоторых примерах профилактического лечения лечение включает доконтактную профилактику. Например, субъекту, находящемуся в среде высокого риска, такому как медицинский работник или основной работник, можно вводить модифицированный полипептид ACE, слитый белок или их композицию, чтобы снизить риск заражения SARS-CoV-2 и/или развития COVID-19. В конкретных неограничивающих примерах доконтактное профилактическое лечение включает введение полипептида, слитого белка или композиции интратрахеально или путем ингаляции (например, с помощью небулайзера).

В некоторых примерах профилактической терапии лечение включает постконтактную профилактику. В способе этого типа субъекту вводят модифицированный полипептид ACE, слитый белок или их композицию сразу же или вскоре после контакта с SARS-CoV-2, например, в течение 2 часов, 4 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов, 20 часов или 24 часа. В конкретных неограничивающих примерах постконтактное профилактическое лечение включает введение полипептида, слитого белка или композиции интратрахеально или путем ингаляции (например, с помощью небулайзера).

Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты и векторы, которые кодируют модифицированный полипептид ACE2 или слитый белок, описанный в настоящей заявке. В некоторых примерах молекулы нуклеиновой кислоты и векторы имеют иную частоту использования кодонов, или кодоны могут быть оптимизированы для экспрессии в конкретных типах клеток, таких как клетки млекопитающих. В некоторых примерах молекулы нуклеиновой кислоты и векторы несут природные человеческие полиморфизмы.

Кроме того, предусмотрены композиции, которые включают молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, раскрытые в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, предлагаются способы ингибирования репликации и/или распространения CoV у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества (или профилактически эффективного количества для доконтактных и

постконтактных способов профилактики) молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или композиции, раскрытых в настоящей заявке. Кроме того, предлагаются способы лечения CoV-инфекции у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или композиции, описанных в настоящей заявке. В некоторых примерах нуклеиновую кислоту или вектор вводят внутривенно. В других примерах нуклеиновую кислоту или вектор вводят интратрахеально или путем ингаляции (например, с помощью небулайзера). В конкретных неограничивающих вариантах осуществления нуклеиновую кислоту или вектор вводят по меньшей мере двумя путями, такими как в/в и и/т, или в/в и ингаляция. Другие пути введения в легкие или дыхательные пути включают бронхиальный, интраназальный или другие ингаляционные пути, такие как прямая инстилляционная в назо-трахеальные или эндотрахеальные трубки у интубированных пациентов. В некоторых примерах субъект является пожилым или имеет основное заболевание (такое как заболевание сердца, заболевание легких, ожирение или диабет). В некоторых примерах у субъекта отмечается COVID-19. В некоторых примерах субъектом является медицинский работник.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят одну или несколько доз модифицированного полипептида ACE2, слитого белка, нуклеиновой кислоты или композиции, описанных в настоящей заявке. Например, субъекту можно вводить одну или более, две или более, три или более, четыре или более, или пять или более доз, например, два раза в день, один раз в день, через день, два раза в неделю, один раз в неделю, или один раз в месяц. Специалист в данной области техники может выбрать подходящее количество доз и время введения на основе таких факторов, как субъект, которого лечат, состояние субъекта и сопутствующие заболевания.

В настоящей заявке также представлены способы детекции CoV в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение контакта биологического образца с модифицированным полипептидом или слитым белком, описанным в настоящей заявке; и детекцию связывания модифицированного полипептида или слитого белка с биологическим образцом. В некоторых примерах биологический образец представляет собой образец крови, слюны, мокроты, мазка из носа или бронхоальвеолярного лаважа.

В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящей заявке, коронавирус представляет собой любой коронавирус человека или животного, который использует ACE2 в качестве рецептора входа, включая новые штаммы коронавируса. В некоторых примерах коронавирус представляет собой человеческий коронавирус. В конкретных примерах человеческий коронавирус представляет собой SARS-CoV, SARS-

CoV-2, MERS-CoV, человеческий коронавирус HKU1 (HKU1-CoV), человеческий коронавирус OC43 (OC43-CoV), человеческий коронавирус 229E (229E-CoV) или человеческий коронавирус NL63 (NL63-CoV). В других примерах коронавирус представляет собой зоонозный коронавирус, такой как зоонозный коронавирус, который может передаваться и заражать людей. В конкретных примерах коронавирус представляет собой коронавирус летучих мышей или коронавирус грызунов. В конкретных неограничивающих примерах коронавирус летучих мышей представляет собой LYRa11, Rs4231, Rs7327, Rs4084 или RsSHC014.

Кроме того, предусмотрены наборы, которые включают модифицированный полипептид или слитый белок, раскрытые в настоящей заявке, связанные с твердой подложкой.

Следующие примеры приведены для иллюстрации некоторых конкретных признаков и/или вариантов осуществления. Эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие изобретение конкретными описанными признаками или вариантами осуществления.

Пример 1

Поскольку человеческий ACE2 не эволюционировал для распознавания S SARS-CoV-2, было высказано предположение, что могут быть обнаружены мутации, которые повышают аффинность к терапевтическим и диагностическим применениям. Кодированная последовательность полноразмерного ACE2 с N-концевой меткой эпитопа с-тус была диверсифицирована путем введения вырожденных кодонов для создания библиотеки, содержащей все возможные замены одиночных аминокислот в 117 сайтах, охватывающих всю площадь контакта с S и выстилающих субстратсвязывающую полость. Связывание S не зависит от каталитической активности ACE2 (Moore et al., J Virol; 2004 Oct; 78(19):10628–10635) и происходит на внешней поверхности ACE2 (Yan et al., Science. 2020 Mar 4; eabb2762; Li et al., Science. 2005 Sep 16;309(5742):1864–1868), тогда как ангиотензиновые субстраты связываются внутри глубокого кармана, в котором находится активный центр (Towler et al., J Biol Chem; 2004 Apr 23; 279(17):17996–18007). Таким образом, замены в кармане ACE2, связывающем субстрат, действуют как элементы управления, которые, как ожидается, окажут минимальное влияние на взаимодействия с S, но могут быть полезны для разработки аффинности к субстрату для повышения безопасности *in vivo*. Однако преимущества каталитически неактивного sACE2 для лечения COVID-19 были поставлены под сомнение (Kruse, F1000Res; 2020; 9(72):72).

Библиотека ACE2 была временно экспрессирована в клетках Expi293F человека в условиях, которые обычно дают не более одного кодирующего варианта на клетку, что

обеспечивает тесную связь между генотипом и фенотипом (Heredia et al., J Immunol; 2018 Apr 20; 200(11): ji1800343–3839; Park et al., J Biol Chem, 2019;294(13):4759–4774). Затем клетки инкубировали со средой, содержащей RBD (а.о. 333-529 SEQ ID NO: 2) из SARS-CoV-2, гибридизированный на С-конце с суперфолдером GFP (sfGFP: (Pédélec et al., Nat Biotechnol. 2006 Jan;24(1):79–88)) (фиг. 1А), в субнасыщенном разведении. Уровни связанного S-RBD-sfGFP коррелируют с уровнями поверхностной экспрессии меченого ACE2, измеренного с помощью двухцветной проточной цитометрии. По сравнению с клетками, экспрессирующими ACE2 дикого типа (фиг. 1С), многие варианты в библиотеке ACE2 не смогли связать S-RBD, в то время как оказалось меньше вариантов ACE2 с более высокими сигналами связывания (фиг. 1D). Клетки, экспрессирующие варианты ACE2 с высоким или низким уровнем связывания с S-RBD, были собраны с помощью метода анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), и обозначены как отсортированные популяции «nCoV-S-High» и «nCoV-S-Low», соответственно. При FACS сигнал флуоресценции для связанного S-RBD-sfGFP постоянно снижался, что требовало регулярного обновления собранных гейтов, чтобы «не терять из вида» соответствующие популяции. Это согласуется с диссоциацией S-RBD в течение нескольких часов во время эксперимента. Зарегистрированные аффинности S-RBD к ACE2 находятся в диапазоне от 1 до 15 нМ (Walls et al., Cell. 2020 Mar 6; 181(2):281-292.e6; Wrapp et al., Science. 2020 Feb 19: eabb2507).

Транскрипты в отсортированных популяциях были подвергнуты глубокому секвенированию, и частоты вариантов сравнивали с библиотекой наивных плазмид для расчета обогащения или истощения всех 2340 кодирующих мутаций в библиотеке (фиг. 2). Этот подход к отслеживанию селекции или эволюции *in vitro* путем глубокого секвенирования известен как глубокий мутагенез (Fowler and Fields, Nat Methods. 2014 Aug; 11(8):801–807). Коэффициенты обогащения (фиг. 3А и 3В) и показатели консервативности остатков (фиг. 3D и 3Е) хорошо согласуются между двумя независимыми экспериментами по сортировке, что дает уверенность в данных. По большей части коэффициенты обогащения (фиг. 3С) и показатели консервативности (фиг. 3F) в популяциях nCoV-S-High показывали отрицательную корреляцию с популяциями nCoV-S-Low, за исключением нонсенс-мутаций, которые были соответствующим образом истощены из обоих ворот. Это указывает на то, что большинство, но не все несинонимичные мутации в ACE2 не устраняют поверхностную экспрессию. Библиотека была смещена в сторону остатков, подверженных воздействию растворителя, и имеет несколько замен скрытых гидрофобных остатков, которые могут оказывать большее влияние на перенос через плазматическую мембрану (Park et al., J Biol Chem; 2019; 294

(13): 4759–4774).

Сопоставление экспериментальных показателей консервативности популяций nCoV-S-High со структурой ACE2, связанного с S-RBD (Yan et al., Science. 2020 Mar 4; :eabb2762), показало, что остатки в зоне взаимодействия, имеют тенденцию к консервативности, тогда как остатки на периферии зоны взаимодействия или в кармане, связывающем субстрат, были мутационно толерантными (фиг. 4А). Область ACE2, окружающая С-конец спирали ACE2 $\alpha 1$ и нити $\beta 3$ - $\beta 4$, имеет слабую толерантность к полярным остаткам, в то время как аминокислоты на N-конце $\alpha 1$ и С-конце $\alpha 2$ предпочтительно являются гидрофобными (фиг. 4В), вероятно, отчасти для сохранения гидрофобной упаковки между $\alpha 1$ - $\alpha 2$. Эти дискретные участки контактируют с глобулярной складкой RBD и длинной выступающей петлей RBD, соответственно.

Два остатка ACE2, N90 и T92, которые вместе образуют консенсусный мотив N-гликозилирования, представляют собой заметные горячие точки для обогащенных мутаций (фиг. 2 и 4А). Действительно, все замены N90 и T92, за исключением T92S, который поддерживает N-гликан, очень благоприятны для связывания S-RBD, и, таким образом, предполагается, что N90-гликан частично препятствует взаимодействию S/ACE2.

Анализ данных выявил множество мутаций ACE2, которые улучшали связывание S-RBD. Например, в библиотеке было 122 мутации в 35 положениях, которые имели Log₂ коэффициенты обогащения >1,5 в популяции nCoV-S-High. В таблице 1 перечислены эти мутации. В таблице 2 перечислены мутации с log₂ коэффициентом обогащения >2,0. В таблице 3 перечислены мутации с log₂ коэффициентом обогащения >2,5.

По меньшей мере дюжина мутаций ACE2 на структурно охарактеризованной границе раздела усиливает связывание S-RBD и может быть полезна для разработки высокоспецифичных и прочных связывающих агентов для S SARS-CoV-2, особенно для диагностики по месту оказания медицинской помощи. Молекулярную основу того, как некоторые из этих мутаций усиливают связывание S-RBD, можно объяснить на основе крио-ЭМ-структуры, связанной с S-RBD (фиг. 4С): гидрофобные замены ACE2-T27 увеличивают гидрофобную упаковку за счет ароматических остатков S-RBD, ACE2-D30E удлиняет кислотную боковую цепь для достижения S-RBD-K417, а ароматические замены ACE2-K31 вносят вклад в межфазный кластер ароматических остатков. Однако сконструированные рецепторы ACE2 с мутациями в зоне взаимодействия могут представлять связывающие эпитопы, которые достаточно отличаются от природного ACE2, что может привести к появлению мутантов, способствующих уклонению вируса, или они могут быть штаммоспецифичными и не иметь распространения. Вместо этого внимание было привлечено к мутациям во второй оболочке, а также тем, которые не

контактируют напрямую с S-RBD, но вместо этого играют предполагаемые структурные роли. Например, замены пролина часто встречались в пяти положениях библиотеки (S19, L91, T92, T324 и Q325), где они могли бы энтропийно стабилизировать первые витки спиралей. Пролин также был часто встречался в H34, где он может усилить центральную выпуклость в $\alpha 1$. Множественные мутации также часто встречались в скрытых положениях, где они изменяют локальную упаковку (например, A25V, L29F, W69V, F72Y и L351F). Таким образом, отбор вариантов ACE2 по высокому сигналу связывания свидетельствует не только об аффинности, но и о презентации на мембране свернутой структуры, распознаваемой S SARS-CoV-2. Наличие часто встречающихся структурных мутаций в профиле последовательностей особенно заметно, учитывая то, что библиотека ACE2 была смещена в сторону положений, подверженных воздействию растворителя.

Таблица 1. Мутации ACE2 с сигналами усиленного связывания с S SARS-CoV-2.

Log2 коэффициенты обогащения при селекции >1,5

S19P	H34A	E75T	N90I	T92Q	R393K
R23F	I134S	E75K	N90V	T92D	R510G
Q24T	H34P	E75R	N90A	T92E	
A25V	E35V	E75W	N90S	T92K	
K26I	E35C	E75G	N90T	T92R	
K26A	L39K	Q76M	N90Q	T92H	
K26D	L39R	Q76I	N90D	T92W	
T27M	F40D	Q76V	N90E	T92Y	
T27I	F40R	Q76T	N90K	T92F	
T27A	Y41R	Q76R	N90R	T92P	
T27D	Q42M	Q76Y	N90H	T92G	
T27K	Q42L	L79I	N90W	T92C	
T27H	Q42I	L79V	N90Y	T324E	
T27W	Q42V	L79T	N90F	T324P	
T27Y	Q42K	L79W	N90P	Q325P	
T27F	Q42C	L79Y	N90G	N330L	
T27C	A65W	L79F	N90C	N330H	
L29F	W69I	L79P	L91P	N330W	
D30I	W69V	M82C	T92M	N330Y	
D30E	I69T	Q89I	T92L	N330F	
K31W	I69K	Q89D	T92I	L351P	
K31Y	F72Y	Q89P	T92V	A386L	
N33D	E75A	N90M	T92A	A386I	
H34V	E75S	N90L	T92N	P389D	

Таблица 2. Мутации ACE2 с сигналами усиленного связывания с S SARS-CoV-2.

Log2 коэффициенты обогащения при селекции >2,0

S19P	L39K	L79F	N90G	T92Y
A25V	L39R	Q89P	N90C	T92F
T27M	Q42M	N90M	L91P	T92P
T27L	Q42L	N90L	T92M	T92G
T27A	Q42C	N90I	T92L	T92C
T27D	W69V	N90V	T92I	T324E
T27H	F72Y	N90A	T92V	T324P
T27W	E75K	N90S	T92A	Q325P
T27Y	E75R	N90T	T92N	N330L
T27F	Q76V	N90Q	T92Q	N330H
T27C	Q76T	N90D	T92D	N330W
D30E	L79I	N90E	T92E	N330Y
K31W	L79V	N90K	T92K	N330F
H34V	L79T	N90R	T92R	L351F
H34A	L79W	N90H	T92H	A386L
H34P	L79Y	N90P	T92W	

Таблица 3. Мутации ACE2 с сигналами усиленного связывания с S SARS-CoV-2.

Log2 коэффициенты обогащения при селекции >2,5

A25V	L79I	N90E	T92E	N330H
T27M	L79V	N90H	T92R	N330W
T27L	L79T	L91P	T92H	N330Y
T27Y	L79W	T92M	T92W	N330F
K31W	L79Y	T92L	T92Y	A386L
H34V	L79F	T92I	T92F	
H34A	N90A	T92V	T92G	
H34P	N90S	T92N	T92C	
Q42L	N90T	T92Q	T324P	
Q42C	N90Q	T92D	Q325P	

Пример 2

Тридцать одиночных замен, часто встречающихся в популяции nCoV-S-High, были проверены с помощью направленного мутагенеза (фиг. 5). Связывание RBD-sfGFP с полноразмерными мутантами ACE2 увеличивалось по сравнению с диким типом, однако улучшения были небольшими и были наиболее очевидными на клетках, экспрессирующих низкие уровни ACE2 (фиг. 5A). Различия в экспрессии ACE2 между мутантами также коррелировали с общими уровнями связанного RBD-sfGFP (фиг. 5C), демонстрируя, насколько осторожно следует интерпретировать данные глубокого мутационного сканирования, поскольку мутации могут влиять как на активность, так и на экспрессию. Для быстрой оценки мутаций в формате, более подходящем для терапевтической

разработки, протеазный домен растворимого ACE2 был слит с sfGFP. Уровни экспрессии sACE2-sfGFP качественно оценивали по флуоресценции трансфицированных культур (фиг. 6A), а связывание sACE2-sfGFP с полноразмерным S, экспрессируемым на плазматической мембране, измеряли с помощью проточной цитометрии (фиг. 6B). Единственная замена (T92Q), которая устраняет гликан N90, давала небольшое увеличение сигнала связывания (фиг. 6B), что было подтверждено анализом очищенного белка (фиг. 12). Если сосредоточить внимание на наиболее часто встречающихся (обогащенных) заменах при отборе на связывание S, которые также были пространственно разделены для минимизации отрицательного эпистаза (Heredia et al., J Virol 93(11): e00219-19, 2019), то комбинации мутаций в sACE2 давали значительное увеличение в связывании S (таблица 4 и фиг. 6B). Хотя этот анализ позволяет определить только относительные различия, комбинаторные мутанты обладают усиленным связыванием по меньшей мере на порядок. Неисследованные комбинации мутаций могут иметь еще больший эффект.

Таблица 4. Комбинаторные мутанты sACE2

Вариант	Мутации
sACE2.v1	H34A, T92Q, Q325P, A386L
sACE2.v2	T27Y, L79T, N330Y, A386L
sACE2.v2.1	L79T, N330Y, A386L
sACE2.v2.2	T27Y, N330Y, A386L
sACE2.v2.3	T27Y, L79T, A386L
sACE2.v2.4	T27Y, L79T, N330Y
sACE2.v3	A25V, T27Y, T92Q, Q325P, A386L
sACE2.v4	H34A, L79T, N330Y, A386L
sACE2.v5	A25V, T92Q, A386L
sACE2.v6	T27Y, Q42L, L79T, T92Q, Q325P, N330Y, A386L

Единственный вариант, sACE2.v2, был выбран для очистки и дальнейшей характеристики (фиг. 7). Этот вариант был выбран потому, что он хорошо экспрессировался при слиянии с sfGFP и сохраняет N90-гликан, и, следовательно, будет представлять поверхность, которая более точно соответствует нативному sACE2, чтобы минимизировать иммуногенность. Выход sACE2.v2 был ниже, чем у белка дикого типа, при очистке в виде белка, меченного 8his (на 20% ниже) или в виде слитого белка IgG1-Fc (на 60% ниже), а с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) было обнаружено, что фракция sACE2.v2 агрегирует после инкубации при 37°C в течение 40 часов (фиг. 7D). В остальном sACE2.v2 не отличался от дикого типа при проведении SEC (фиг. 7C).

В экспериментах по проточной цитометрии с использованием очищенного 8his-меченого sACE2 было обнаружено, что только sACE2.v2-8h прочно связывается с полноразмерным S на клеточной поверхности, что позволяет предположить, что sACE2

дикого типа имеет высокую скорость диссоциации, которая вызывает диссоциацию во время промывания образца (фиг. 8А и фиг. 13). Различия между диким типом и вариантом были менее выражены в контексте слитого белка IgG1-Fc (фиг. 8А и фиг. 13), что указывает на то, что авидность маскирует усиление связывания мутанта, что еще раз указывает на наличие различий в скорости диссоциации между диким типом и вариантом sACE2. Растворимый ACE2.v2-8h превосходит sACE2-IgG1 дикого типа в связывании с S-экспрессирующими клетками, при этом sACE2-8h дикого типа не превосходит sACE2-IgG1 даже при 10-кратно повышенных концентрациях (фиг. 8В). Кроме того, только сконструированный sACE2.v2-8h эффективно конкурировал с анти-RBD IgG в сыворотке трех выздоровевших пациентов с COVID-19 при тестировании с помощью ИФА (фиг. 8Е). Это согласуется с исследованиями, показывающими, что, хотя sACE2 очень эффективно ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клеточных линиях и органоидах, требуются чрезвычайно высокие концентрации (Monteil et al., Cell DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.004:1–28, 2020). С помощью биослойной интерферометрии (BLI) было обнаружено, что sACE2.v2 обладает в 65 раз большей аффинностью, чем белок дикого типа, к иммобилизованному RBD, почти полностью из-за более медленной диссоциации (таблица 5 и фиг. 8С и 8D).

Таблица 5. Сводные данные по кинетике согласно биослойной интерферометрии (BLI)

Растворимое анализируемое вещество	Иммобилизованный лиганд	k_a ($M^{-1} c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	K_D
sACE2(WT)-8h	RBD-IgG1	$7,1/8,1 \times 10^4$	$1,1/1,1 \times 10^{-2}$	140/150 нМ
sACE2-T92Q-8h	RBD-IgG1	$1,0 \times 10^5$	$8,2 \times 10^{-3}$	80 нМ
sACE2.v2-8h	RBD-IgG1	$1,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{-4}$	2,3 нМ
sACE2.v2.2-8h	RBD-IgG1	$1,3 \times 10^5$	$8,3 \times 10^{-4}$	6,2 нМ
sACE2.v2.4-8h	RBD-IgG1	$1,4 \times 10^5$	$5,4 \times 10^{-4}$	3,8 нМ
sACE2 ₂ (WT)-8h	RBD-IgG1	$9,5 \times 10^4$	ND	ND
sACE2 ₂ .v2.4-8h	RBD-IgG1	$1,5 \times 10^5$	ND	ND
sACE2 ₂ .v2.4 (CHO-S)	RBD-IgG1	$2,0 \times 10^5$	ND	ND
RBD-8h	sACE2 ₂ (WT)-IgG1	$2,8 \times 10^5$	$6,0 \times 10^{-3}$	22 нМ
RBD-8h	sACE2 ₂ .v2-IgG1	$5,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-4}$	0,2 нМ
RBD-8h	sACE2 ₂ .v2.4-IgG1	$5,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-4}$	0,6 нМ

Все измерения проводили с использованием захвата белков, слитых с IgG1(Fc), поверхностью биосенсора, нацеленного на IgG Fc человека.

Для каждого эксперимента использовали 3-4 концентрации анализируемого вещества.

ND - не определено.

Во всех экспериментах независимо от того, был ли ACE2 очищен в виде 8his-меченого белка или использован в виде слитого белка sfGFP в экспрессионной среде,

экспрессировался ли полноразмерный S на плазматической мембране, или выделенный RBD был иммобилизован на поверхности биосенсора, охарактеризованный вариант sACE2.v2 последовательно демонстрировал на один-два порядка более прочное связывание. Эти эксперименты подтверждают ключевой результат глубокого мутагенеза, заключающийся в том, что существуют мутации в человеческом ACE2, которые увеличивают связывание с S SARS-CoV-2.

Что касается сниженной экспрессии sACE2.v2, было выдвинуто предположение, что мутационная нагрузка является слишком высокой. В конструкциях второго поколения каждую из четырех мутаций в sACE2.v2 меняли обратно на характерную для дикого типа (таблица 4), и было обнаружено, что связывание с полноразмерным S на поверхности клетки остается прочным (фиг. 9A). Один из вариантов (sACE2.v2.4 с мутациями T27Y, L79T и N330Y) был очищен с еще более высокими выходами, чем дикий тип, и показал сильное наномолярное связывание с RBD (фиг. 9).

Конструкция ACE2 была удлинена, чтобы включить шеечный/димеризационный домен, с получением стабильного димера (фиг. 10A), обозначаемого здесь как sACE2₂, который с высокой авидностью связывается с S на клеточной поверхности или с иммобилизованным RBD на биосенсоре (фиг. 14). По сравнению с диким типом димерный sACE2₂.v2.4 более эффективно конкурирует с антителами IgG, присутствующими в сыворотке выздоровевших пациентов (фиг. 10B). Путем иммобилизации sACE2₂-IgG1 (фиг. 15) на поверхности биосенсора и инкубации с мономерным RBD-8h в качестве анализируемого вещества было определено, что K_D RBD для sACE2₂ дикого типа составляет 22 нМ (фиг. 10C), что хорошо согласуется с предыдущими сообщениями (Wrapp et al., Science, eabb2507, 2020; Shang et al., Nature. 382, 1199, 2020), тогда как sACE2₂.v2.4 связывался с авидностью 600 пМ (фиг. 10D). Это выгодно выделяется на фоне недавно изолированных моноклональных антител (Pinto et al., Nature doi:10.1038/s41586-020-2349-y, 2020; Hansen et al., Science, eabd0827, 2020; Brouwer et al., Science, eabc5902, 2020); Wec et al., Science, eabc7424, 2020; Wang et al., Nat Commun. 11, 2251, 2020; Wu et al., Science. 368, 1274, 2020; Rogers et al., Science, eabc7520, 2020).

Эффективность мономерного sACE2.v2.4 в нейтрализации инфекции SARS-CoV-2 культивируемых клеток VeroE6 превышала эффективность белка дикого типа почти на два порядка (фиг. 11), что согласуется с данными биохимического связывания. Димерный sACE2₂ дикого типа сам по себе на два порядка более эффективен, чем мономер, что указывает на сильные авидные взаимодействия с шипом на поверхности вириона, а димер sACE2₂.v2.4 еще более эффективен и характеризуется субнаномолярным значением IC₅₀

(фиг. 11). Димерный sACE2.v2.4 также эффективно нейтрализует SARS-CoV-1 (фиг. 11), несмотря на то, что в процессе разработки не брали в расчет структуру или последовательность S SARS-CoV-1, и возможно, что рецептор-приманка будет нейтрализовать различные коронавирусы, использующие ACE2, которые еще не попали к человеку.

Для повышения безопасности немеченый sACE2.v2.4 был получен в клетках EpxiCHO-S (фиг. 16A), и было обнаружено, что он стабилен после инкубации при 37°C в течение 6 дней (фиг. 16B). Белок конкурирует с sACE2-IgG1 дикого типа за экспрессируемый клеткой S (фиг. 16C) и с высокой авидностью связывается с иммобилизованным RBD (фиг. 16D). В дополнение к ингибированию проникновения вируса рекомбинантный sACE2 может иметь второй терапевтический механизм: протеолиз ангиотензина II (вазоконстрикторного пептидного гормона) для облегчения симптомов респираторного дистресса (Imai et al., *Nature*. 436, 112–116, 2005; Trembl et al., *Crit. Care Med.*, 38, 596–601, 2010). Растворимый ACE2.v2.4 оказался каталитически активным, хотя и с пониженной активностью (фиг. 17).

В то время как глубокий мутагенез вирусных белков реплицирующихся вирусов широко изучался, чтобы понять механизмы уклонения от лекарств и антител, данная работа показывает, как глубокий мутагенез может быть непосредственно применим к терапевтическому дизайну, когда метод селекции отличен от репликации вируса и сосредоточен на факторах хозяина. С поразительной скоростью научное сообщество определило несколько кандидатов для лечения COVID-19, особенно моноклональные антитела с исключительной аффинностью к белку S. Исследования, раскрытые в настоящей заявке, показывают, как сопоставимую аффинность можно сконструировать в натуральном рецепторе вируса, а также обеспечить понимание молекулярной основы начальных взаимодействий вирус-хозяин.

Пример 3

Материалы и методы

Плазмиды. Зрелый полипептид (а.о. 19-805) человеческого ACE2 (GenBank NM_021804.1) клонировали в сайты NheI-XhoI pCEP4 (Invitrogen) с N-концевым НА-лидером (MKTIILSYIFCLVFA), мус-меткой и линкером (GSPGGA). Растворимый ACE2, слитый с суперфолдером GFP (Pédélecq et al., *Nat. Biotechnol.* 24, 79–88, 2006), был сконструирован путем генетического присоединения протеазного домена (а.о. 1-615) ACE2 к sfGFP (GenBank ASL68970) через линкер, богатый Гли/Сер (GSGGSGSGG), и вставки между сайтами NheI-XhoI pCDNA3.1(+) (Invitrogen). Эквивалентные конструкции sACE2 клонировали с линкером GSG и 8-гистидиновой меткой или линкером GS и Fc-

областью IgG1 (а.о. D221-K447), помимо того, что димерные конструкции sACE2₂ включали а.о.1-732, в остальном они были идентичны. Синтетический кодоноптоимизированный фрагмент гена человека (Integrated DNA Technologies) для RBD (а.о. 333-529) S SARS-CoV-2 (GenBank YP_009724390.1) был слит на N-конце с НА-лидером, а на С-конце - с суперфолдером-GFP, Fc-областью IgG1 или меткой из 8 гистидинов. Собранные фрагменты ДНК лигировали в сайты *NheI-XhoI* pCDNA3.1(+). Оптимизированный человеческими кодонами полноразмерный S был субклонирован из pUC57-2019-nCoV-S(Human) (Molecular Cloud), как без метки (аминокислотные остатки 1-1273), так и с N-концевым НА-лидером (MKTIIALSYIFCLVFA), мус-меткой и линкером (GSPGGA) выше зрелого полипептида (а.о. 16-1273).

Культура тканей. Клетки Expi293F (ThermoFisher) культивировали в экспрессионной среде Expi293 (ThermoFisher) при 125 об/мин, 8% CO₂, 37°C. Для продукции RBD-sfGFP, RBD-IgG1, sACE2-8h и sACE2-IgG1 готовили клетки до 2×10⁶/мл. На 1 мл культуры 500 нг плазмиды и 3 мкг полиэтиленimina (MM 25000; Polysciences) смешивали со 100 мкл OptiMEM (Gibco), инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре и добавляли к клеткам. Усилители трансфекции (ThermoFisher) добавляли через 18-23 часов после трансфекции, и клетки культивировали в течение 4-5 дней. Клетки удаляли центрифугированием при 800 g в течение 5 минут, и среду хранили при -20°C. После размораживания и непосредственно перед использованием оставшийся клеточный детрит и осадки удаляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 минут. Плазмиды для экспрессии белка sACE2-sfGFP трансфицировали в клетки Expi293F с использованием ExpiFectamine (ThermoFisher) в соответствии с инструкциями производителя, с добавлением усилителей трансфекции через 22-1/2 часа после трансфекции, а надосадочную жидкость собирали через 60 часов.

Глубокий мутагенез. 117 остатков в протеазном домене ACE2 диверсифицировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами (Procko et al., J. Mol. Biol. 425, 3563–3575, 2013) с использованием праймеров с вырожденными кодонами NNK. Библиотеку плазмид трансфицировали в клетки Expi293F с использованием экспифектамина в условиях, которые, как ранее было показано, обычно дают не более одного кодирующего варианта на клетку (Heredia et al., J. Immunol. 200, j1800343–3839, 2018; Park et al., J Biol Chem 294, 4759–4774, 2019); 1 нг кодирующей плазмиды разбавляли 1500 нг плазмиды-носителя pSER4-ΔCMV на 1 мл клеточной культуры в концентрации 2×10⁶/мл, и среду заменяли через 2 часа после трансфекции. Клетки собирали через 24 часа, промывали охлажденным на льду ФСБ с добавлением 0,2% бычьего сывороточного альбумина (ФСБ-БСА) и инкубировали в течение 30 минут на льду с разведением 1/20 (повтор 1) или 1/40

(повтор 2) среды, содержащей RBD-sfGFP, в ФСБ-БСА. Клетки совместно окрашивали анти-мус Alexa 647 (клон 9B11, разведение 1/250; Cell Signaling Technology). Клетки дважды промывали ФСБ-БСА и сортировали на BD FACS Aria II в Центре биотехнологии Роя Дж. Карвера. Основную клеточную популяцию отделяли с помощью прямого/бокового светорассеяния для удаления детрита и дублетов, и к образцу добавляли 4',6-диамидин-2-фенилиндола (DAPI) для исключения мертвых клеток. Из мус-позитивной (Alexa 647) популяции было выделено 67% с максимальной флуоресценцией (фиг. 1B). Из них собирали 15% клеток с самой высокой и 20% клеток с самой низкой флуоресценцией GFP (фиг. 1D) в пробирки, которые были покрыты в течение ночи эмбриональной телячьей сывороткой и содержали экспрессионную среду Expi293. Общую РНК экстрагировали из собранных клеток с использованием набора для очистки РНК GeneJET (Thermo Scientific), а кДНК подвергали обратной транскрипции с помощью высокоточного Accuscript (Agilent), праймированного геноспецифическими олигонуклеотидами. Разнообразные области ACE2 амплифицировали с помощью ПЦР в виде 5 фрагментов. Фланкирующие последовательности на праймерах добавляли адаптеры к концам продуктов для отжига с праймерами для секвенирования Illumina уникального штрихкодирования и для связывания в проточной ячейке. Ампликоны секвенировали на Illumina NovaSeq 6000 с использованием протокола парных концов 2×250 нуклеотидов. Данные анализировали с использованием Enrich (Fowler et al., *Bioinformatics*. 27, 3430–3431, 2011), а команды представлены в депозите GEO. Вкратце, частоты вариантов ACE2 в транскриптах отсортированных популяций сравнивали с их частотами в библиотеке наивных плазмид для расчета \log_2 коэффициента обогащения, а затем нормализовали с помощью того же расчета для дикого типа. Последовательности дикого типа не были по существу ни обогащены, ни истощены, и имели \log_2 коэффициенты обогащения от -0,2 до +0,2.

Анализ связывания ACE2-S посредством проточной цитометрии. Клетки Expi293F трансфицировали плазмидами pcDNA3-мус-ACE2, pcDNA3-мус-S или pcDNA3-S (500 нг ДНК на мл культуры при 2×10^6 /мл) с использованием экспифектамина (ThermoFisher). Клетки анализировали методом проточной цитометрии через 24 часа после трансфекции. Для анализа связывания RBD-sfGFP с полноразмерным мус-ACE2 клетки промывали охлажденным на льду ФСБ-БСА и инкубировали в течение 30 минут на льду с разведением 1/30 среды, содержащей RBD-sfGFP, и разведением 1/240 анти-мус Alexa 647 (клон 9B11, Cell Signaling Technology). Клетки дважды промывали ФСБ-БСА и анализировали на BD LSR II. Для анализа связывания sACE2-sfGFP с полноразмерным мус-S клетки промывали ФСБ-БСА и инкубировали в течение 30 минут на льду с

серийным разведением среды, содержащей sACE2-sfGFP, и разведением 1/240 анти-тус Alexa 647 (клон 9B11, Cell Signaling Technology). Клетки дважды промывали ФСБ-БСА и анализировали на BD Accuri C6, при этом вся Alexa 647-положительная популяция была отобрана для анализа. Для измерения связывания sACE2-IgG1 или sACE2-8h клетки, трансфицированные тус-S или S, промывали ФСБ-БСА и инкубировали в течение 30 минут с указанными концентрациями очищенного sACE2 в ФСБ-БСА. Клетки дважды промывали, инкубировали со вторичным антителом (разведение 1/100 куриного поликлонального анти-HIS-FITC от Immunology Consultants Laboratory; или 1/250 антитела к человеческому IgG-APC клона HP6017 от BioLegend) в течение 30 минут на льду, снова дважды промывали, и измеряли флуоресценцию всей популяции после гейтинга с помощью FSC-SSC для исключения детрита на BD Accuri C6. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения FCS Express (De Novo Software) или BD Accuri C6.

Очистка гибридных белков IgG1-Fc. Осветленную экспрессионную среду инкубировали с сорбентом KANEKA KanCapA 3G Affinity (Pall; уравновешенный в ФСБ) в течение 90 минут при 4°C. Смолу собирали на хроматографической колонке, промывали 12 объемами колонки (CV) ФСБ, и белок элюировали 5 CV 60 mM ацетата, pH 3,7. Элюат немедленно нейтрализовали 1 CV 1 M Трис pH 9,0 и концентрировали с помощью центрифужного устройства с номинальным отсечением по молекулярной массе 100 кДа (Sartorius). Белок разделяли на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) с ФСБ в качестве рабочего буфера. Пиковые фракции объединяли, концентрировали до ~10 мг/мл с превосходной растворимостью и хранили при -80°C после мгновенного замораживания в жидком азоте. Концентрации белка определяли по поглощению при 280 нм с использованием рассчитанных коэффициентов экстинкции для последовательностей мономерных зрелых полипептидов.

Очистка 8his-меченых белков. Смолу HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific), уравновешенную в ФСБ, инкубировали с очищенной средой для экспрессии в течение 90 минут при 4°C. Смолой упаковывали хроматографическую колонку, промывали 12 объемами колонки (CV) ФСБ и элюировали белок с помощью ступенчатой элюции ФСБ с добавлением 20 mM, 50 mM и 250 mM имидазола, pH 8 (6 CV каждой фракции). Фракции имидазола 50 mM и 250 mM концентрировали с помощью центрифужного устройства MWCO 30 кДа (MilliporeSigma). Белок разделяли на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) с ФСБ в качестве рабочего буфера. Пиковые фракции объединяли, концентрировали до ~5 мг/мл с превосходной растворимостью и хранили при -80°C после мгновенного замораживания в жидком азоте.

Другие белки. Немеченый sACE2.v2.4, экспрессируемый в клетках ExpiCHO-S (ThermoFisher), был изготовлен и предоставлен Orthogonal Biologics, Inc.

Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC). Белки (200 мкл при 2 мкМ) разделяли на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), уравновешенной в ФСБ. Стандарты молекулярной массы были получены от Bio-Rad.

Биослойная интерферометрия. Гидратированные биосенсоры анти-Fc IgG человека (Molecular Devices) погружали в экспрессионную среду, содержащую RBD-IgG1, на 60 секунд. Биосенсоры с захваченным RBD промывали в буфере для анализа, погружали в указанные концентрации белка sACE2-8h и возвращали в буфер для анализа измерения диссоциации. Данные собирали прибором BLItz и анализировали с использованием модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для анализа данных BLItz Pro (Molecular Devices). Буфер для анализа представлял собой 10 мМ ГЭПЭС pH 7,6, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% полисорбата-20, 0,5% обезжиренного сухого молока (Bio-Rad).

Доступность реагентов и данных. Плазмиды депонированы в Addgene под идентификаторами 141183-5, 145145-78, 149268-71, 149663-8 и 154098-106. Необработанные и обработанные данные глубокого секвенирования депонированы в Gene Expression Omnibus (GEO) NCBI под серийным номером доступа GSE147194.

Анализ каталитической активности ACE2. Активность измеряли с использованием набора Fluorometric ACE2 Activity Assay Kit (BioVision) с белком, разведенным в буфере для анализа до конечной концентрации 22; 7,4 и 2,5 нМ. Удельная активность представлена в пмоль 7-метоксикумарин-4-уксусной кислоты (MCA), произведенной в минуту (мЕд) на пмоль фермента. Флуоресценцию регистрировали на Analyst HT (Molecular Devices).

ИФА. Титры анти-RBD IgG измеряли в образцах сыворотки человека с помощью непрямого ИФА, как описано в Amant et al. (Nat. Med. 5, 562, 2020). Лунки 96-луночного планшета покрывали 2 мкг/мл белка RBD-8h при 4°C в течение ночи. После промывания лунки блокировали ФСБ, содержащим 3% обезжиренного молока, при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем в лунки с блокированием неспецифического связывания добавляли различные разведения термоинактивированной сыворотки (56°C, 1 час). Через 2 часа при комнатной температуре лунки промывали с последующей инкубацией с козьими антителами к IgG человека, мечеными HRP (ThermoFisher) в течение 1 часа при комнатной температуре. Несвязанное HRP-конъюгированное антитело удаляли промыванием и добавляли субстрат ТМВ для HRP. Колориметрическую реакцию проводили в течение 10 минут, после чего для остановки реакции добавляли 2 н серную

кислоту. Поглощение продукта измеряли при 450 нм. Для конкурентных анализов разведения сыворотки (эквивалентные их титру: 1:5000 для P1, 1:2000 для P2 и 1:1000 для P3) предварительно смешивали с различными концентрациями sACE2. Смеси сыворотки и sACE2 добавляли в заблокированные планшеты, и протокол продолжали, как описано выше.

Определение исследования не на человеческих субъектах (NHSR). Дезидентифицированные образцы сыворотки выздоровевших пациентов с COVID-19 были предоставлены Чикагским университетом (пациенты P2 и P3) и коммерческим поставщиком (пациент P1; RayBiotech). Управление по защите испытуемых субъектов Университета Иллинойса определило, что использование образцов в исследовании ИФА не соответствовало критериям исследований на людях, как определено в 45CFR46(d)(f) или 21CFR56.102(c)(e), и не требовало одобрения IRB.

Анализ микронеутрализации вируса. Клетки Vero E6 культивировали и оценивали их заражение аутентичным SARS-CoV-2, как описано Wec et al. (Science, eabc7424, 2020). Вкратце, растворимые белки ACE2 серийно разводили в культуральной среде и инкубировали с SARS-CoV-2 (вирусный изолят 2019-nCoV/USA-WA1-A12/2020; GenBank Acc. No. MT020880.1) в течение 1 часа. Смесь добавляли к клеткам VeroE6 при множественности инфицирования 0,2 и инкубировали в течение 24 часов. Клетки фиксировали и иммуноокрашивали антителом против SARS-CoV-2 нуклеокапсида (Sino Biological) и козым вторичным антителом против кроличьих белков, конъюгированным с Alexa Fluor 488. Планшеты визуализировали на Operetta (PerkinElmer) для определения количества инфицированных клеток и сравнивали с контрольными лунками, содержащими только вирус, для расчета процента относительной инфекции.

Пример 4

За последние два десятилетия зоонозные коронавирусы неоднократно переходили из животных резервуаров, и почти наверняка дикие животные будут продолжать оставаться источником разрушительных вспышек. В отличие от повсеместно распространенных коронавирусов человека, вызывающих обычные респираторные заболевания, эти зоонозные коронавирусы с пандемическим потенциалом вызывают серьезные и сложные заболевания, отчасти из-за их тканевой тропности, обусловленной использованием рецепторов. Коронавирусы 1 (SARS-CoV-1) и 2 (SARS-CoV-2) тяжелого острого респираторного синдрома используют ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) для прикрепления и проникновения в клетки (Zhou et al., Nature. 579, 270–273, 2020; Walls et al., Cell, 2020), doi:10.1016/j.cell.2020.02.058; Wan et al., SARS. J. Virol., 2020), doi:10.1128/JVI.00127-20; Wrapp et al., Science, eabb2507, 2020; Hoffmann et al., Cell,

2020), doi:10.1016/j.cell.2020.02.052; Li et al., *Nature*. 426, 450–454, 2003; Letko et al., *Nat Microbiol.* 11, 1860, 2020). ACE2 представляет собой протеазу, ответственную за регулирование объема и давления крови, которая экспрессируется на поверхности клеток в легких, сердце и желудочно-кишечном тракте, а также в других тканях (Samavati, B.D. Uhal, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 752, 2020); Jiang et al., *Nat Rev Cardiol.* 11, 413–426, 2014). Продолжающееся распространение SARS-CoV-2 и вызываемого им заболевания, COVID-19, нанесло сокрушительный урон глобальным системам здравоохранения и экономике, и срочно необходимы эффективные методы лечения и вакцины.

Поскольку SARS-CoV-2 становится эндемичным в человеческой популяции, он может мутировать и подвергаться генетическому дрейфу. Неизвестно, в какой степени это произойдет по мере увеличения числа инфицированных людей и усиления встречных иммунных реакций, но уже сейчас в результате многочисленных независимых событий и эффектов стабильности и динамики S-белка быстро появился вариант вирусного спайк-белка S (D614G) (Zhang et al., *bioRxiv*, 2020.06.12.148726, 2020; Korber et al., *Cell.* 182, 812–827.e19, 2020). Другой вариант S (D839Y) стал преобладать в Португалии, возможно, из-за эффекта основателя (Borges et al., *medRxiv*, 2020.08.10.20171884, 2020). Коронавирусы имеют умеренную или высокую частоту мутаций (измеряется как 10^{-4} замен в год на сайт в HCoV-NL63 (Purc et al., *J. Mol. Biol.* 364, 964–973, 2006), альфа-коронавирус также связывает ACE2, хотя и через меньшую зону взаимодействия, которая лишь частично совпадает с RBD бета-коронавирусов, ассоциированных с SARS (Wu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19970–19974, 2009)), и большие изменения в коронавирусных геномах часто происходят в природе в результате рекомбинации, особенно у летучих мышей, где уровни коинфекции могут быть высокими (Su et al., *Trends Microbiol.* 24, 490–502, 2016; Boni et al., *Nat Microbiol.* 5, 1408-1417, 2020). Рекомбинация MERS-CoV также была зарегистрирована у верблюдов (Sabir et al., *Science.* 351, 81–84, 2016). Все это будет иметь серьезные последствия для траектории нынешней пандемии, потенциала для будущих пандемий коронавируса и того, станет ли лекарственная устойчивость SARS-CoV-2 преобладающей.

Вирусный шип является уязвимой мишенью для нейтрализации моноклональными антителами, которые дошли до клиники, однако в тканевой культуре мутации уклонения в шипе быстро проявляются ко всем тестируемым антителам (Baum et al., *Science*, eabd0831, 2020). Глубокий мутагенез выделенного рецепторсвязывающего домена (RBD) с помощью дрожжевого поверхностного дисплея позволил легко выявить мутации в S, которые сохраняют высокую экспрессию и аффинность к ACE2, но больше не связываются моноклональными антителами и не придают устойчивости (Greaney et al.,

bioRxiv, 2020.09). .10.292078, 2020). Это послужило мотивом для разработки коктейлей неконкурирующих моноклональных антител (Baum et al., Science, eabd0831, 2020; Tortorici et al., Science, eabe3354, 2020), с использованием уроков, извлеченных из лечения ВИЧ-1 и лихорадки Эбола, чтобы ограничить возможность выхода вируса. Это еще не касается будущих коронавирусов, распространяющихся от диких животных, которые могут отличаться по антигенам. Действительно, потребовались большие усилия по скринингу, чтобы найти антитела у выздоровевших пациентов с SARS-CoV-1, которые перекрестно реагируют с SARS-CoV-2 (Pinto et al., Nature, 2020), doi: 10.1038/s41586-020-2349-y), свидетельствуя о том, что антитела обладают ограниченной способностью взаимодействовать с переменными эпитопами на поверхности шипа и вряд ли будут широко специфичными для всех вирусов, связанных с SARS.

Альтернативным противовирусным средством на основе белка по сравнению с моноклональными антителами является использование растворимого ACE2 (sACE2) в качестве приманки для конкуренции за сайты связывания рецепторов на вирусном шипе (Li et al., Nature. 426, 450–454, 2003; Hofmann et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 319, 1216–1221, 2004; Lei et al., Nat Commun. 11, 2070, 2020; Monteil et al., Cell, 2020, doi:10.1016/j.cell.2020.04. .004; Chan et al., Science. 4, eabc0870, 2020). В принципе, вирус имеет ограниченный потенциал к уклонению от нейтрализации, опосредованной sACE2, без одновременного снижения аффинности к нативному рецептору ACE2, которое сделало бы вирус менее вирулентным. В настоящее время несколько групп разработали sACE2 для создания приманок с высокой аффинностью к SARS-CoV-2, которые не уступают зрелым моноклональным антителам и эффективно нейтрализуют инфекцию (Chan et al., Science. 4, eabc0870, 2020; Glasgow et al., bioRxiv, 2020.07.31.231746), 2020; Higuchi et al., bioRxiv, 2020.09.16.299891, 2020). В описанном в настоящей заявке исследовании глубокий мутагенез использовали для выявления большого количества мутаций в ACE2, которые повышают аффинность к S (Chan et al., Science. 4, eabc0870, 2020). Эти мутации были рассеяны по зоне взаимодействия, а также в дистальных участках, где, как предполагается, они усиливают фолдинг распознаваемой вирусом конформации. Комбинация из трех мутаций, называемая sACE2_{2.v2.4}, увеличивает аффинность в 35 раз и связывает S SARS-CoV-2 (K_D 600 пМ) с аффинностью, сопоставимой с лучшими моноклональными антителами (Chan et al., Science. 4, eabc0870, 2020). Еще более близкие кажущиеся аффинности достигаются за счет avidного связывания с тримерным шипом, экспрессируемым на мембране. Несмотря на то, что разработка была сосредоточена исключительно на аффинности к SARS-CoV-2, sACE2_{2.v2.4} эффективно нейтрализовал аутентичную инфекцию SARS-CoV-1 и -2 в

культуре тканей, позволяя предположить, что его близкое сходство с рецептором дикого типа придает широкую активность против ACE2-использующих бета-коронавирусов в целом. Растворимый ACE2_{v2.4} является димерным и монодисперсным без агрегации, каталитически активным, хорошо растворимым, стабильным после хранения при 37°C в течение нескольких дней и хорошо экспрессируется на уровнях, превышающих уровень белка дикого типа. Благодаря благоприятному сочетанию высокой активности и необходимых свойств для производства, sACE2_{v2.4} является оригинальным лекарственным препаратом-кандидатом для доклинической разработки.

Сконструированные рецепторы-приманки с высокой аффинностью, хотя и очень похожи на натуральный ACE2, тем не менее имеют мутации, присутствующие на поверхности взаимодействия или вблизи нее. Таким образом, у вариантов вирусных шипов есть возможность различать искусственные рецепторы-приманки и рецепторы дикого типа, обеспечивая путь к устойчивости. В настоящей заявке раскрывается, что сконструированная приманка sACE2_{v2.4} широко и прочно связывается с RBD различных бета-коронавирусов, ассоциированных с SARS, которые используют ACE2 для проникновения. Мутации не были обнаружены в RBD, который напрямую контактирует с ACE2 и где, скорее всего, будут находиться возможные мутации уклонения, которые перенаправляют специфичность в сторону рецептора дикого типа, хотя многие мутации, которые способствуют связыванию сконструированной приманки, были обнаружены в анализе конкурентного связывания. Результаты показывают, что устойчивость к сконструированному рецептору-приманке будет редкостью, и sACE2_{v2.4} нацелен на общие признаки для аффинности к S в вирусах, ассоциированных с SARS.

Результаты

Сконструированный рецептор-приманка прямо связывает RBD из SARS-ассоциированных CoV с высокой аффинностью

Аффинность рецептора-приманки sACE2_{v2.4} была определена для очищенных RBD из белков S пяти коронавируса летучих мышей *Rhinolophus* (изоляты LYRa11, Rs4231, Rs7327, Rs4084 и RsSHC014) и двух коронавируса человека, SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2. Эти вирусы относятся к общей филогенетической ветви бета-коронавирусов, которые используют ACE2 в качестве рецептора входа (Letko et al., *Nat Microbiol.* 11, 1860, 2020). Они имеют близкую идентичность последовательности в ядре RBD, тогда как в функциональном сайте связывания ACE2 вариативность является самой высокой (фиг. 18 и 19), возможно, из-за коэволюционной «гонки вооружений» с полиморфными последовательностями ACE2 у экологически разнообразных видов летучих мышей (Frank et al., *bioRxiv.* 5, 562, 2020). Аффинность измеряли с помощью

биослойной интерферометрии (BLI) с sACE2₂ (а.о. S19-G732), слитым на С-конце с фрагментом Fc человеческого IgG1, иммобилизованным на поверхности сенсора, и мономерным 8his-меченым RBD, используемым в качестве растворимого анализируемого вещества. Такое расположение исключает эффекты авидности, которые в противном случае вызывают искусственно высокую (пиколярную) кажущуюся аффинность всякий раз, когда димерный sACE2₂ в растворе связывается с иммобилизованным RBD, расположенным на поверхности взаимодействия. sACE2₂ дикого типа связывал все RBD с аффинностью от 16 нМ для SARS-CoV-2 до 91 нМ для LYRa11 со средней аффинностью 60 нМ (таблица 6). Измеренная аффинность к RBD SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 сопоставима с опубликованными данными (Wrapp et al., Science, eabb2507, 2020; Chan et al., Science. 4, eabc0870, 2020; Shang et al. al., Nature. 382, 1199, 2020; Kirchdoerfer et al., Sci Rep. 8, 15701, 2018; Li et al., EMBO J. 24, 1634–1643, 2005). Сконструированный sACE2₂.v2.4 продемонстрировал значительное увеличение аффинности для всех RBD, при этом значения K_D варьировали от 0,4 нМ для SARS-CoV-2 до 3,5 нМ для изолята Rs4231, со средней аффинностью менее 2 нМ (таблица 6). Приблизительное 35-кратное увеличение аффинности сконструированной приманки универсально применимо к коронавирусам в тестовой панели, и поэтому молекулярная основа для повышения аффинности должна быть связана с общими атрибутами распознавания RBD/ACE2.

Таблица 6. Кинетика BLI для связывания иммобилизованного sACE2₂-IgG1 с коронавирусами RBD

Штамм CoV ^a	Дикий тип sACE2 ₂ -IgG1 ^b				sACE2 ₂ .v2.4-IgG1			
	k _{кон} (M ⁻¹ c ⁻¹)	k _{офф} (c ⁻¹)	K _D (нМ)	χ ² ^c	k _{кон} (M ⁻¹ c ⁻¹)	k _{офф} (s ⁻¹)	K _D (нМ)	χ ²
LYRa11	8,7 × 10 ⁵	7,9 × 10 ⁻²	91	0,12	1,4 × 10 ⁶	2,5 × 10 ⁻³	1,8	0,10
Rs7327	6,4 × 10 ⁵	4,0 × 10 ⁻²	63	0,25	9,8 × 10 ⁵	1,8 × 10 ⁻³	1,9	0,11
Rs4231	3,2 × 10 ⁵	2,2 × 10 ⁻²	69	0,04	4,5 × 10 ⁵	1,6 × 10 ⁻³	3,5	0,10
Rs4084	2,9 × 10 ⁵	2,5 × 10 ⁻²	85	0,24	4,8 × 10 ⁵	1,5 × 10 ⁻³	3,1	0,10
RsSHC014	8,8 × 10 ⁵	2,6 × 10 ⁻²	29	0,20	1,6 × 10 ⁶	2,0 × 10 ⁻³	1,3	0,29
SARS-1	6,6 × 10 ³	1,2 × 10 ⁻⁴	58	0,03	3,0 × 10 ³	5,6 × 10 ⁻⁶	2,1	0,03
SARS-2	1,4 × 10 ⁶	8,1 × 10 ⁻³	16	0,25	6,6 × 10 ⁵	2,8 × 10 ⁻⁴	0,4	0,09
SARS-2 (Y449K)	2,0 × 10 ⁶	9,0 × 10 ⁻²	46	0,67	4,3 × 10 ⁶	4,0 × 10 ⁻³	0,9	0,71
SARS-2 (N501W)	2,4 × 10 ⁶	5,4 × 10 ⁻³	2,3	0,43	3,3 × 10 ⁶	2,8 × 10 ⁻⁴	0,1	0,23
SARS-2 (N501Y)	2,2 × 10 ⁶	1,8 × 10 ⁻³	0,8	0,15	3,6 × 10 ⁵	1,1 × 10 ⁻⁴	< 0,1	0,24

^a Очищенные RBD в 5-7 концентрациях использовали в качестве растворимых анализируемых веществ.

^b IgG1-Fc, слитый с sACE2₂, был иммобилизован на улавливающих биосенсорах с антителами к человеческому IgG Fc.

^c Значения χ² представляют качество подбора кривой. Приемлемыми считали значения меньше 3.

Глубокое мутационное сканирование RBD в контексте полноразмерного S показывает, что остатки в сайте связывания ACE2 устойчивы к мутациям.

Чтобы изучить потенциальное разнообразие последовательностей S в SARS-CoV-2, которое может выступать как «источник» лекарственной устойчивости, мутационную толерантность RBD оценивали с помощью глубокого мутагенеза (Fowler and Fields, *Nat. Methods*. 11, 801–807, 2014). Насыщающий мутагенез был сосредоточен на RBD (а.о. C336-L517) полноразмерного S, помеченного на внеклеточном N-конце эпитопом с-тус для обнаружения поверхностной экспрессии. Библиотеку шипа, включающую 3640 замен одной аминокислоты, трансфицировали в клетки Expi293F человека в условиях, когда клетки обычно захватывают не более одного варианта последовательности (Heredia et al., *J. Immunol.* 200, ji1800343–3839, 2018; Park et al., *J Biol Chem.* 294, 4759–4774, 2019). Культуру инкубировали с димерным 8his-меченым димерным sACE2₂ в концентрации ниже насыщения (2,5 нМ). Связанный sACE2₂-8h и экспрессированный на поверхности S окрашивали флуоресцентными антителами для анализа проточной цитометрией (фиг. 20А). По сравнению с клетками, экспрессирующими S дикого типа, библиотека экспрессировалась плохо, что указывает на то, что многие мутации вредны для фолдинга и экспрессии. Популяция клеток была четко различима за счет экспрессии вариантов S, которые связывают ACE2 с пониженной аффинностью (фиг. 20В). После гейтинга с-тус-позитивных клеток, экспрессирующих S, клетки с высоким и низким уровнями связанного sACE2₂ собирали с помощью флуоресцентно-активированной сортировки (FACS) клеток, названных популяциями ACE2-High и ACE2-Low, соответственно (фиг. 20С). Как экспрессия, так и сигналы связывания sACE2₂ снижались в течение нескольких минут или часов во время сортировки, возможно, из-за потери субъединицы S1. Таким образом, клетки собирали и клетки из трех отдельных экспериментов FACS объединяли в течение общего времени сортировки 8 часов.

Транскрипты в отсортированных клетках секвенировали посредством Illumina и сравнивали с библиотекой наивных плазмид, чтобы определить коэффициент обогащения для каждой аминокислотной замены (Fowler et al., *Bioinformatics.* 27, 3430–3431, 2011). Мутации в S, который экспрессирует и прочно связывает ACE2, избирательно обогащали популяцию ACE2-High (фиг. 1); мутации, при которых была экспрессия, но связывание ACE2 было пониженным, избирательно обогащали популяцию ACE2-Low; а мутации, при которых экспрессия была плохая, были редки в обеих отсортированных популяциях. Оценки позиционной консервативности рассчитывали путем усреднения \log_2 коэффициентов обогащения для каждой из возможных аминокислот в положении остатка. Путем суммирования показателей консервативности как для популяций ACE2-High, так и для популяций ACE2-Low была получена оценка поверхностной экспрессии, которая показывает, что гидрофобное ядро RBD строго консервативно с точки зрения фолдинга и

движения вирусного шипа (фиг. 22А). Для сравнения, остатки на экспонированной поверхности RBD мутационно допускают поверхностную экспрессию S. Это соответствует мутационной толерантности белков в целом.

Для прочного связывания ACE2 (например, варианты S в популяции ACE2-High) консервативность остатков RBD в зоне взаимодействия с ACE2 повышается, но толерантность к мутациям остается высокой (фиг. 22С). Разнообразие последовательностей, наблюдаемое среди природных бета-коронавирусов, которые демонстрируют высокое разнообразие в сайте связывания с ACE2, таким образом, воспроизводится при глубоком мутационном сканировании, которое прогнозирует, что шип SARS-CoV-2 допускает значительное генетическое разнообразие в сайте связывания рецептора с точки зрения функционирования. Из этого доступного разнообразия последовательностей SARS-CoV-2 может легко мутировать, чтобы приобрести устойчивость к моноклональным антителам или сконструированным рецепторам-приманкам, нацеленным на сайт связывания ACE2.

Сравнение с глубоким мутационным сканированием выделенного RBD с помощью дрожжевого поверхностного дисплея

Сообщалось о двух глубоких мутационных сканированиях выделенного RBD, экспонированного на поверхности дрожжей (Starr et al., bioRxiv, 2020.06.17.157982, 2020; Linsky et al., bioRxiv, 2020.08.03.231340, 2020). Описанные здесь данные по выборке полноразмерных S, экспрессированных в клетках человека, сравниваются с общедоступным набором данных Starr et al. Важные остатки в RBD для поверхностной экспрессии полноразмерного шипа в клетках человека тесно коррелируют с данными по дрожжевому поверхностному дисплею выделенного RBD (фиг. 22В), за исключением одной примечательной области. Поверхность RBD, противоположная сайту связывания ACE2 (например, V362, Y365 и C391), может мутировать для экспонирования на поверхности дрожжей, но ее последовательность ограничена в настоящих экспериментах; эта область RBD скрыта за счет соединения структурных элементов с глобальной складкой S-субъединицы в закрытой конформации (это доминирующая конформация для S-субъединиц, недоступная для связывания с рецептором) (Walls et al., Cell, 2020), doi:10.1016/j.cell.2020.02.058; Wrapp et al., Science, eabb2507, 2020; Cai et al., Science. 369, 1586, 2020; Yao et al., Cell 183(3), 730-738.e13, 2020). Направленный мутагенез использовали для индивидуального тестирования аланиновых замен всех цистеинов в RBD (фиг. 23). Все мутации цистеина на аланин сильно снижали поверхностную экспрессию S в клетках Epr1293F, включая C391A и C525A на «обратной стороне» RBD, которые были нейтральными при сканировании дрожжевого дисплея. Эти различия

показывают, что существуют более жесткие ограничения последовательности RBD в контексте полного спайка, экспрессируемого на клеточной мембране человека, но в целом два набора данных хорошо согласуются.

Для связывания с димерным sACE2 остатки на в зоне взаимодействия были более консервативными в наборе данных Starr et al. (фиг. 22D), что, возможно, является следствием трех различий между экспериментами по глубокому мутагенезу. Во-первых, выбор связывания ACE2 вариантов S на плазматической мембране, по-видимому, в первую очередь отражает мутационные эффекты в отношении поверхностной экспрессии, которая почти наверняка является более строгой в клетках человека. Дрожжи позволяют многим плохо свернутым белкам просачиваться на поверхность клетки (Rocklin et al., *Science*. 357, 168–175, 2017). Во-вторых, селекцию дрожжей проводили при нескольких концентрациях sACE2, исходя из которых рассчитывали изменения кажущейся K_D ; данные Starr et al. в этом отношении весьма обстоятельны. Из-за длительного времени сортировки, необходимого для библиотек клеток человека, где только небольшая часть клеток экспрессирует шип, сортировку проводили при одной концентрации sACE2, которая не может точно фиксировать диапазон различных аффинностей связывания количественно. В-третьих, димер sACE2 может геометрически дополнять тример S, плотно упакованный на клеточной мембране человека, так что avidность маскирует эффекты мутаций, снижающих аффинность. Тем не менее, существует общее мнение, что связывание ACE2 часто сохраняется после мутаций на поверхности RBD, и эти данные просто предполагают, что толерантность к мутациям может быть даже выше, чем уже наблюдаемая Starr et al.

Скрининг вариантов S, которые предпочтительно связывают ACE2 дикого типа по сравнению со сконструированной приманкой

Показав, что ACE2-связывающий сайт белка S SARS-CoV-2 допускает множество мутаций, мы исследовали, могут ли поэтому быть обнаружены мутации, которые придают устойчивость к сконструированной приманке sACE2.v2.4. Ожидается, что мутации резистентности потеряют аффинность к sACE2.v2.4, сохраняя при этом связывание с рецептором дикого типа, и, скорее всего, будут находиться в RBD, где осуществляются физические контакты. Подобные рассуждения привели к формированию основных принципов селекции на основе глубокого мутагенеза выделенных RBD с помощью дрожжевого поверхностного дисплея, направленных на обнаружение мутаций отклонения от моноклональных антител, и результаты позволили предсказать мутации отклонения при селекции роста псевдовируса (Greaney et al., bioRxiv, 2020.09. 29.10.2078, 2020).

Чтобы решить, могут ли мутации отклонения от сконструированной приманки быть

обнаружены в RBD, библиотека S-белка была перепрофилирована для отбора по специфичности. Клетки, экспрессирующие библиотеку, кодирующую все возможные замены в RBD, совместно инкубировали с sACE2₂ дикого типа, гибридным с Fc-областью IgG1, и sACE2_{2.v2.4}, меченным 8his, в концентрациях, при которых оба белка связываются конкурентно (Chan et al., Science. 4, eabc0870, 2020). Из проточной цитометрии культуры Expi293F, экспрессирующей библиотеку S, сразу же стало очевидно, что имеются клетки, экспрессирующие варианты S, смещенные в сторону предпочтительного связывания с sACE2_{2.v2.4}, но нет значительной популяции с предпочтительным связыванием с рецептором дикого типа (фиг. 24A-24B). Клетки, экспрессирующие варианты S, которые могут преимущественно связываться с sACE2₂(WT)-IgG1 или sACE2_{2.v2.4}, отбирали и собирали с помощью FACS (фиг. 24C) с последующим глубоким секвенированием транскриптов S для определения степени обогащения. Между двумя независимыми повторяющимися экспериментами наблюдалось близкое соответствие (фиг. 24D-24G). Большинство мутаций RBD были истощены после сортировки, что согласуется с вредным влиянием на фолдинг и экспрессию S.

Растворимый ACE2_{2.v2.4} имеет три мутации из ACE2 дикого типа: T27Y, спрятанную внутри границы контакта RBD, и L79T и N330Y на периферии границы контакта (фиг. 25A). Значительное количество мутаций в RBD S было селективно обогащено в сторону предпочтительного связывания с sACE2_{2.v2.4} (фиг. 25B, верхний левый квадрант). Хотя мутации, специфичные для sACE2_{2.v2.4}, могут быть обнаружены непосредственно рядом с сайтами инженерных мутаций в ACE2 (в частности, мутации S-F486 рядом с ACE2-L79 и S-T500 рядом с ACE2-N330), основные горячие точки для мутаций специфичности к sACE2_{2.v2.4} также картированы в петле RBD 498-506, контактирующей с областью, где спираль ACE2- α 1 упакована напротив мотива β -шпильки (фиг. 25A). Для сравнения, в RBD не было горячих точек для мутаций специфичности к sACE2₂(WT). Действительно, только небольшое количество мутаций было избирательно обогащено для предпочтительного связывания с рецептором дикого типа (фиг. 25B), и количество этих предполагаемых специфичных для дикого типа мутаций едва превышало ожидаемый уровень шума в данных глубокого мутагенеза. Таким образом, в этом конкурентном анализе связывание S с sACE2₂ дикого типа более чувствительно к мутациям RBD, чем связывание S со сконструированным sACE2_{2.v2.4}.

Чтобы определить, являются ли потенциальные специфичные для ACE2 мутации дикого типа, обнаруженные с помощью глубокого мутагенеза, реальными, а не ложными предикторами из-за шума данных, тестировали 24 мутанта S, селективно обогащенные в области, специфичной для дикого типа, с помощью направленного мутагенеза (синие

точки данных на фиг. 25B). Наблюдались лишь незначительные сдвиги в сторону связывания sACE2₂ дикого типа (фиг. 26). В экспериментах по титрованию sACE2₂ были дополнительно исследованы два мутанта S, N501W и N501Y, оба из которых сохраняли высокое связывание с рецептором и демонстрировали небольшие сдвиги в сторону sACE2₂ дикого типа в конкурентном эксперименте. N501 из S расположен в петле 498-506, и его замена на большие ароматические боковые цепи может изменить конформацию петли, вызывая стерическую деформацию с соседней мутацией ACE2 N330Y в sACE2_{2.v2.4}. После титрования концентраций 8his-меченых sACE2₂(WT) и sACE2_{2.v2.4} и измерения связанного белка с S-экспрессирующими клетками с помощью проточной цитометрии было обнаружено, что S-N501W и S-N501Y действительно проявляют повышенную специфичность к sACE2₂ дикого типа, но эффект невелик, и sACE2_{2.v2.4} остается более сильным связующим агентом (фиг. 25C); поэтому эти мутации не придадут вирусу устойчивости к созданной приманке.

Димерный sACE2₂ avidно связывается с S-белком на поверхности мембраны; avidные взаимодействия также наблюдаются между sACE2₂ и шипами аутентичного SARS-CoV-2 в анализах на инфицирование (Chan et al., Science. 4, eabc0870, 2020). Измерения кинетики BLI, в которых иммобилизованный sACE2₂-IgG1 взаимодействует с мономерным RBD, использовались для определения того, как наблюдаемые изменения в связывании активного sACE2₂ с S-экспрессирующими клетками трансформируются в изменения моновалентной аффинности. Как N501W, так и N501Y мутанты RBD SARS-CoV-2 демонстрировали повышенную аффинность к ACE2 дикого типа и сконструированному ACE2.v2.4 с большим приростом аффинности в пользу рецептора дикого типа (таблица 6). Это согласуется с данными проточной цитометрии, указывающими на небольшой сдвиг в специфичности в сторону ACE2 дикого типа, но недостаточный, чтобы избежать сконструированной приманки. Для сравнения, в S вируса SARS-CoV-2 легко обнаруживаются множественные независимые мутации уклонения, которые на много порядков снижают эффективность моноклональных антител (Baum et al., Science, eabd0831, 2020; Greaney et al., bioRxiv, 2020.09.10.292078, 2020).

Наконец, было клонировано 8 типичных мутаций S, которые, согласно глубокому мутационному сканированию, повышали специфичность по отношению к sACE2_{2.v2.4} (фиг. 25B), и было обнаружено, что 7 из них имеют большие сдвиги в сторону предпочтительного связывания sACE2_{2.v2.4} в конкурентном анализе (фиг. 27). Эти мутации S представляли собой Y449K/Q/S, L455G/R/Y и G504K. Причина, по которой мутации увеличивают специфичность в отношении сконструированного sACE2_{2.v2.4}, неоднозначна, поскольку остатки RBD Y449, L455 и G504 не находятся в прямом

контакте со сконструированными участками рецептора. Кинетика BLI между иммобилизованным sACE2₂-IgG1 и мономерным RBD в качестве анализируемого вещества показала сниженную аффинность типичного мутанта RBD-Y449K как к дикому типу, так и к сконструированному sACE2₂ (таблица 6). Однако изменения аффинности в пиколярном диапазоне для sACE2₂.v2.4 скрыты при avidном связывании с полноразмерным S-Y449K на клеточной поверхности, тогда как avidное связывание sACE2₂ дикого типа с S-Y449K (с аффинностью, измеренной с помощью BLI в умеренном наномолярном диапазоне) существенно снижается. Это открытие позволяет объяснить, почему конкурентный отбор обнаружил множество мутаций, которые сдвигают специфичность в сторону сконструированного sACE2₂.v2.4, поскольку мутации, вызывающие небольшое снижение аффинности, могут оказывать большее влияние на avidное связывание слабее связанного рецептора дикого типа.

В целом проверка с помощью направленного мутагенеза подтверждает, что отбор может успешно находить мутации в S с измененной специфичностью. Невозможность найти мутации в RBD, которые придают высокую специфичность к рецептору дикого типа, означает, что такие мутации редки или могут даже не существовать, по меньшей мере в пределах рецепторсвязывающего домена, где происходят прямые физические контакты с рецепторами. Нельзя исключать мутации в других местах, имеющие долгосрочные конформационные эффекты. Таким образом, сконструированные растворимые рецепторы-приманки оправдывают свои ожидания в качестве широких терапевтических кандидатов, от которых вирус не может легко уклоняться.

Обсуждение

Привлекательность растворимых рецепторов-приманок заключается в том, что вирус не может легко мутировать, чтобы избежать нейтрализации. Мутации, которые снижают аффинность растворимой приманки, вероятно, также уменьшают аффинность к рецептору дикого типа на клетках-хозяевах, что приведет к снижению инфекционности и вирулентности. Однако эта гипотеза не была тщательно проверена, и, поскольку сконструированные рецепторы-приманки отличаются от своих аналогов дикого типа, даже если всего лишь небольшим количеством мутаций, возможно, вирус может эволюционировать, чтобы различать их. Здесь продемонстрировано, что сконструированный рецептор-приманка для SARS-CoV-2 хорошо связывает с низкой наномолярной K_D шипы ассоциированных с SARS бета-коронавирусов, которые используют ACE2 для проникновения, несмотря на большое разнообразие последовательностей в сайте связывания ACE2. Мутации в S, которые придают высокую специфичность по отношению к ACE2 дикого типа, не были обнаружены при

всестороннем скрининге всех замен в RBD. Таким образом, сконструированный рецептор-приманка универсален против зоонозных коронавирусов, использующих ACE2, которые могут распространяться из животных источников в будущем, и против вариантов SARS-CoV-2, которые могут возникать по мере того, как бушует текущая пандемия COVID-19. Маловероятно, что рецепторы-приманки нужно будет объединять в препараты-коктейли, как это требуется для моноклональных антител или разработанных минибелковых связывающих агентов для предотвращения быстрого развития резистентности (Baum et al., *Science*, eabd0831, 2020; Cao et al., *Science*, eabd9909, 2020).

Растворимые рецепторы-приманки доказали свою эффективность в клинике, особенно для модулирования иммунных реакций. Этанерцепт (торговое название Enbrel®; растворимый рецептор TNF), афлиберцепт (Eylea®; растворимая химера рецепторов VEGF 1 и 2) и абатацепт (Orencia®; растворимый CTLA-4) — это всего лишь три примера растворимых рецепторов, которые оказали глубокое влияние на лечения заболеваний человека (Usmani et al., *PLoS ONE*. 12, e0181748, 2017), однако никакие растворимые рецепторы вирусного патогена не являются одобренными лекарственными средствами. Для этого есть две основные причины. Во-первых, аффинность рецепторов входа к вирусным гликопротеинам часто бывает от умеренной до низкой, что снижает эффективность нейтрализации по сравнению с моноклональными антителами с созревшей аффинностью. Для SARS-CoV-2 эта проблема была решена путем создания ACE2 с пикомолярной аффинностью к вирусному S (Chan et al., *Science*. 4, eabc0870, 2020; Glasgow et al., *bioRxiv*, 2020.07.31.231746, 2020; Higuchi et al., *bioRxiv*, 2020.09.16.299891, 2020). Во-вторых, рецепторы входа вируса имеют эндогенные функции, ответственные за нормальную физиологию, и их растворимые аналоги могут воздействовать на эту нормальную физиологию, вызывая неприемлемую токсичность. Например, рецептор входа для цитомегаловируса человека является рецептором фактора роста, и взаимодействие с факторами роста должно быть отключено, чтобы сделать вирусоспецифическую приманку пригодной для введения *in vivo* (Park et al., *PLoS Pathog.* 16, e1008647, 2020). Однако ACE2 в этом отношении отличается, и его эндогенная активность — каталитическая конверсия сосудосуживающих и воспалительных пептидов ренин-ангиотензиновой и кининовой систем — может иметь прямое значение для устранения симптомов COVID-19. Во время инфекции активность ACE2 снижается, а ренин-ангиотензиновая система становится несбалансированной, что, возможно, приводит к острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС), в результате чего пациентам требуется искусственная вентиляция легких (Imai et al., *Nature*. 436, 112–116, 2005; Trembl et al., *Crit. Care Med.* 38, 596–601, 2010; Verdecchia et al., *Eur J Intern Med.* 76, 14–20, 2020).

Введение рекомбинантного растворимого ACE2 восстанавливает утраченную биохимическую активность, обладая потенциальными защитными свойствами для легочной и сердечно-сосудистой систем, включая улучшение эластических свойств легких, повышение оксигенации крови, снижение гипертензии и уменьшение накопления жидкости в легких из-за протеолитического превращения пептидов ангиотензина и брадикинина (Imai et al., *Nature* 436, 112–116, 2005; Trembl et al., *Crit. Care Med.* 38, 596–601, 2010; Wang et al., *Pulm Pharmacol Ther.* 58, 101833, 2019; Chung et al. al., *EBioMedicine.* 58, 102907–102907, 2020; Johnson et al., *PLoS ONE.* 6, e20828, 2011; Liu et al., *Kidney Int.* 94, 114–125, 2018; Garvin et al., *Elife.* 9, e59177, 2020). Растворимый ACE2₂ дикого типа был разработан как лекарство от ОРДС с приемлемым профилем безопасности для человека (Haschke et al., *Clin Pharmacokinet.* 52, 783–792, 2013; Khan et al., *Crit Care.* 21, 234, 2017) и в настоящее время проходит клиническое исследование у Ареигон. Сконструированные высокоаффинные приманки sACE2₂, скорее всего, в виде гибридов с Fc иммуноглобулина для повышения стабильности в сыворотке (Lei et al., *Nat Commun.* 11, 2070, 2020; Liu et al., *Kidney Int.* 94, 114–125, 2018; Iwanaga et al., *bioRxiv*, 2020.06.15.152157, 2020), представляют собой терапевтические средства нового поколения с двойным механизмом действия: (i) мощной нейтрализацией вируса за счет высокоаффинной блокады вирусного шипа; и (ii) протеолитическим оборотом пептидных гормонов для прямого облегчения симптомов COVID-19.

Пример 5

В этом примере оценивают фармакокинетику (ФК) sACE2.v2.4 у мышей. Результаты демонстрируют, что время полужизни sACE2.v2.4 в сыворотке после внутривенного введения увеличивается за счет слияния с фрагментом Fc человеческого IgG1. Слитый белок подвергается протеолизу с образованием долгоживущих фрагментов IgG1, которые сохраняются более 7 дней, тогда как фрагмент ACE2 быстро исчезает в течение нескольких часов. При доставке sACE2.v2.4-IgG1 непосредственно в легкие посредством интратрахеального (и/т) введения или распыления белок остается на высоком уровне в легочной ткани в течение как минимум 4 часов с минимальной протеолитической деградацией. Эти результаты демонстрируют, что прямая доставка в легкие высокоаффинных производных sACE2 является жизнеспособной альтернативой внутривенной инфузии, и обеспечивает возможные преимущества для амбулаторного клинического лечения.

Когда человеческий sACE2₂ дикого типа вводят интраперитонеально мышам, его период полувыведения из сыворотки составляет 8,5 часов (Wysocki et al., *Hypertension* 55, 90–98, 2010), но на это влияет кинетика резорбции в кровь, которая обычно задерживается

на несколько часов для макромолекул (Shoyaib et al., *Pharmaceut Res.* 37, 12, 2020). Когда sACE2_{2.v2.4} (0,5 мг/кг) без партнера слияния вводили в хвостовые вены самцов и самок мышей, белок быстро выводился с периодом полувыведения из сыворотки, который, по оценкам, составлял менее 10 минут при измерении с помощью ИФА ACE2 (фиг. 28А) и каталитической активности ACE2 в сыворотке (фиг. 28В). Это намного короче периода полувыведения sACE2₂ дикого типа из сыворотки человека (от 2 до 3 часов) (Haschke et al., *Clin Pharmacokinet* 52, 783–792, 2013). Никакой токсичности не наблюдалось при внутривенном введении sACE2_{2.v2.4} два раза в сутки в дозе 0,5 мг/кг в течение пяти дней (дни 0, 1, 2, 3 и 4). Мышей подвергали эвтаназии на 7-й день, и биохимический анализ крови, гематология и патология тканей не показали различий с мышами контрольной группы.

Для увеличения времени полужизни в сыворотке тестировали слитый белок sACE2₂ и Fc IgG1. В то время как другие группы исследовали слитые белки sACE2₂ с мутантами IgG1 (Iwanaga et al., *Biorxiv*, в печати, doi: 10.1101/2020.06.15.152157) или Fc IgG4 (Svilenov et al., *Biorxiv*, в печати, doi: 10.1101/2020.12.06.413443) для ослабления взаимодействия с провоспалительными FcγR, в этом исследовании использовали немодифицированный IgG1 (изоаллотип nG1m1) для рекрутирования эффекторных функций, которые, как было показано для mAb против SARS-CoV-2, необходимы для оптимальной защиты (Schäfer et al., *J Exp Med.* 218 (2020), doi:10.1084/jem.20201993). Опубликованные фармакокинетические данные о слитых белках IgG1 и sACE2₂ неоднозначны. Хотя существуют однозначные доказательства того, что слитый белок мышино-го sACE2₂-IgG1 сохраняется в течение нескольких дней у мышей (Liu et al., *Kidney Int.* 94, 114–125, 2018), результаты по слитому белку sACE2₂-IgG1 человека противоречивы. В двух отчетах с использованием ИФА для обнаружения фрагмента IgG1 человека указано, что sACE2₂-IgG1 имеет период полужизни в сыворотке, составляющий несколько дней (Iwanaga et al., *Biorxiv*, в печати, doi: 10.1101/2020.06.15.152157; Lei et al., *Nat Commun.* 11, 2070, 2020), но в другом исследовании с использованием ИФА для обнаружения фрагмента ACE2 сообщалось о быстром выведении в течение нескольких часов (Higuchi et al., *Biorxiv*, в печати, doi:10.1101/2020.09.16.299891). Только в одном опубликованном отчете были обнаружены обе части слитого белка с использованием захватывающего антитела против ACE2 с анти-IgG1 антителом для измерения длительного периода полужизни человеческого слитого белка в сыворотке у мышей (Liu et al., *Int J Biol Macromol.* 165, 1626–1633, 2020). Причины расхождений неясны, но, возможно, все указывает на расщепление слитого белка с образованием фрагментов с разной стабильностью в сыворотке.

Применение ИФА для IgG1 человека, как sACE2₂-IgG1 дикого типа, так и sACE2_{2.v2.4}-IgG1 (SEQ ID NO: 11) показало эквивалентную фармакокинетику в сыворотке после внутривенного введения (2,0 мг/кг) у самцов мышей, при этом белок сохранялся более 7 дней (фиг. 29). Поэтому был сделан вывод, что три мутации в высокоаффинном варианте sACE2_{2.v2.4} (T27Y, L79T и N330Y) существенно не изменили фармакокинетику, что согласуется с предыдущим исследованием другого модифицированного производного sACE2 (Higuchi et al., *Biorxiv*, в печати, doi:10.1101/2020.09.16.299891). Компоненты сыворотки не могли быть дополнительно охарактеризованы из-за недостатка материала, поэтому было проведено еще одно фармакокинетическое исследование как на самцах, так и на самках мышей, чтобы более тщательно отслеживать, как sACE2_{2.v2.4}-IgG1 изменяется в сыворотке с течением времени. Опять же, белок IgG1 человека сохранялся в сыворотке в течение нескольких дней (фиг. 30A), однако фрагмент ACE2 быстро выводился из организма в течение 24 часов по данным ИФА ACE2 (фиг. 30B). Измерение каталитической активности ACE2 выявило еще более быстрое исчезновение (фиг. 30C). Иммуноблоттинг для IgG1 человека подтвердил, что слитый белок подвергался протеолизу в крови мыши с высвобождением долгоживущих фрагментов IgG1 (фиг. 30D). В целом, слияние sACE2_{2.v2.4} с Fc IgG1 обеспечивало лишь умеренное повышение стабильности в сыворотке. Никакой токсичности не наблюдалось у мышей, которым внутривенно вводили sACE2_{2.v2.4}-IgG1 (2,0 мг/кг), а затем через 7 дней проводили биохимический анализ крови, гематологический анализ и анализ патологии тканей.

Чтобы улучшить фармакокинетику в сыворотке, наблюдаемую после внутривенного введения, было проведено исследование по доставке белка непосредственно в дыхательные пути, которые являются основным местом заражения SARS-CoV-2. После ИТ-доставки (1,0 мг/кг) было обнаружено, что sACE2_{2.v2.4}-IgG1 сохраняется на высоких уровнях в легких в течение по меньшей мере 4 часов по данным ИФА ACE2, ИФА IgG1 человека и иммуноблоттинга с антителами против IgG1 человека (фиг. 31A-31C). Уровни sACE2_{2.v2.4}-IgG1, абсорбированного в кровь, были слишком низкими для обнаружения. Как наблюдалось при внутривенном введении, sACE2₂-IgG1 дикого типа и sACE2_{2.v2.4}-IgG1 имели эквивалентную фармакокинетику в легких (в пределах экспериментальной ошибки) после ИТ-доставки. Было дополнительно исследовано ингаляционное введение sACE2_{2.v2.4}-IgG1. В этом исследовании белок распыляли в течение 30 минут в камеру с мышами. Хотя дозы в камере для небулайзера были ниже доз, достигнутых при ИТ-введении, тем не менее было отмечено, что концентрация sACE2_{2.v2.4}-IgG1 оставалась высокой и относительно постоянной в течение

4 часов, как было измерено с помощью ИФА ACE2, ИФА и иммуноблоттинга человеческого IgG1 (фиг. 31D-31F). Прямая доставка в дыхательные пути позволила достичь высоких уровней белка в легочной ткани с минимальной деградацией в течение более 4 часов. Различные фармакокинетические профили в зависимости от пути введения (например, белок доставленный непосредственно в легкие, сохраняется в течение нескольких часов, но не достигает определяемых уровней в плазме, в то время как белок, доставляемый внутривенно, достигает высоких, но кратковременных концентраций в плазме) открывает клинические возможности для лечения пациентов различными способами, возможно, в зависимости от того, насколько запущено заболевание или является ли инфекция системной, или для лечения пациентов с использованием как внутривенного, так и интратрахеального или ингаляционного пути введения.

Пример 6

В этом примере описаны эксперименты, проведенные с использованием псевдовируса SARS-CoV-2 для оценки того, способны ли модифицированные полипептиды ACE2 блокировать проникновение вируса в клетки.

Эпителиальные клетки легких человека A549, сверхэкспрессирующие рецептор ACE2, эпителиальные клетки легких человека A549 и эндотелиальные клетки легких человека инкубировали с псевдотипом вируса VSV-SARS-CoV-2-люциферазой и sACE2₂ дикого типа-IgG1 или сконструированным пептидом sACE2₂.v2.4-IgG1 в концентрациях 0, 5 или 25 мкг/мл. В каждом эксперименте контроль не содержал вирусов; все остальные образцы содержали вирус с множественностью инфицирования 0,01. Собирали клетки и количественно определяли степень проникновения вируса на основе экспрессии репортера люциферазы (фиг. 32). Сконструированный sACE2₂.v.2.4-IgG1 обеспечивал превосходную защиту от проникновения псевдовируса SARS-CoV-2 в эпителиальные клетки легких и эндотелиальные клетки человека.

Во втором исследовании трансгенным мышам K18-hACE2, которые экспрессируют человеческий рецептор ACE2 в эпителиальных клетках, внутривенно вводили sACE2₂-IgG1 дикого типа или sACE2₂.v2.4-IgG1, и интраперитонеально псевдотип вируса VSV-SARS-CoV-2-люциферазу. Легкие и печень собирали через 24 часа, и степень проникновения вируса определяли количественно по активности люциферазы (фиг. 33). Сконструированный sACE2₂.v.2.4-IgG1 обеспечил превосходную защиту от проникновения псевдотипа вируса SARS-CoV-2 в легкие и печень у мышей, экспрессирующих ACE2 человека.

В совокупности эти результаты демонстрируют, что v2.4 производное растворимого ACE2 более эффективно блокирует проникновение псевдовируса SARS-

CoV-2 в клетки, экспрессирующие человеческий ACE2, как в культуре ткани, так и на животной модели.

Пример 7

В этом примере описывается исследование по изучению того, показывает ли sACE2_{2.v2.4}-IgG1 защитные и/или терапевтические преимущества для борьбы с индуцированной SARS-CoV-2 транссудации легких на мышинной модели COVID-19. Хотя приведены конкретные способы, специалисту в данной области техники будет понятно, что также могут быть использованы способы, отличающиеся от этих конкретных способов, включая добавление или исключение одного или нескольких этапов.

Показаниями этого исследования являются транссудация легких и образование отека в легком. Для этого исследования используются следующие группы животных.

- Группа 1 (контрольная), 4 мыши (2 самца и 2 самки, возраст 2 месяца).
- Группа 2 (SARS-CoV-2, 5×10^4 БОЕ/мышь в течение 7 дней), 4 мыши (2 самца и 2 самки, возраст 2 месяца).
- Группа 3 (sACE2_{2.v2.4}-IgG1 вводили внутривенно (10 мг/кг) или ИТ (2 мг/кг) или путем ингаляции за несколько часов до заражения SARS-CoV-2, 5×10^4 БОЕ/мышь в течение 7 дней), 4 мыши (2 самца и 2 самки, возраст 2 месяца). Эта группа оценивает доконтактную профилактику.
- Группа 4 (sACE2_{2.v2.4}-IgG1, вводимого внутривенно (10 мг/кг) или интратрахеально (2 мг/кг) или ингаляционно после заражения SARS-CoV-2, 5×10^4 БОЕ/мышь в течение 7 дней), 4 мыши (2 самца и 2 самки, возраст 2 месяца). Эта группа оценивает постинфекционную терапию.

Мышам вводят полипептид sACE2_{2.v2.4}-IgG1 одним из нескольких способов (например, внутривенно, интратрахеально, ингаляционно) и инфицируют SARS-CoV-2 через дыхательные пути, чтобы имитировать легочную инфекцию человека.

Ожидается, что sACE2_{2.v2.4}-IgG1 снизит индуцированную SARS-CoV-2 транссудацию легких и уменьшит образование отеков, которые являются основными причинами дыхательной недостаточности и смерти у пациентов с COVID-19.

Пример 8

В этом примере описывается исследование по изучению того, проявляет ли sACE2_{2.v2.4}-IgG1 защитное и/или терапевтическое действие против индуцированного SARS-CoV-2 повреждения сосудов легких и долгосрочного фиброза на мышинной модели COVID-19. Хотя предусмотрены конкретные способы, специалисту в данной области техники будет понятно, что также могут быть использованы способы, отличающиеся от этих конкретных способов, включая добавление или исключение одного или нескольких

этапов.

Методиками для этого исследования являются окрашивание гематоксилином и эозином, окрашивание трихромом по Массону и окрашивание сириусом красным, анализ миелопероксидазы и белковых лизатов для оценки сдвигов передачи сигналов и воспалительной патологии. Для этого исследования используются следующие группы животных.

- Группа 1 (контрольная), 4 мыши (2 самца и 2 самки, возраст 2 месяца).
- Группа 2 (SARS-CoV-2, 5×10^4 БОЕ/мышь в течение 7 дней), 4 мыши (2 самца и 2 самки, возраст 2 месяца).
- Группа 3 (sACE2.v2.4-IgG1, при введении внутривенно (10 мг/кг) или интратрахеально (2 мг/кг) или ингаляционно до заражения SARS-CoV-2, 5×10^4 БОЕ/мышь в течение 7 дней), 4 мыши (2 самца и 2 самки, возраст 2 месяца). Эта группа оценивает доконтактную профилактику.
- Группа 4 (sACE2.v2.4-IgG1, при введении внутривенно (10 мг/кг) или интратрахеально (2 мг/кг) или ингаляционно после заражения SARS-CoV-2, 5×10^4 БОЕ/мышь в течение 7 дней), 4 мыши (2 самца и 2 самки, возраст 2 месяца). Эта группа оценивает постинфекционную терапию.

Ожидается, что sACE2.v2.4-IgG1 уменьшат воспалительное повреждение и фиброз на этой мышинной модели COVID-19.

Пример 9

В этом примере описывается исследование, направленное на изучение того, блокирует ли sACE2.v2.4 (слитый или не слитый с Fc IgG1) спайк-белки высокотрансмиссивных вариантов SARS-CoV-2. Появились мутанты SARS-CoV-2, которые демонстрируют повышенную трансмиссию и, возможно, повышенную вирулентность. По состоянию на март 2021 вызывают озабоченность следующие варианты вируса: B.1.351, происходящий из Южной Африки (Tegally et al., medRxiv, в печати, doi:10.1101/2020.12.21.20248640), P.1 из Бразилии и B.1.1.7 из Англии (Leung et al., Eurosurveillance 26, 2021, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106; Volz et al., medRxiv, в печати, doi:10.1101/2020.12.30.20249034). Все три варианта вируса имеют общую мутацию N501Y в S, которая увеличивает моновалентную аффинность к ACE2 дикого типа в 20 раз (пример 4 - таблица 6). Высокоаффинное производное ACE2 v2.4 также связывается с повышенной аффинностью (Пример 4 - таблица 6). В этом исследовании проверяют кажущуюся моновалентную аффинность и активное связывание димерного sACE2-IgG1 (дикого типа и v2.4) с полноразмерными вариантами S из линий P.1, B.1.1.7 и B.1.351.

Белки S экспрессируют в клетках Epxi293F человека с N-концевыми метками с-тус для измерения поверхностной экспрессии с помощью флуоресцентного анти-тус антитела и проточной цитометрии. Клетки инкубируют с серией разведений sACE2-8his и sACE2.v2.4-8his (мономер: остатки ACE2 19-615), промывают и измеряют связанный белок с помощью проточной цитометрии с использованием окрашивания анти-his флуоресцентными антителами. Клетки также инкубируют с серией разведений sACE2-IgG1 и sACE2.v2.4-IgG1 (димер: остатки ACE2 19-732), промывают и измеряют связанный белок с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентного антитела против IgG1 человека. На основании ранее описанного глубокого мутагенеза (Пример 4) ожидается, что результаты подтвердят, что варианты вируса с высокой степенью трансмиссивности остаются чувствительными к прочному связыванию сконструированным производным v2.4 sACE2.

Ввиду множества возможных вариантов осуществления, к которым могут быть применены принципы раскрытого объекта изобретения, следует признать, что проиллюстрированные варианты осуществления являются только предпочтительными примерами изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Скорее, объем изобретения определяется следующей формулой изобретения. Поэтому мы заявляем все, что подпадает под объем и охватывается смыслом этой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный полипептид ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), содержащий человеческий ACE2 или его фрагмент, где полипептид содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с человеческим ACE2 дикого типа SEQ ID NO: 1 и проявляет повышенное связывание с белком S коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) по сравнению с человеческим ACE2 дикого типа.

2. Модифицированный полипептид по п. 1, в котором по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой замену, выбранную из группы, состоящей из T27Y, L79T, N330Y, S19P, E23F, Q24T, A25V, K26I, K26A, K26D, T27M, T27L, T27A, T27D, T27K, T27H, T27W, T27F, T27C, L29F, D30I, D30E, K31W, K31Y, N33D, H34V, H34A, H34S, H34P, E35V, E35C, L39K, L39R, F40D, F40R, Y41R, Q42M, Q42L, Q42I, Q42V, Q42K, Q42C, A65W, W69I, W69V, I69T, I69K, F72Y, E75A, E75S, E75T, E75K, E75R, E75W, E75G, Q76M, Q76I, Q76V, Q76T, Q76R, Q76Y, L79I, L79V, L79W, L79Y, L79F, L79P, M82C, Q89I, Q89D, Q89P, N90M, N90L, N90I, N90V, N90A, N90S, N90T, N90Q, N90D, N90E, N90K, N90R, N90H, N90W, N90Y, N90F, N90P, N90G, N90C, L91P, T92M, T92L, T92I, T92V, T92A, T92N, T92Q, T92D, T92E, T92K, T92R, T92H, T92W, T92Y, T92F, T92P, T92G, T92C, T324E, T324P, Q325P, N330L, N330H, N330W, N330F, L351F, A386L, A386I, P389D, R393K и R518G применительно к SEQ ID NO: 1.

3. Модифицированный полипептид по п. 1, в котором по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой замену, выбранную из группы, состоящей из T27Y, L79T, N330Y, S19P, A25V, T27M, T27L, T27A, T27D, T27H, T27W, T27F, T27C, D30E, K31W, H34V, H34A, H34P, L39K, L39R, Q42M, Q42L, Q42C, W69V, F72Y, E75K, E75R, Q76V, Q76T, L79I, L79V, L79W, L79Y, L79F, Q89P, N90M, N90L, N90I, N90V, N90A, N90S, N90T, N90Q, N90D, N90E, N90K, N90R, N90H, N90P, N90G, N90C, L91P, T92M, T92L, T92I, T92V, T92A, T92N, T92Q, T92D, T92E, T92K, T92R, T92H, T92W, T92Y, T92F, T92P, T92G, T92C, T324E, T324P, Q325P, N330L, N330H, N330W, N330F, L351F и A386L применительно к SEQ ID NO: 1.

4. Модифицированный полипептид по п. 1, в котором по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой замену, выбранную из группы, состоящей из T27Y, L79T, N330Y, A25V, T27M, T27L, K31W, H34V, H34A, H34P, Q42L, Q42C, L79I, L79V, L79W, L79Y, L79F, N90A, N90S, N90T, N90Q, N90E, N90H, L91P, T92M, T92L, T92I, T92V, T92N, T92Q, T92D, T92E, T92R, T92H, T92W, T92Y, T92F, T92G, T92C, T324P, Q325P, N330H, N330W, N330F и A386L применительно к SEQ ID NO: 1.

5. Модифицированный полипептид по п. 1, в котором по меньшей мере одна аминокислотная замена находится в остатке 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 65, 69, 72, 75, 76, 79, 82, 89, 90, 91, 92, 324, 325, 330, 351, 386, 389, 393 или 518 человеческого ACE2 из SEQ ID NO: 1.

6. Модифицированный полипептид по п. 5, в котором по меньшей мере одна аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из T27Y, L79T, N330Y, S19P, A25V, K26D, L29F, N33D, L39R, F40D, W69V, F72Y, Q76T, Q89P, L91P, T324P, T324E, Q325P, R518G, L351F, A386L, Q24T, T27H, D30E, K31Y, H34A, Y41R, Q42L, Q42K, E75K, L79V, N90Q, T92Q, N330H и R393K применительно к SEQ ID NO: 1.

7. Модифицированный полипептид по любому из пп. 1-6, в котором по меньшей мере одна аминокислотная замена удаляет мотив гликозилирования в остатках N90, L91 и T92 человеческого ACE2 SEQ ID NO: 1.

8. Модифицированный полипептид по любому из пп. 1-6, содержащий:

- аминокислотные замены T27Y, L79T и N330Y;
 - аминокислотные замены H34A, T92Q, Q325P и A386L;
 - аминокислотные замены T27Y, L79T, N330Y и A386L;
 - аминокислотные замены L79T, N330Y и A386L;
 - аминокислотные замены T27Y, N330Y и A386L;
 - аминокислотные замены T27Y, L79T и A386L;
 - аминокислотные замены A25V, T27Y, T92Q, Q325P и A386L;
 - аминокислотные замены H34A, L79T, N330Y и A386L;
 - аминокислотные замены A25V, T92Q и A386L; или
 - аминокислотные замены T27Y, Q42L, L79T, T92Q, Q325P, N330Y и A386L,
- где аминокислотные замены относятся к SEQ ID NO: 1.

9. Модифицированный полипептид по любому из пп. 1-6, имеющий одну аминокислотную замену относительно человеческого ACE2 SEQ ID NO: 1.

10. Модифицированный полипептид по любому из пп. 1-9, содержащий полноразмерный человеческий ACE2, и содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с человеческим ACE2 дикого типа.

11. Модифицированный полипептид по п. 10, где аминокислотная последовательность полипептида по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1.

12. Модифицированный полипептид по п. 10, где аминокислотная последовательность полипептида по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 1.

13. Модифицированный полипептид по любому из пп. 1-9, состоящий из фрагмента человеческого ACE2.

14. Модифицированный полипептид по п. 13, где фрагмент человеческого ACE2 представляет собой внеклеточный фрагмент.

15. Модифицированный полипептид по п. 14, где внеклеточный фрагмент соответствует остаткам с 19 по 615 человеческого ACE2 SEQ ID NO: 1.

16. Модифицированный полипептид по п. 14, где внеклеточный фрагмент соответствует остаткам с 20 по 615 человеческого ACE2 SEQ ID NO: 1.

17. Модифицированный полипептид по любому из пп. 14-16, в котором аминокислотная последовательность внеклеточного фрагмента по меньшей мере на 95% идентична остаткам с 19 по 615 SEQ ID NO: 1.

18. Модифицированный полипептид по любому из пп. 14-17, где аминокислотная последовательность внеклеточного фрагмента по меньшей мере на 99% идентична остаткам с 19 по 615 SEQ ID NO: 1.

19. Модифицированный полипептид по п. 13, где фрагмент соответствует остаткам 1-732, 19-732 или 19-740 человеческого ACE2 SEQ ID NO: 1.

20. Модифицированный полипептид по п. 19, где фрагмент соответствует остаткам 19-732 человеческого ACE2 SEQ ID NO: 1.

21. Модифицированный полипептид по п. 20, где аминокислотная последовательность фрагмента состоит из SEQ ID NO: 10.

22. Модифицированный полипептид по любому из пп. 1-21, где полипептид образует димер.

23. Слитый белок, содержащий модифицированный полипептид по любому из пп. 1-22 и гетерологичный полипептид.

24. Слитый белок по п. 23, где гетерологичный полипептид представляет собой белок Fc.

25. Слитый белок по п. 24, где белок Fc представляет собой белок Fc человека.

26. Слитый белок по п. 25, где белок Fc человека представляет собой Fc IgG1 человека.

27. Слитый белок по любому из пп. 23-26, где аминокислотная последовательность слитого белка содержит или состоит из SEQ ID NO: 11.

28. Слитый белок по п. 23, где гетерологичный полипептид представляет собой флуоресцентный белок, фермент, антитело или антигенсвязывающий белок, цитокин, клеточный лиганд или рецептор, или сывороточный альбумин.

29. Композиция, содержащая модифицированный полипептид по любому из пп. 1-22 или слитый белок по любому из пп. 23-28, и фармацевтически приемлемый носитель.

30. Композиция по п. 29, приготовленная для интратрахеального или

ингаляционного введения.

31. Способ ингибирования репликации коронавируса (CoV) *in vitro*, включающий обеспечение контакта CoV с модифицированным полипептидом по любому из пп. 1-22 или слитым белком по любому из пп.23-28.

32. Способ ингибирования репликации и/или распространения коронавируса (CoV) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества модифицированного полипептида по любому из пп. 1-22, слитого белка по любому из пп. 23-28, или композиции по п. 29 или п. 30, обеспечивающее ингибирование репликации и/или распространения CoV у субъекта.

33. Способ по п. 32, включающий введение модифицированного полипептида или слитого белка внутривенно, интратрахеально или путем ингаляции.

34. Способ по п. 33, где модифицированный полипептид или слитый белок вводят путем ингаляции с использованием небулайзера.

35. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая модифицированный полипептид по любому из пп. 1-22 или слитый белок по любому из пп. 23-28.

36. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 35.

37. Композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 35 или вектор по п. 36, и фармацевтически приемлемый носитель.

38. Способ ингибирования репликации и/или распространения коронавируса (CoV) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты по п. 35, вектора по п. 36 или композиции по п. 37, обеспечивающего ингибирование репликации и/или распространения CoV у субъекта.

39. Способ по любому из пп. 32-34 и п. 38, где субъектом является (i) медицинский работник; (ii) пациент с положительным результатом на CoV; (iii) пациент с COVID-19; (iv) субъект пожилого возраста или имеющий сопутствующие заболевания; или (iv) субъект, подвергшийся воздействию CoV.

40. Способ по п. 38 или 39, где молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или композицию вводят внутривенно, интратрахеально или ингаляционно.

41. Способ детекции коронавируса (CoV) в биологическом образце, включающий:

- обеспечение контакта биологического образца с модифицированным полипептидом по любому из пп. 1-22 или слитым белком по любому из пп. 23-28; и
- детекцию связывания модифицированного полипептида или слитого белка с биологическим образцом, обеспечивающую выявление CoV в биологическом образце.

42. Способ по п. 41, в котором биологический образец представляет собой образец

крови, слюны, мокроты, мазка из носа или бронхоальвеолярного лаважа.

43. Способ по любому из пп. 31-34 и 38-42, где коронавирус представляет собой коронавирус человека.

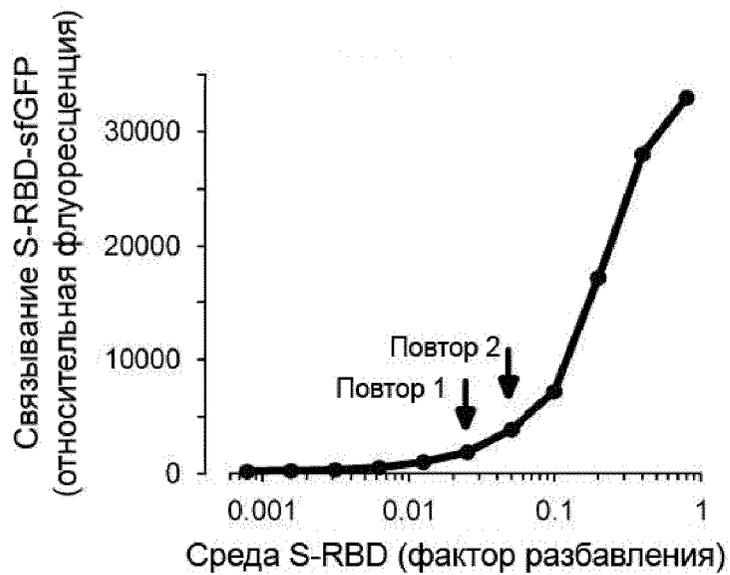
44. Способ по п. 43, где коронавирус человека представляет собой коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), SARS-CoV-2, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), человеческий коронавирус HKU1 (HKU1-CoV), человеческий коронавирус OC43 (OC43-CoV), человеческий коронавирус 229E (229E-CoV) или человеческий коронавирус NL63 (NL63-CoV).

45. Способ по любому из пп. 31-34 и 38-42, где коронавирус представляет собой зоонозный коронавирус.

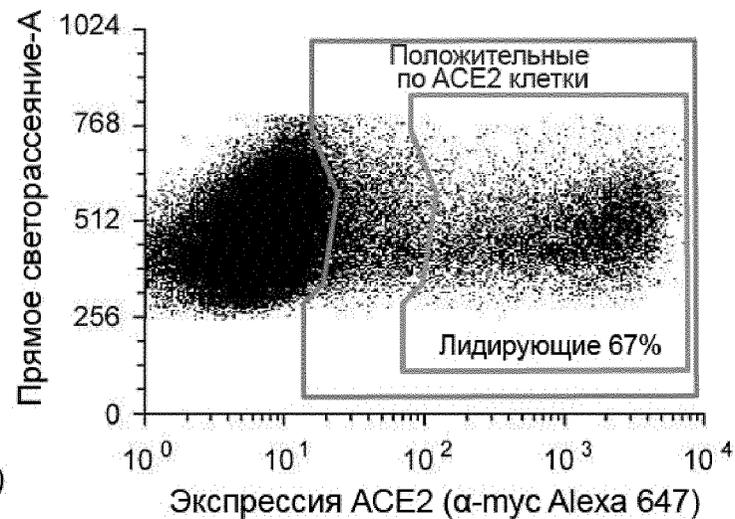
46. Способ по п. 45, где зоонозный коронавирус представляет собой коронавирус летучих мышей или коронавирус грызунов.

47. Способ по п. 46, где коронавирус летучих мышей представляет собой LYRa11, Rs4231, Rs7327, Rs4084 или RsSHC014.

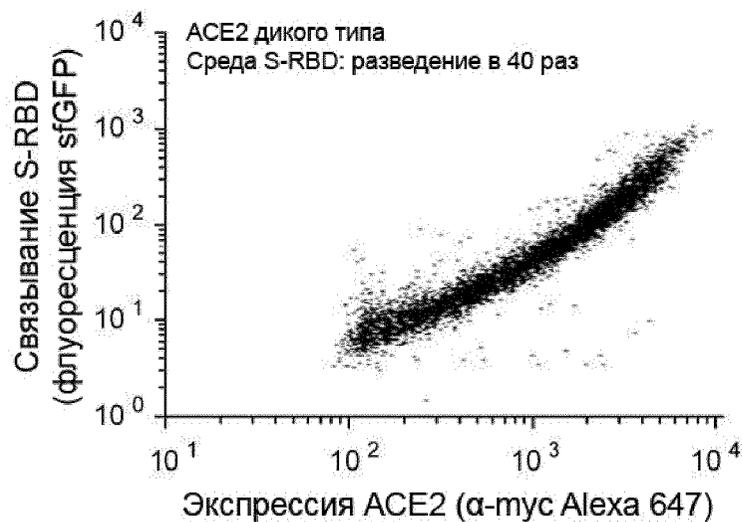
48. Набор, содержащий модифицированный полипептид по любому из пп. 1-22 или слитый белок по любому из пп. 23-28, связанный с твердой подложкой.



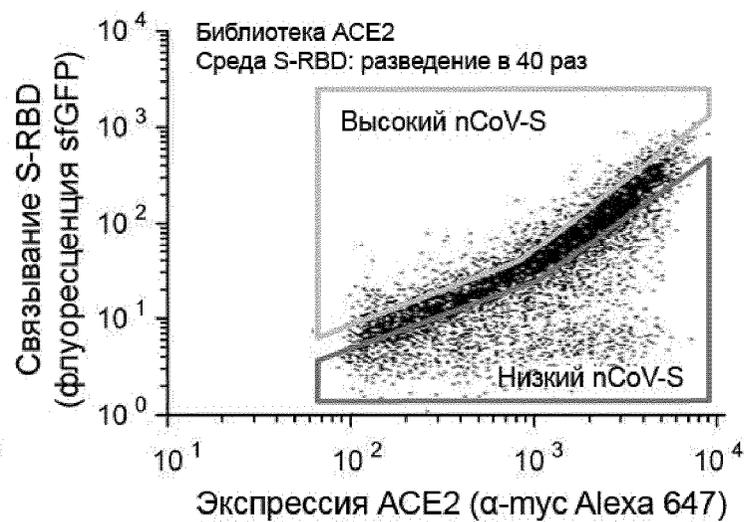
Фиг. 1А



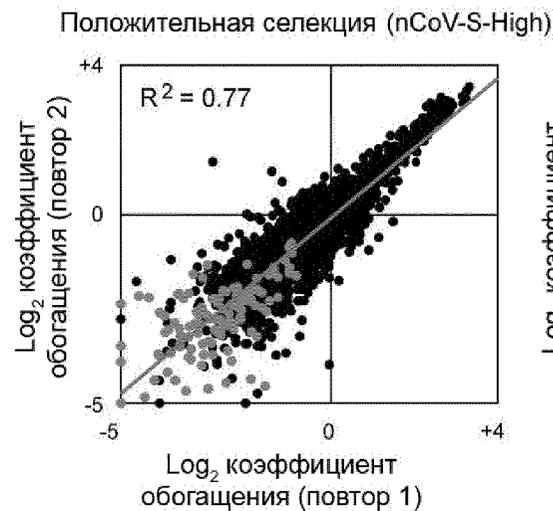
Фиг. 1В



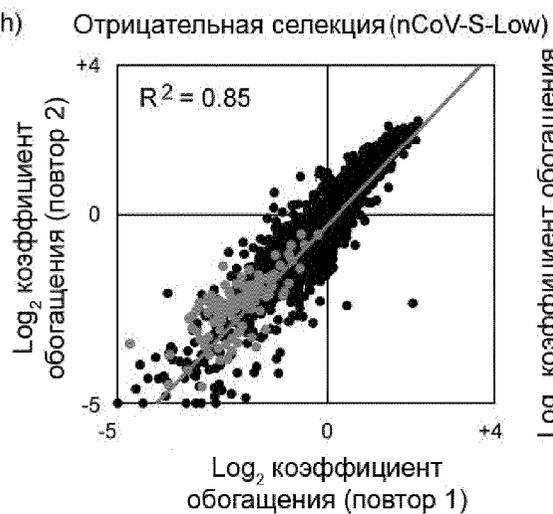
Фиг. 1С



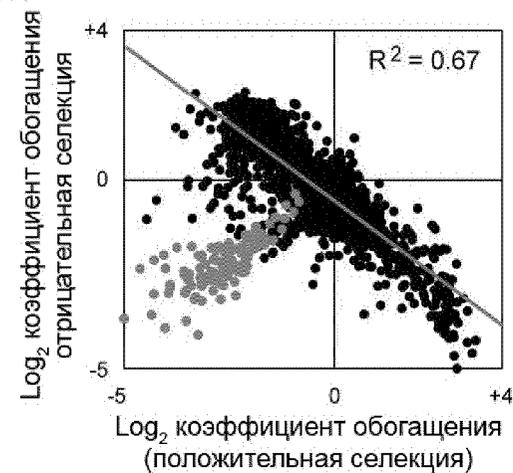
Фиг. 1D



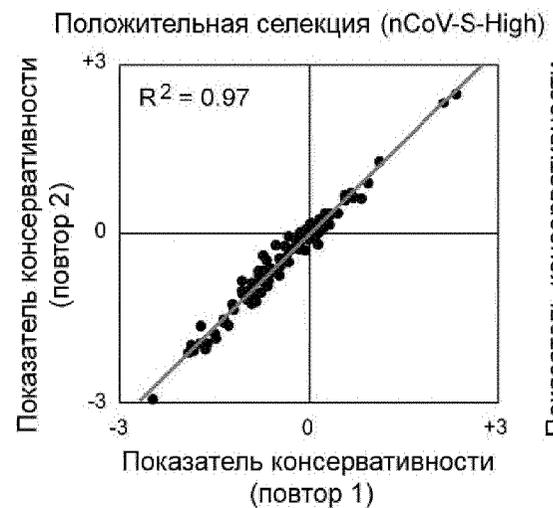
Фиг. 3А



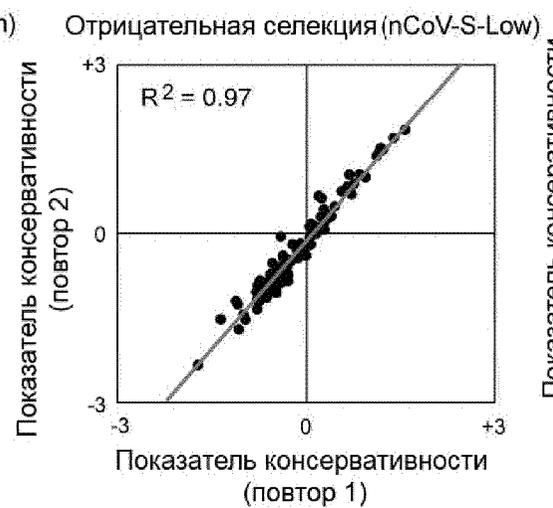
Фиг. 3В



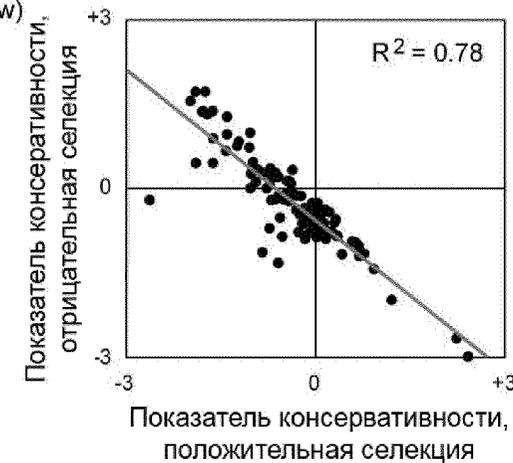
Фиг. 3С



Фиг. 3Д

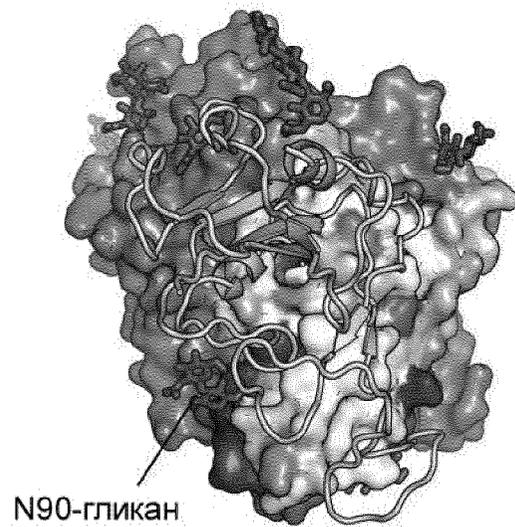
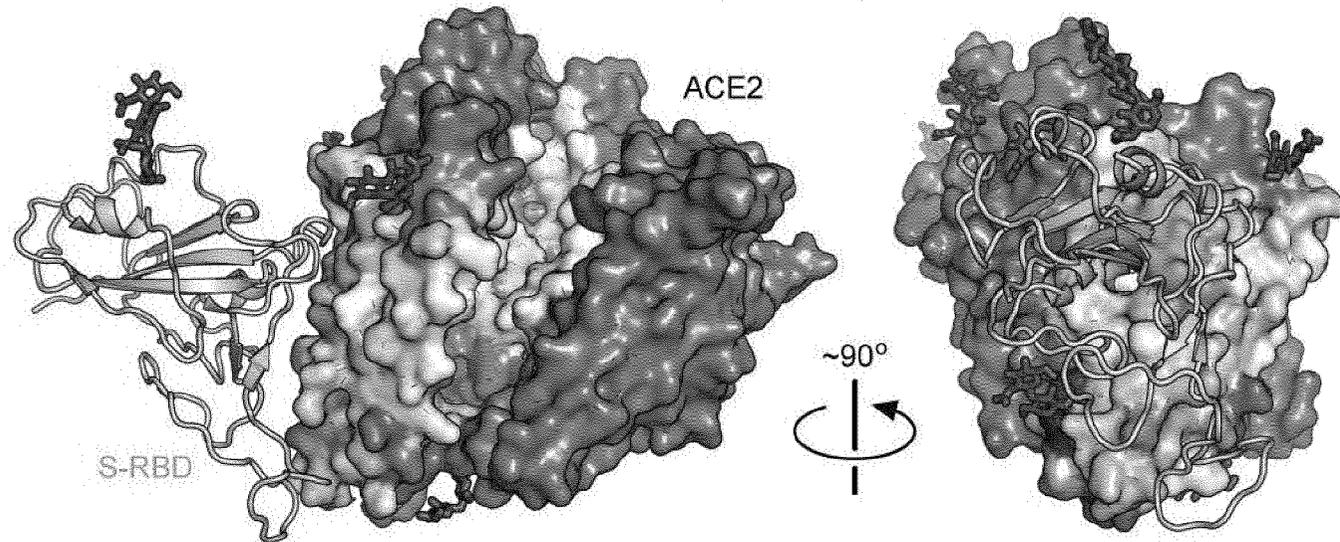


Фиг. 3Е



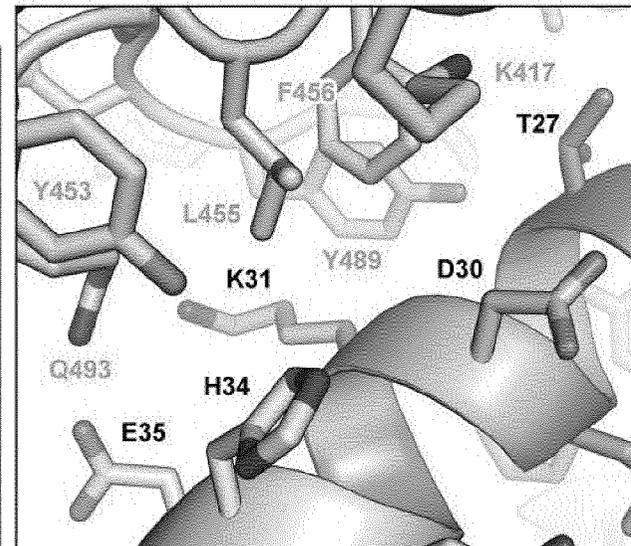
Фиг. 3Ф

Фиг. 4А

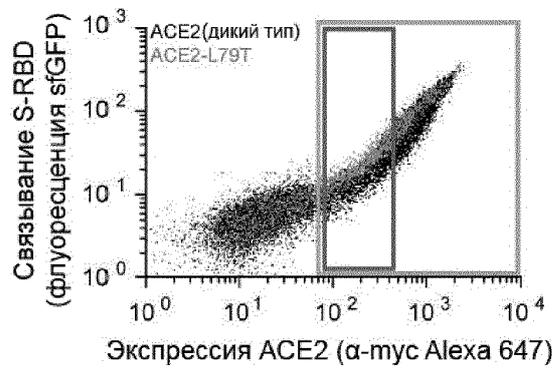


Фиг. 4В

	T27	D30	K31
M			
L			
I			
V			
A			
S			
T	WT		
N			
Q			
D		WT	
E			
K			WT
R			
R			
H			
W			
Y			
F			
P			
G			
C			
*			

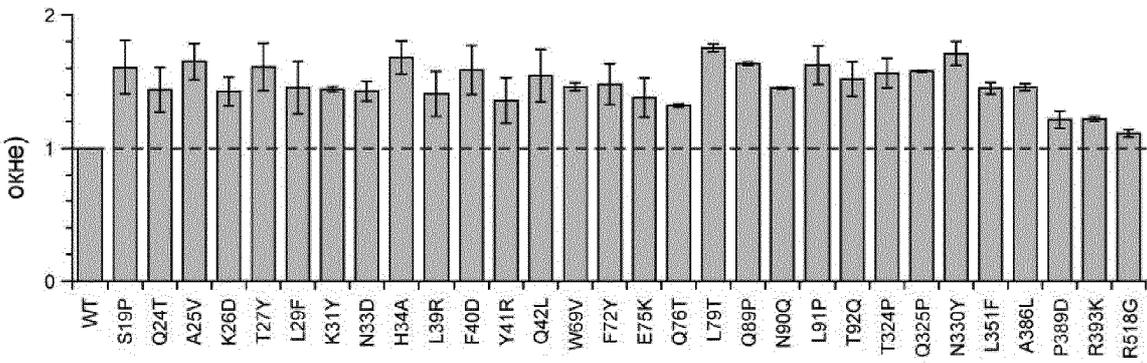


Фиг. 4С



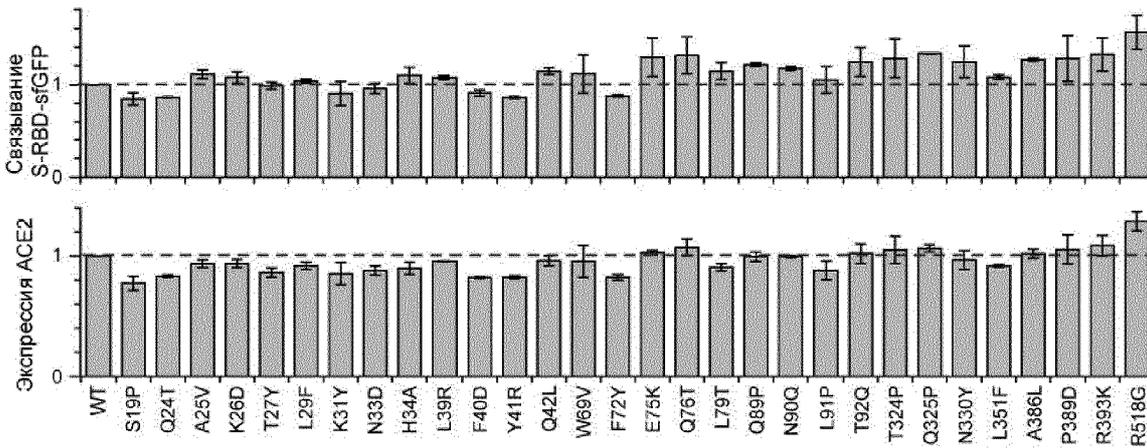
Фиг. 5А

Связывание S-RBD-sfGFP
(относительное изменение среднего значения флуоресценции в синем окне)

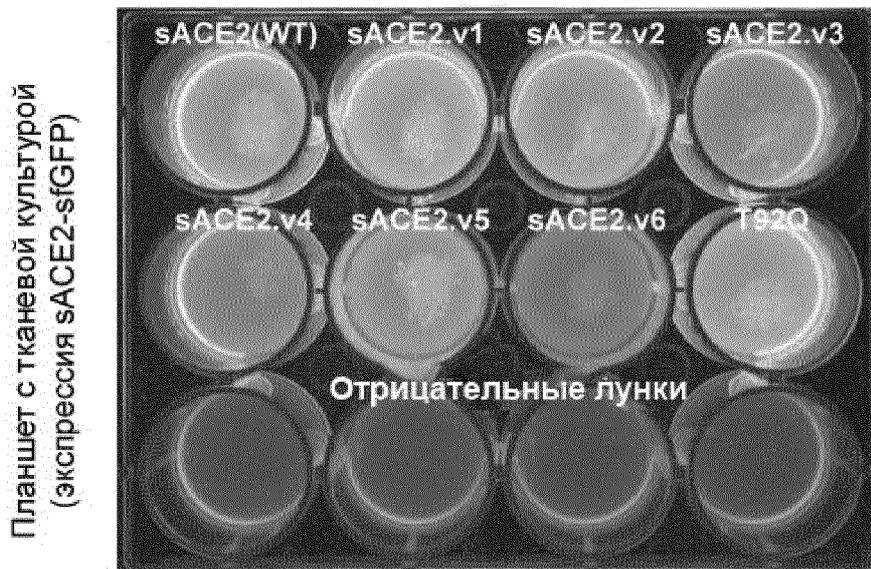


Фиг. 5В

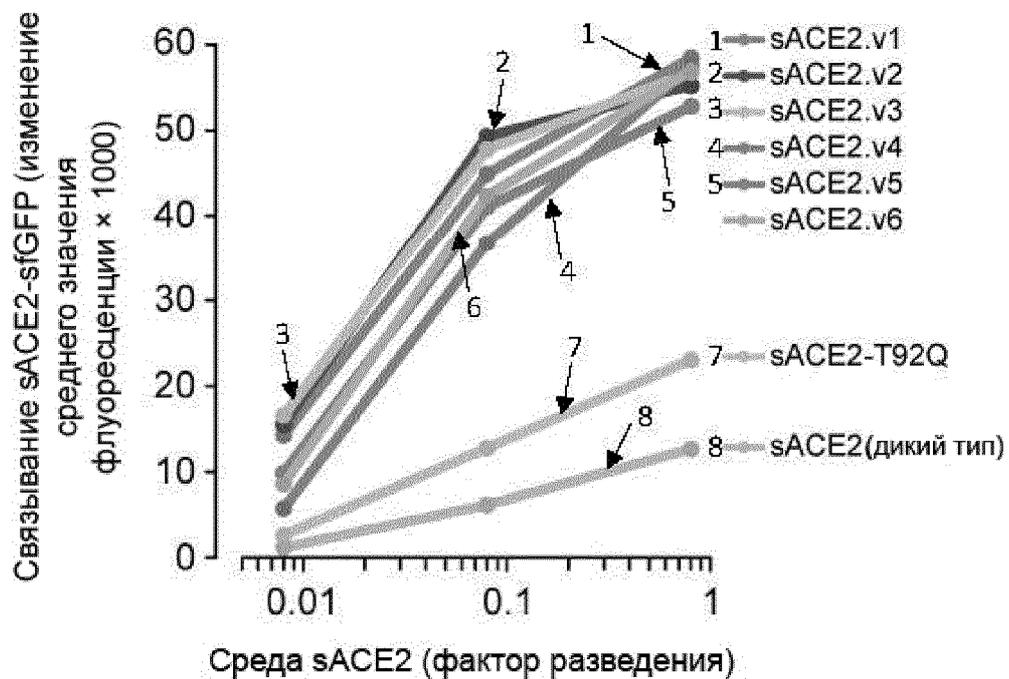
Относительное изменение среднего значения флуоресценции в зеленом окне



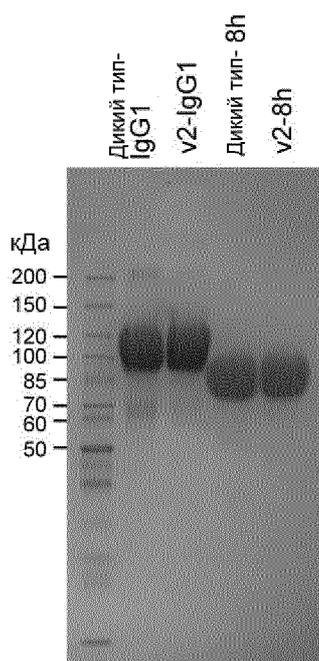
Фиг. 5С



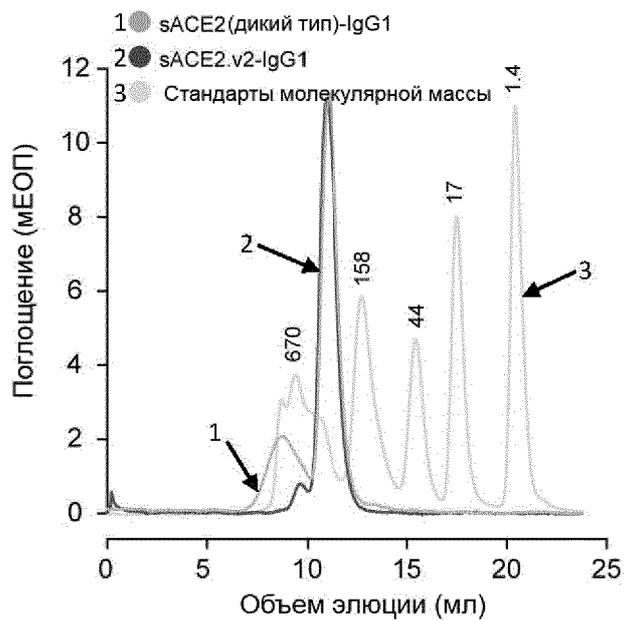
Фиг. 6А



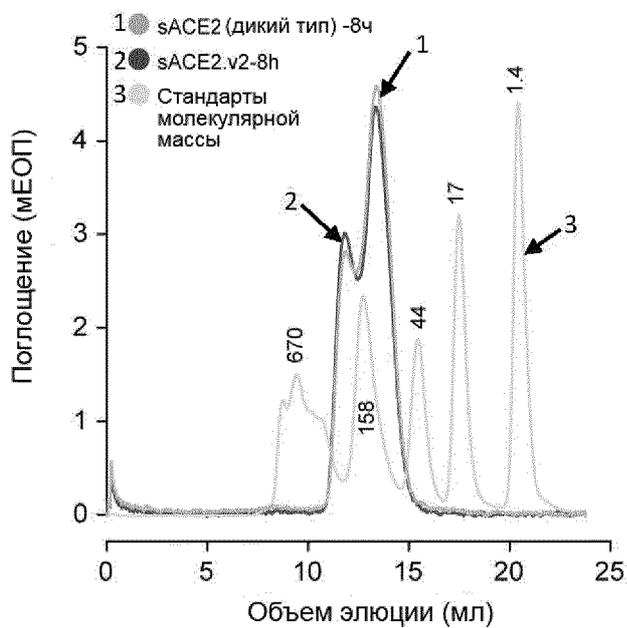
Фиг. 6В



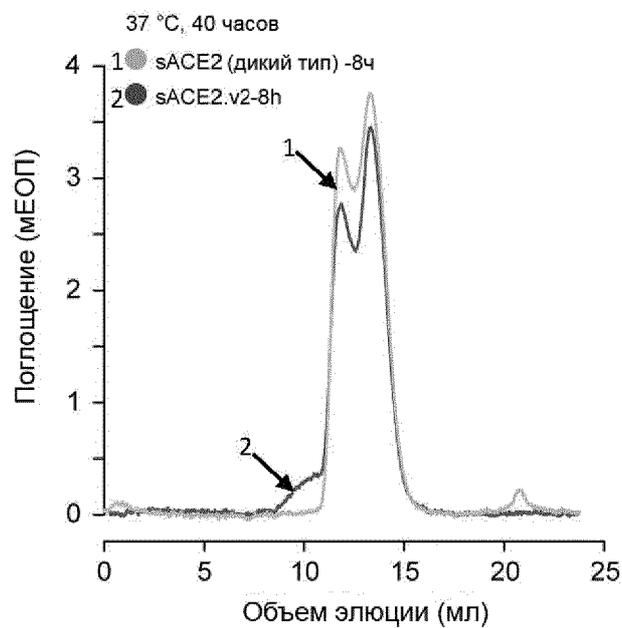
Фиг. 7А



Фиг. 7В

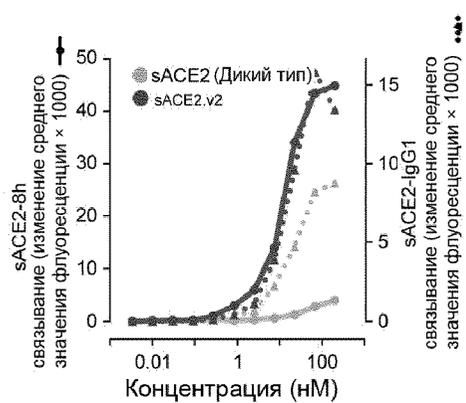


Фиг. 7С

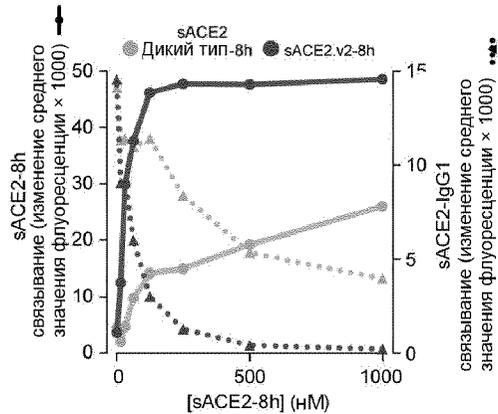


Фиг. 7D

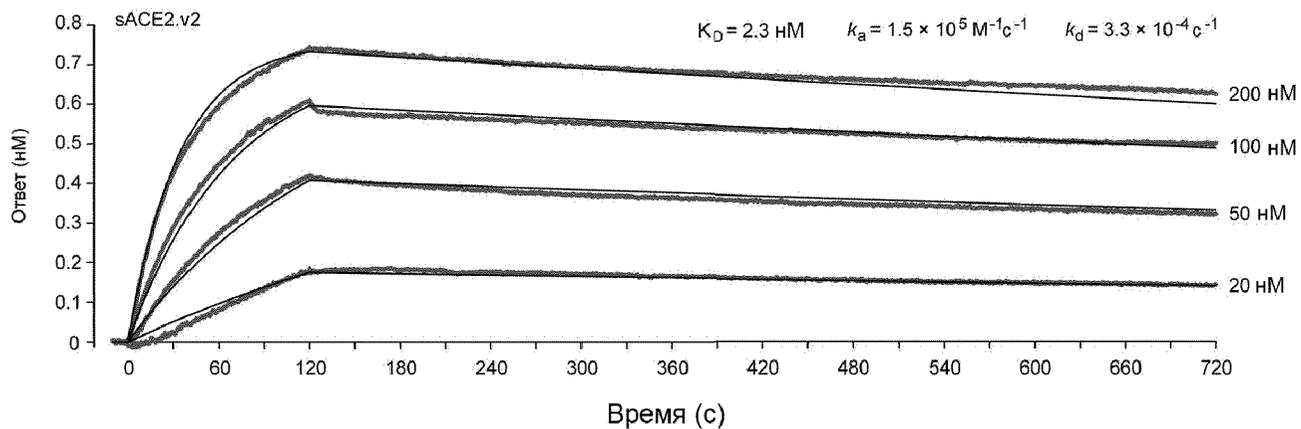
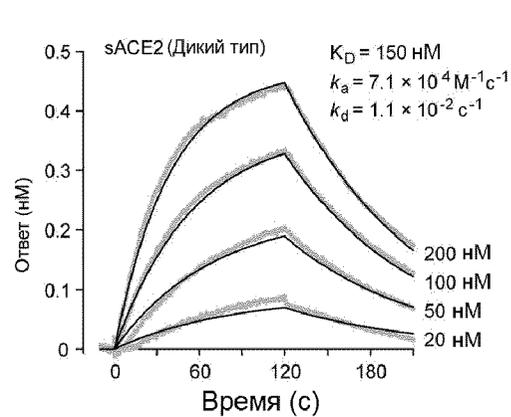
Фиг. 8А



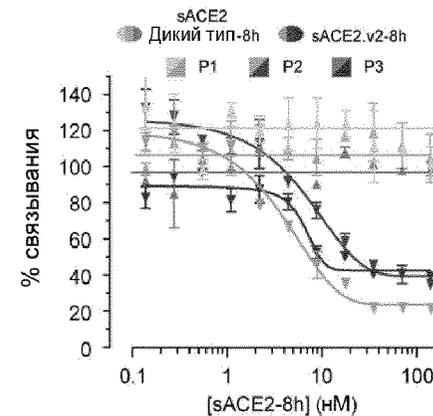
Фиг. 8В



Фиг. 8С

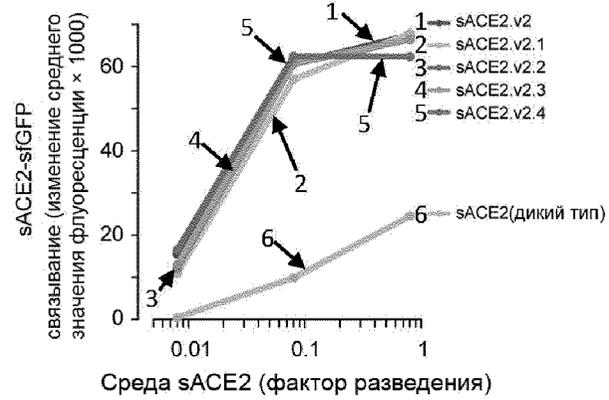


Фиг. 8D

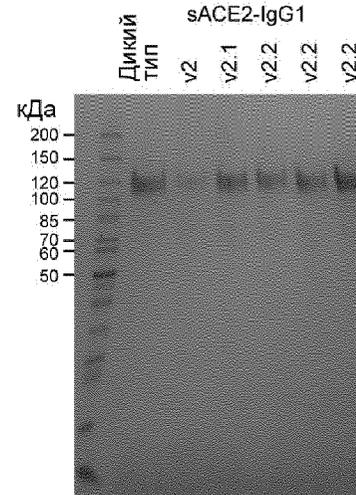


Фиг. 8Е

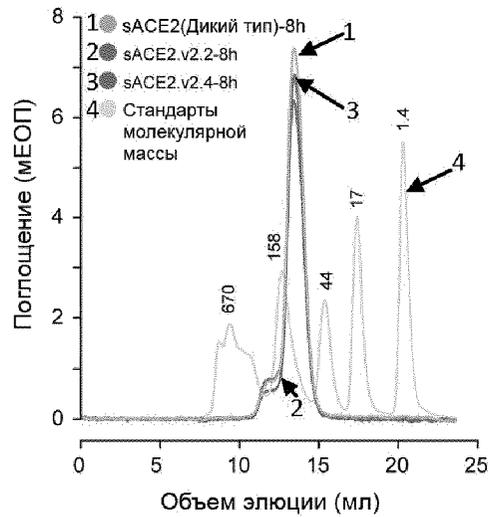
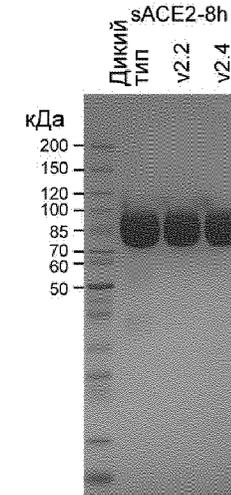
Фиг. 9А



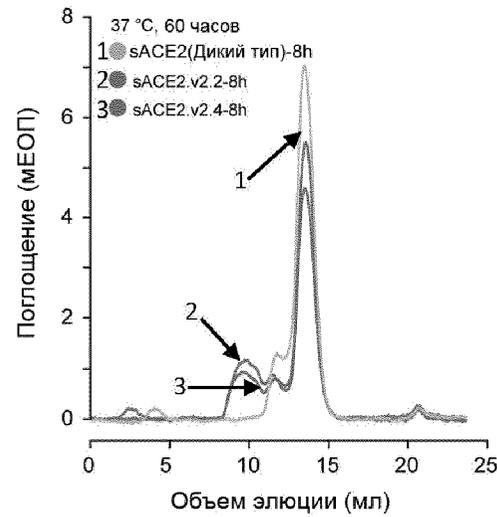
Фиг. 9В



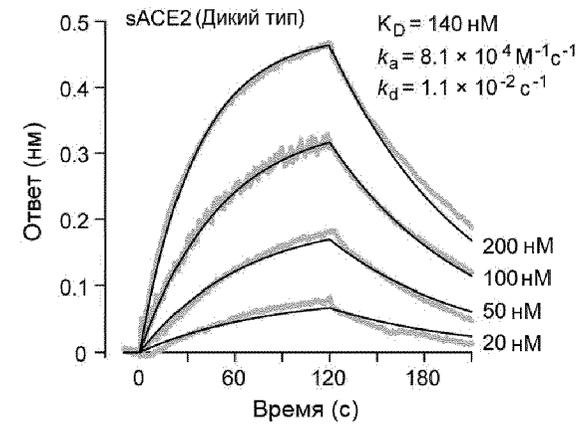
Фиг. 9С



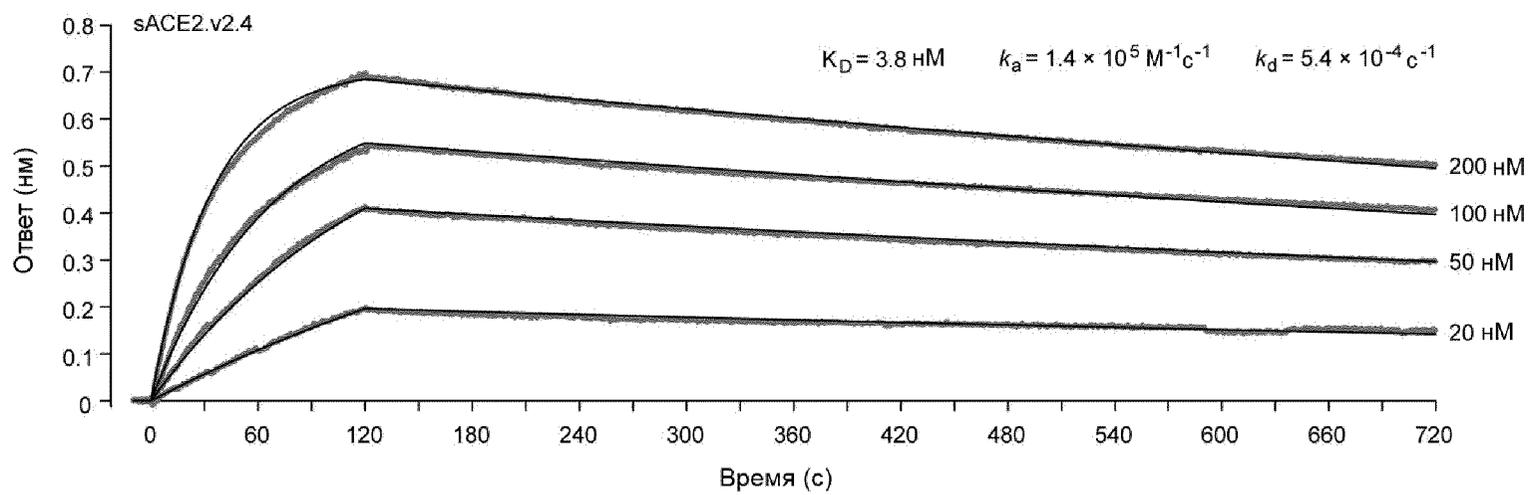
Фиг. 9D



Фиг. 9Е

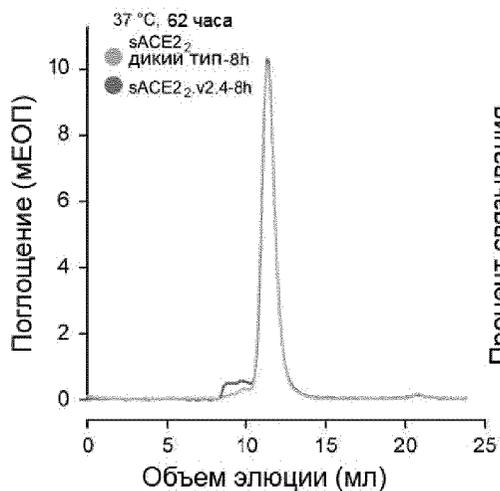


Фиг. 9F

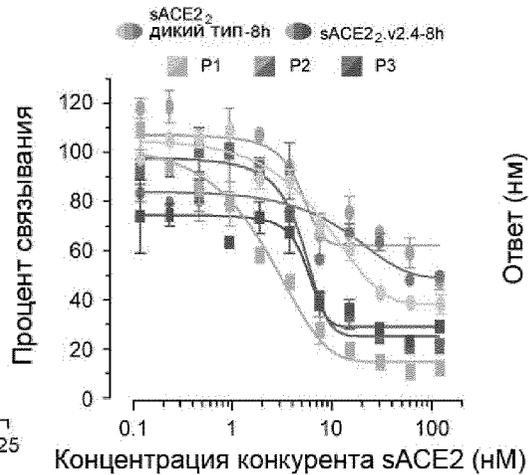


Фиг. 9G

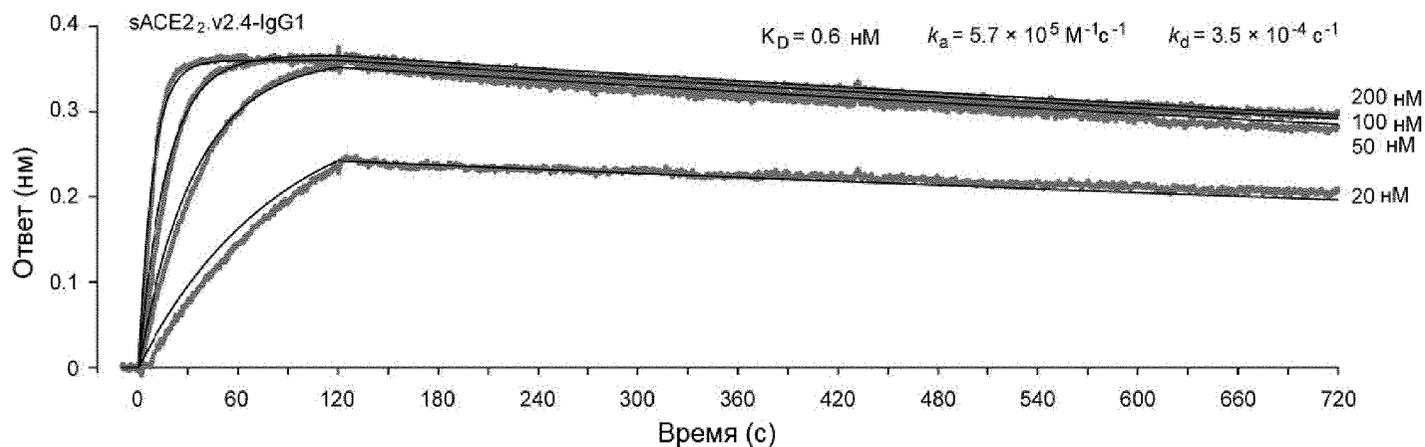
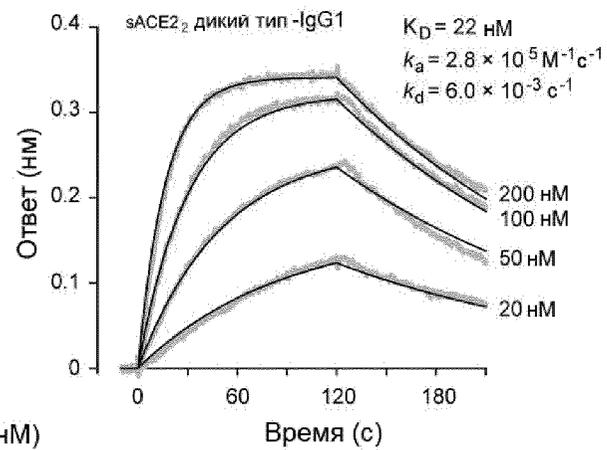
Фиг. 10А



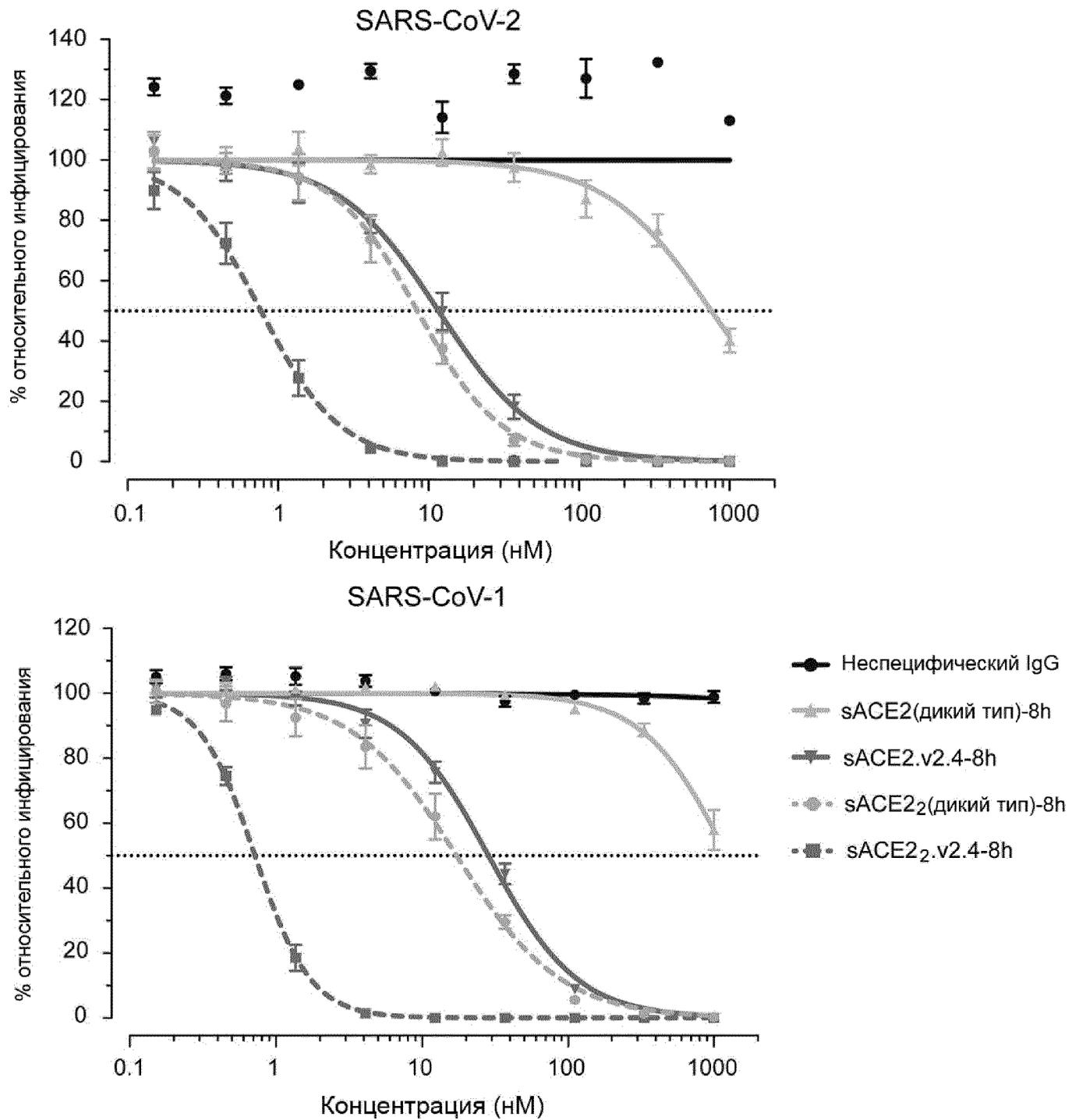
Фиг. 10В



Фиг. 10С

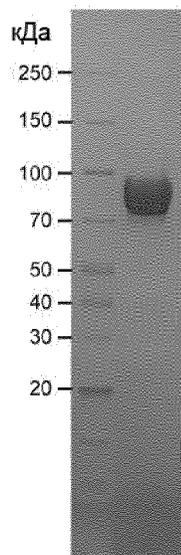


Фиг. 10D

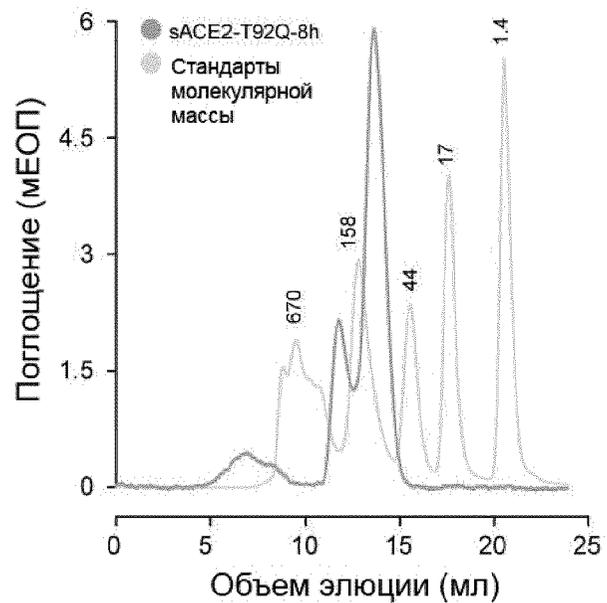


Фиг. 11

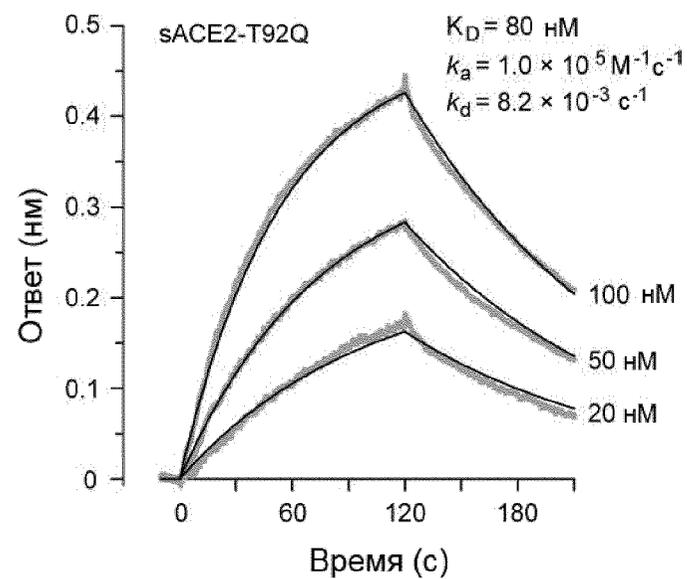
Фиг. 12А



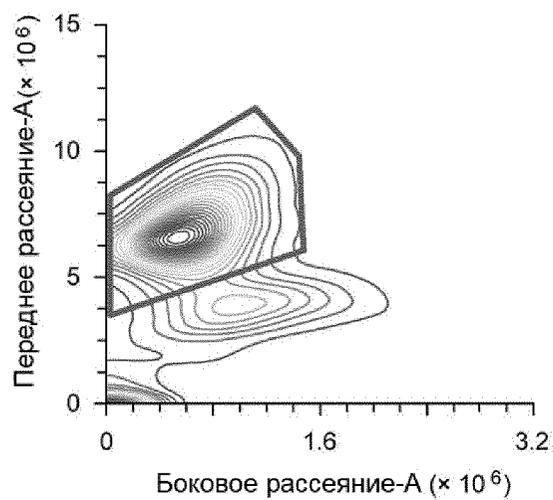
Фиг. 12В



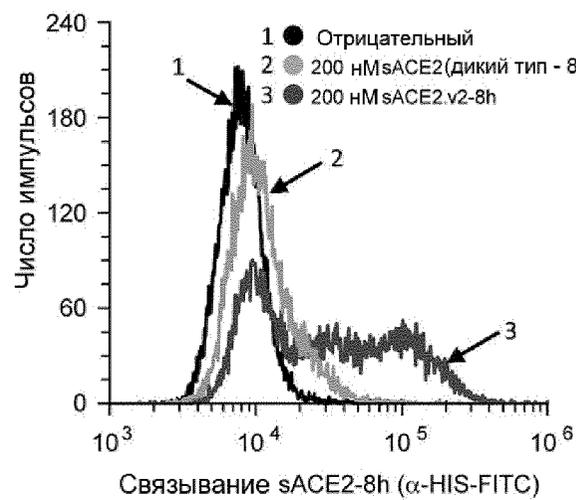
Фиг. 12С



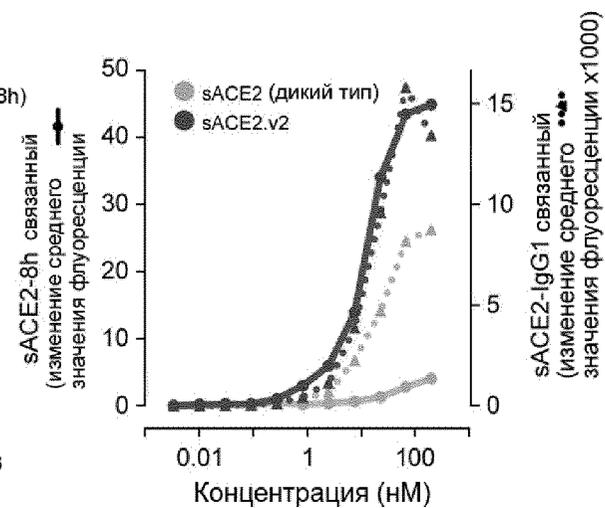
Фиг. 13А



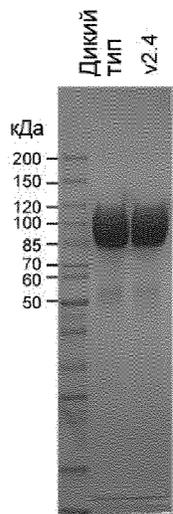
Фиг. 13В



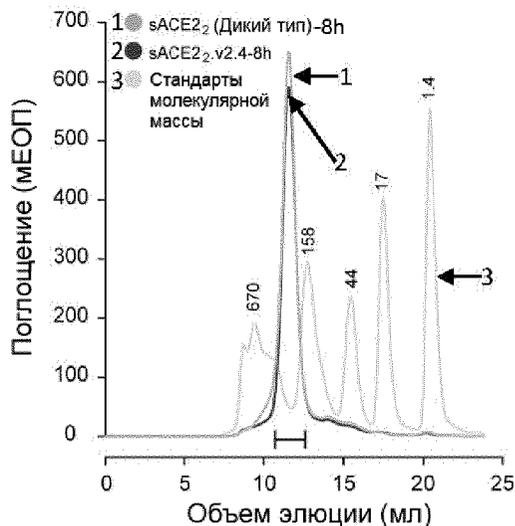
Фиг. 13С



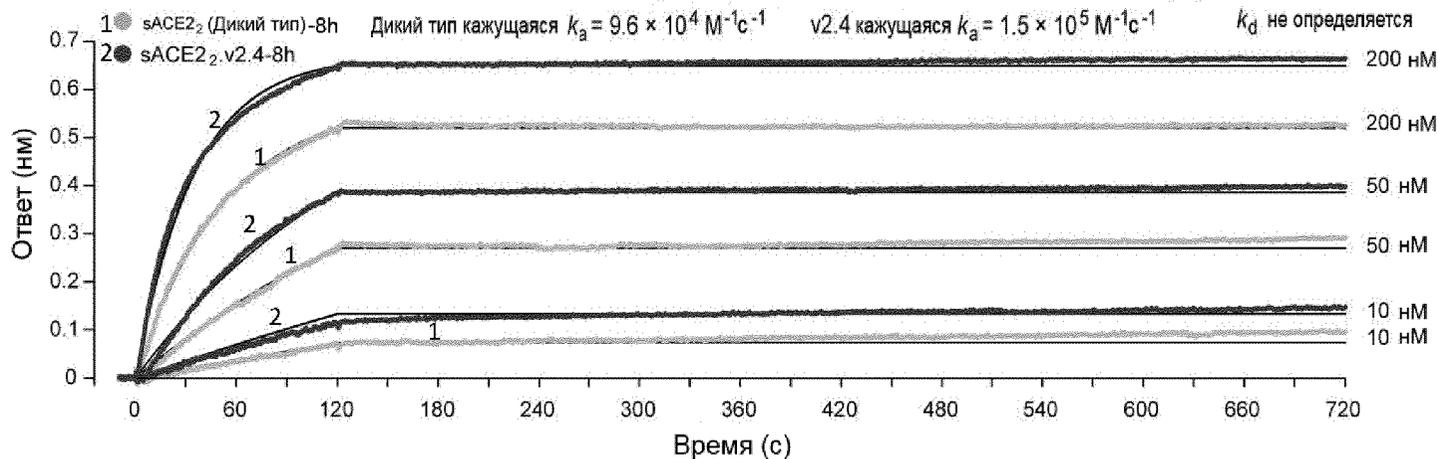
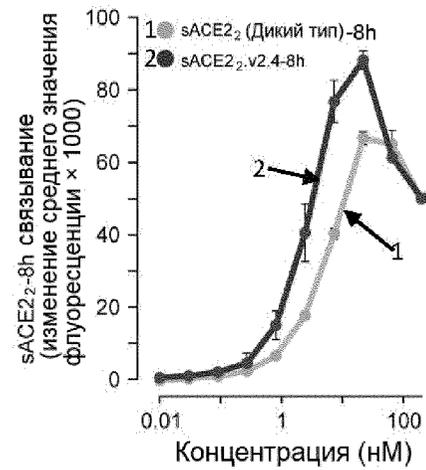
Фиг. 14А



Фиг. 14В

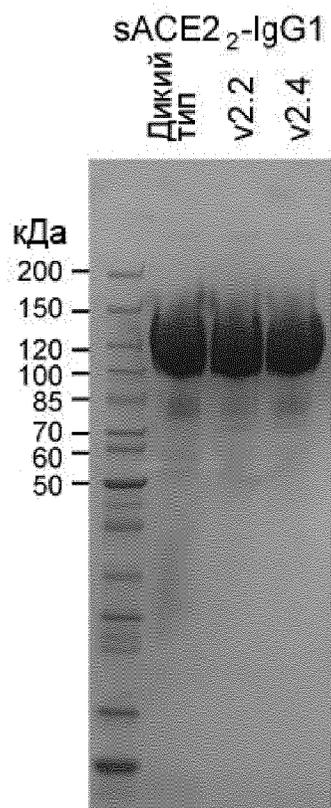


Фиг. 14С

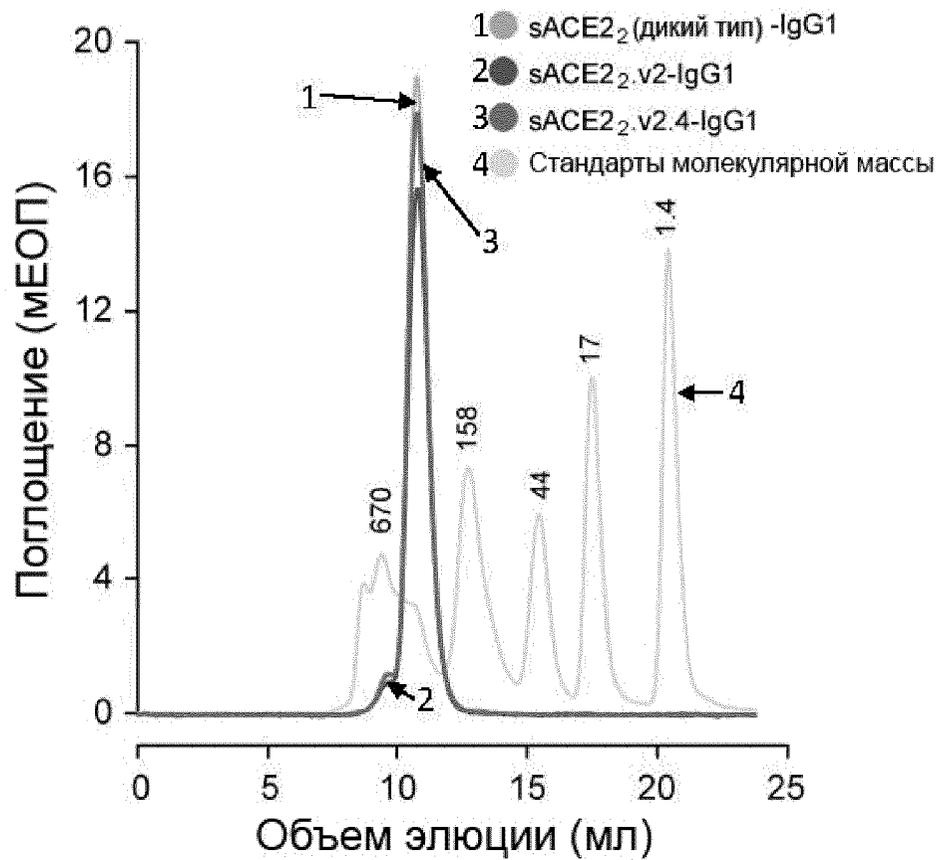


Фиг. 14D

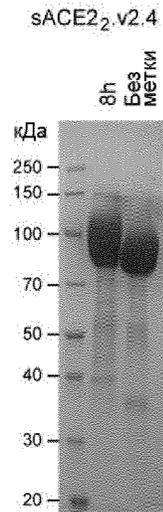
Фиг. 15А



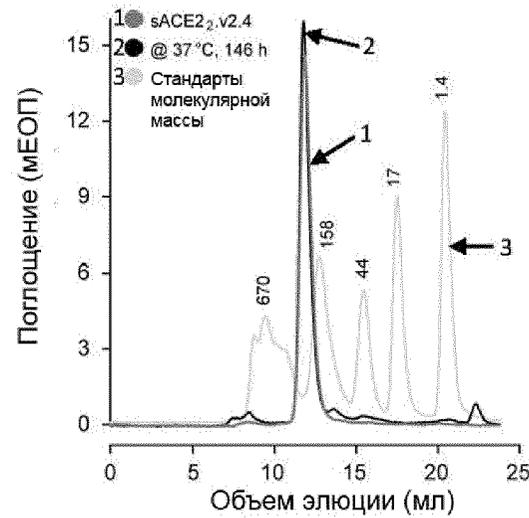
Фиг. 15В



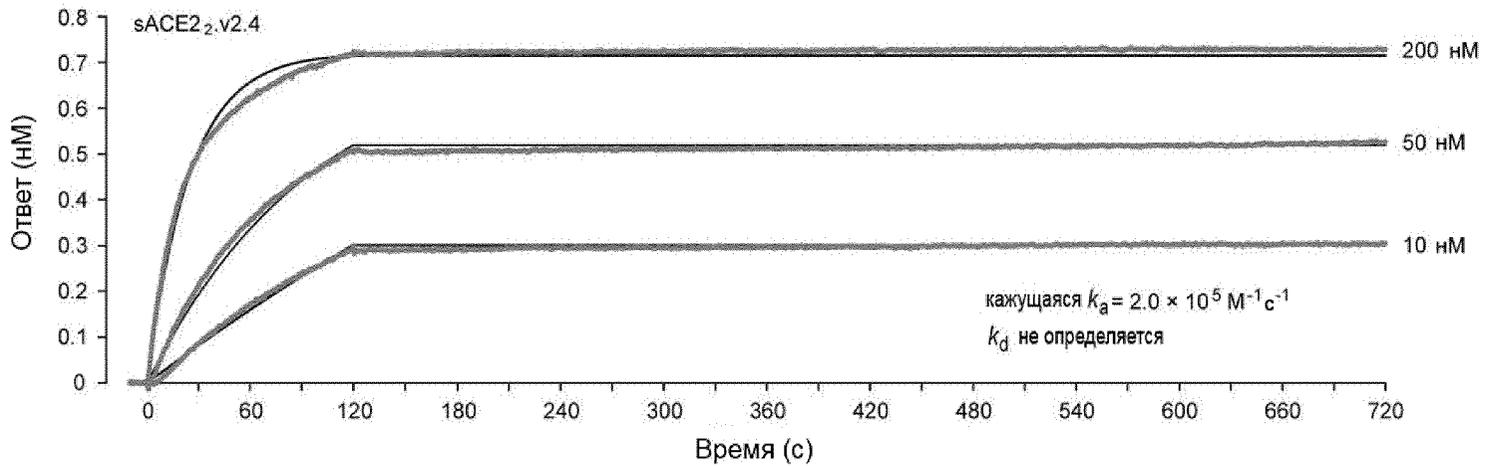
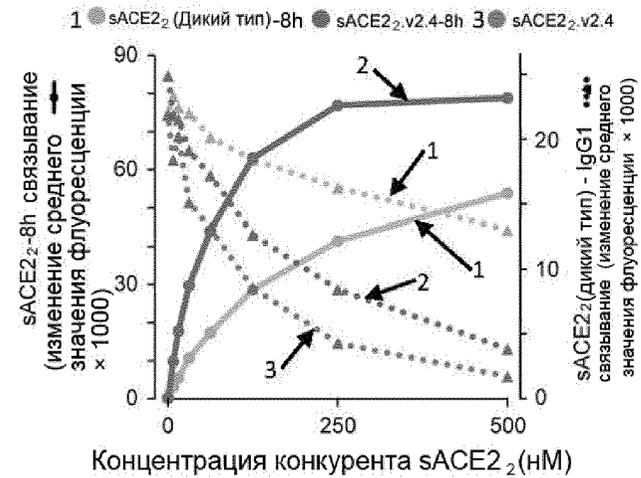
Фиг. 16А



Фиг. 16В

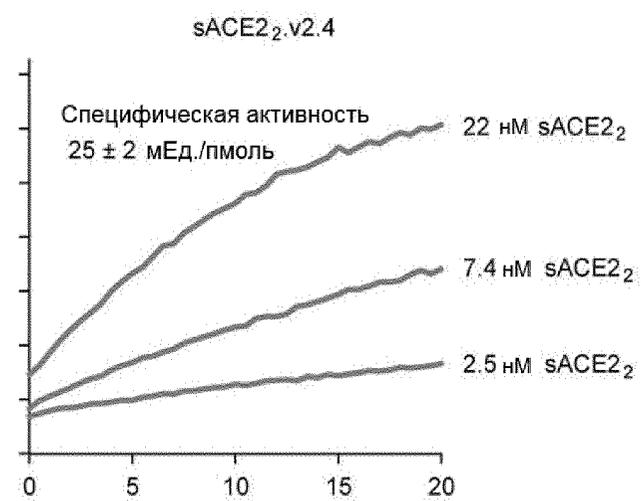
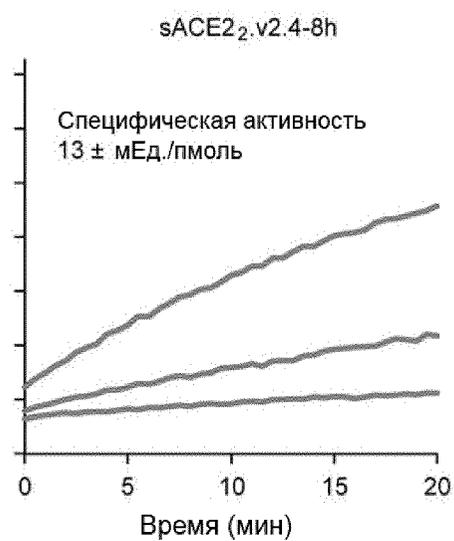
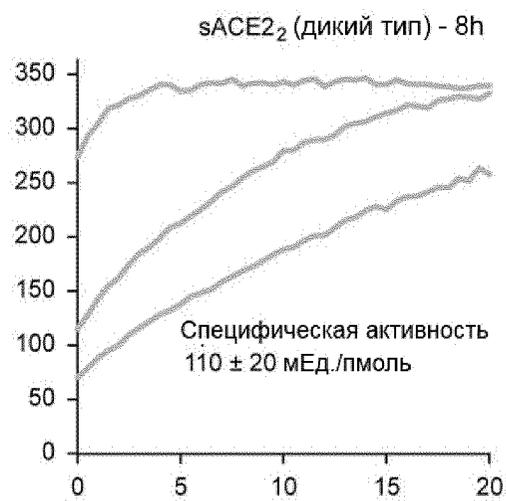


Фиг. 16С

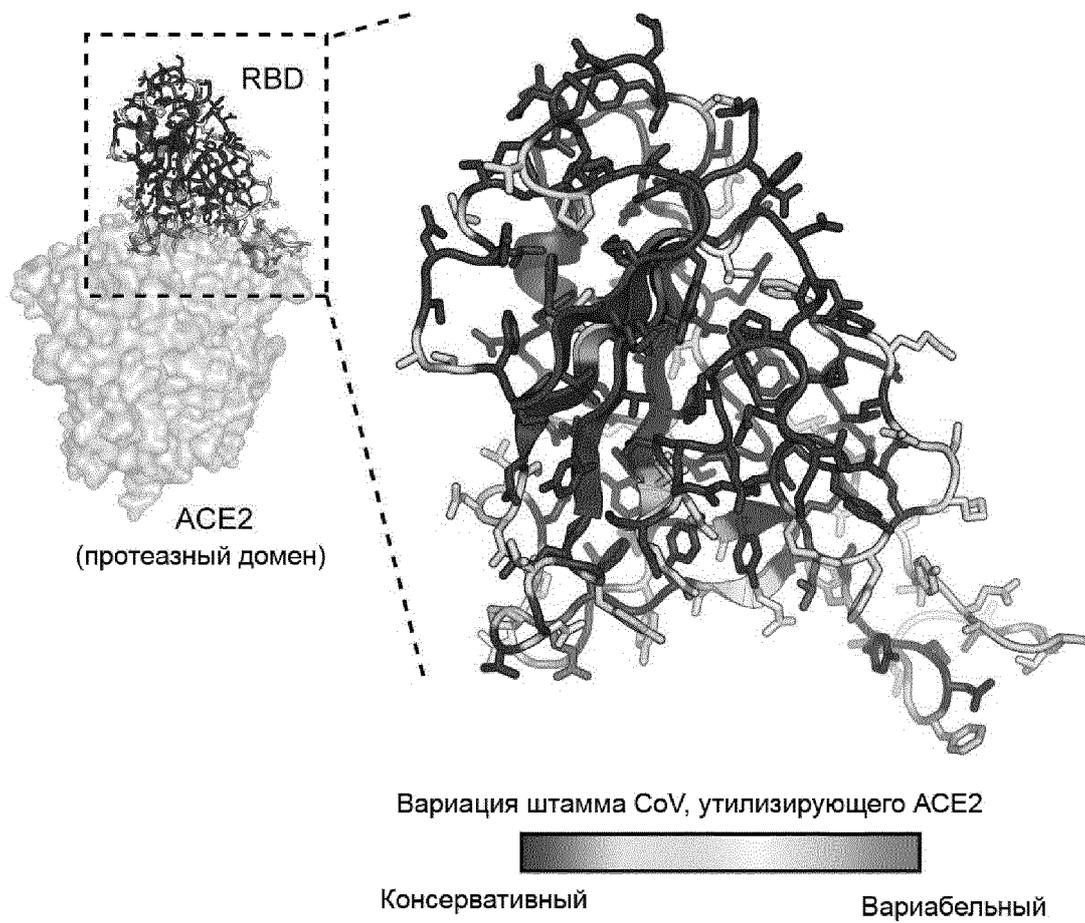


Фиг. 16D

Высвобождение продукта (относительные единицы флуоресценции x1000)



Фиг. 17

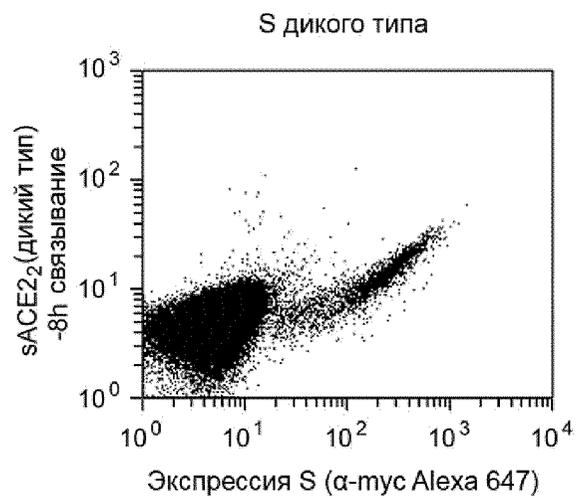


Фиг. 18

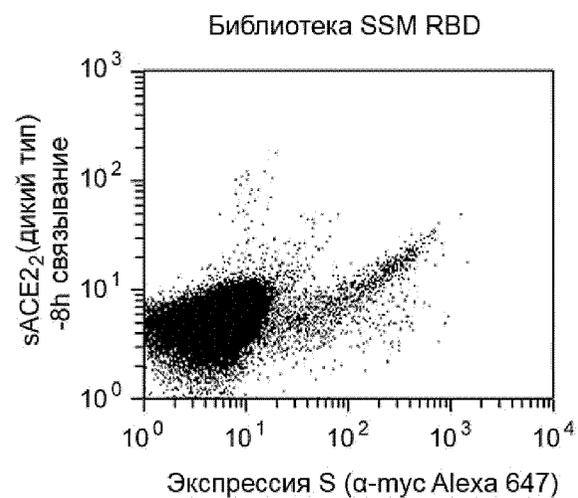
	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430																				
SARS-2	TNLC	PFGE	VFNAT	RFAS	VYAWN	RKRIS	NCVAD	YSVLYN	SASF	STFKCY	GVSP	TKLND	LCFT	NVYAD	SFVIR	GDEV	RQIAP	GQTG	KIAD	YNYKL	PDDFT	GTC								
SARS-1	TNLC	PFGE	VFNAT	KFPS	VYAWER	KKIS	NCVAD	YSVLYN	STFF	STFKCY	GVSA	TKLND	LCFS	NVYAD	SFVVK	GDDV	RQIAP	GQTG	VIAD	YNYKL	PDDFM	GMC								
Rs4084	TNLC	PFGE	VFNAT	TFPS	VYAWER	KRIS	NCVAD	YSILYN	STSF	STFKCY	GVSA	TKLND	LCFS	NVYAD	SFVVK	GDDV	RQIAP	GQTG	VIAD	YNYKL	PDDFL	GCG								
RsSHC014	TNLC	PFGE	VFNAT	TFPS	VYAWER	KRIS	NCVAD	YSVLYN	STSF	STFKCY	GVSA	TKLND	LCFS	NVYAD	SFVVK	GDDV	RQIAP	GQTG	VIAD	YNYKL	PDDFL	GCG								
Rs4231	TNLC	PFGE	VFNAT	TFPS	VYAWER	KRIS	NCVAD	YSVLYN	STSF	STFKCY	GVSA	TKLND	LCFS	NVYAD	SFVVK	GDDV	RQIAP	GQTG	VIAD	YNYKL	PDDFL	GCG								
LYRa11	TNLC	PFGE	VFNAT	TFPS	VYAWER	KRIS	NCVAD	YSVLYN	STSF	STFKCY	GVSA	IKLND	LCFS	NVYAD	SFVVK	GDDV	RQIAP	GQTG	VIAD	YNYKL	PDDFM	GCG								
Rs7327	TNLC	PFGE	VFNAT	TFPS	VYAWER	KRIS	NCVAD	YSVLYN	STSF	STFKCY	GVSA	TKLND	LCFS	NVYAD	SFVVK	GDDV	RQIAP	GQTG	VIAD	YNYKL	PDDFM	GCG								
															*							*								
	440	450	460	470	480	490	500	510	520																					
SARS-2	VI	AWNS	NNLD	SKV	GGNY	NYLY	RFRK	SNL	KPF	ERDI	STEI	YQAG	STPC	NGVE	GFNC	YFPL	QSYG	FQPT	NGV	GYQ	PYRV	VVLS	FELL	HAP	ATV	CGPK				
SARS-1	VL	AWN	TRN	IDAT	STGN	YNYK	YRSL	RHG	KLRP	FERD	ISNV	PFSP	DGKP	CT-PP	ALNC	YWPL	NDYGF	YTTG	IGYQ	PYRV	VVLS	FELL	NAP	ATV	CGPK					
Rs4084	VL	AWN	TSK	DSST	SGNY	NYLY	RWR	RSK	LN	PYER	DL	SNDI	YSP	GGQ	SCS-	AVG	PNC	YNPL	RPY	GF	FTT	AGV	GHQ	PYRV	VVLS	FELL	NAP	ATV	CGPK	
RsSHC014	VL	AWN	TSK	DSST	SGNY	NYLY	RWR	RSK	LN	PYER	DL	SNDI	YSP	GGQ	SCS-	AVG	PNC	YNPL	RPY	GF	FTT	AGV	GHQ	PYRV	VVLS	FELL	NAP	ATV	CGPK	
Rs4231	VL	AWN	TSK	DSST	SGNY	NYLY	RWR	RSK	LN	PYER	DL	SNDI	YSP	GGQ	SCS-	AIG	PNC	YNPL	RPY	GF	FTT	AGV	GHQ	PYRV	VVLS	FELL	NAP	ATV	CGPK	
LYRa11	VL	AWN	TRN	IDAT	SSGN	FNYK	YRSL	RHG	KLRP	FERD	ISNV	PFSP	DGKP	CT-PP	AFNC	YWPL	NDYGF	YTTG	IGYQ	PYRV	VVLS	FELL	NAP	ATV	CGPK					
Rs7327	VL	AWN	TRN	IDAT	STGN	YNYK	YRSL	RHG	KLRP	FERD	ISNV	PFSP	DGKP	CT-PP	AFNC	YWPL	NDYGF	YTTG	IGYQ	PYRV	VVLS	FELL	NAP	ATV	CGPK					
		**	*	*	**					*	****				***	**	*****													

20/36

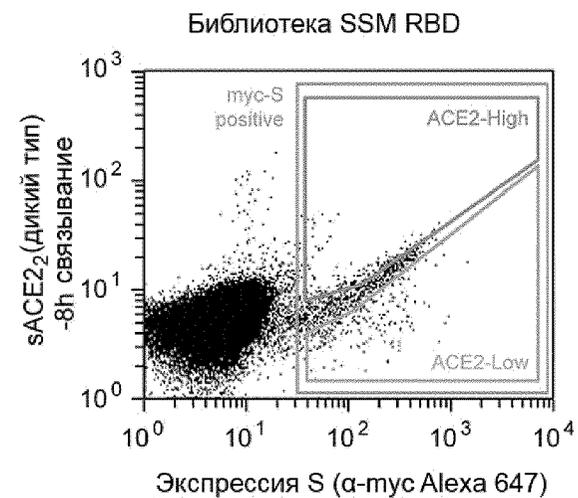
Фиг. 19



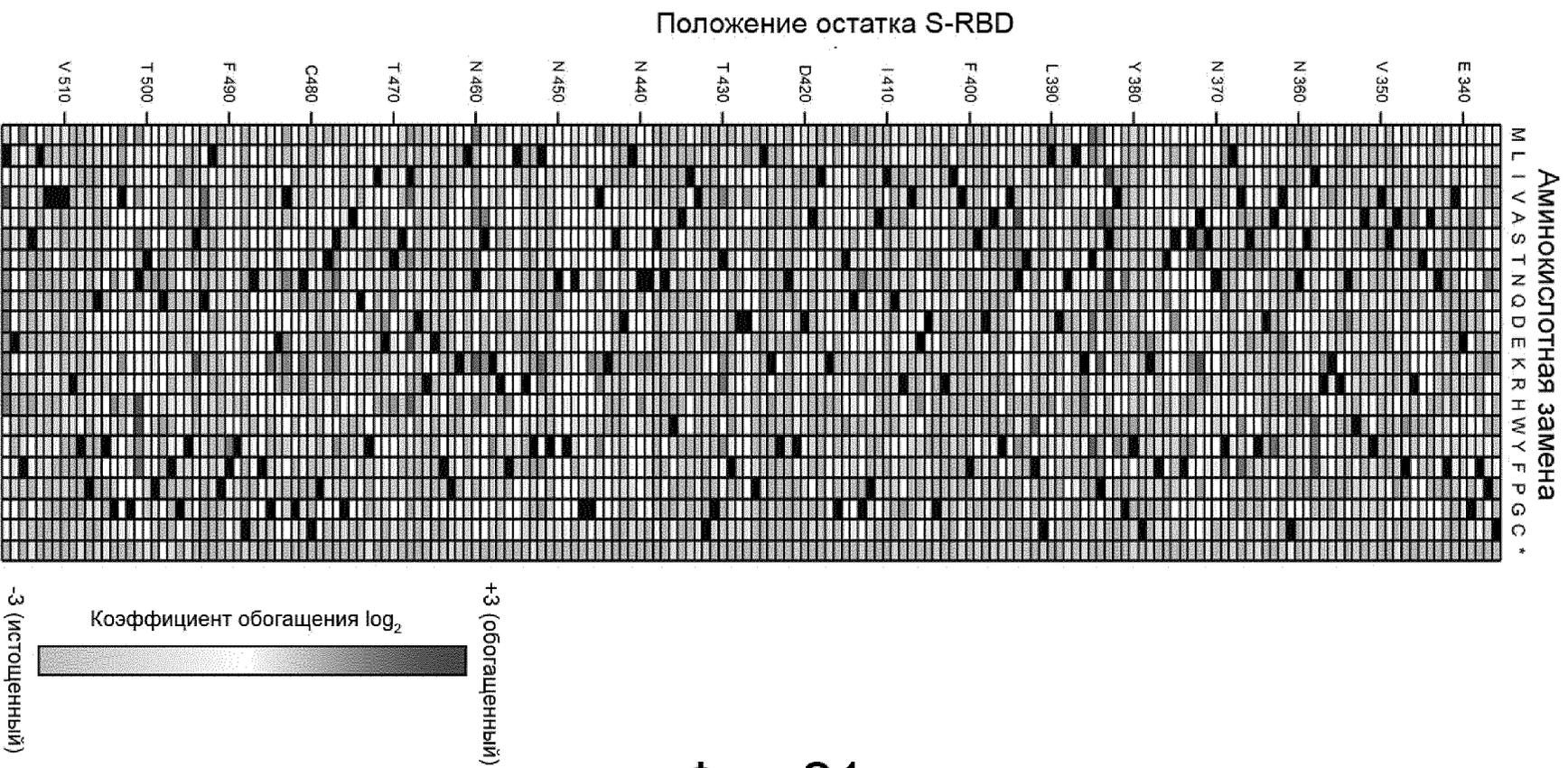
Фиг. 20А



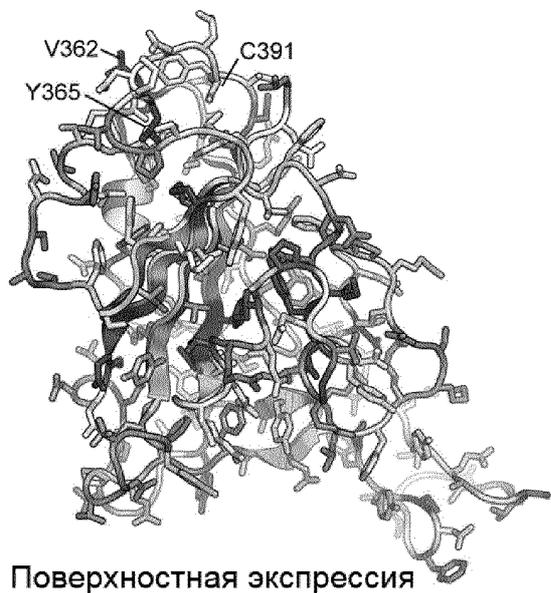
Фиг. 20В



Фиг. 20С



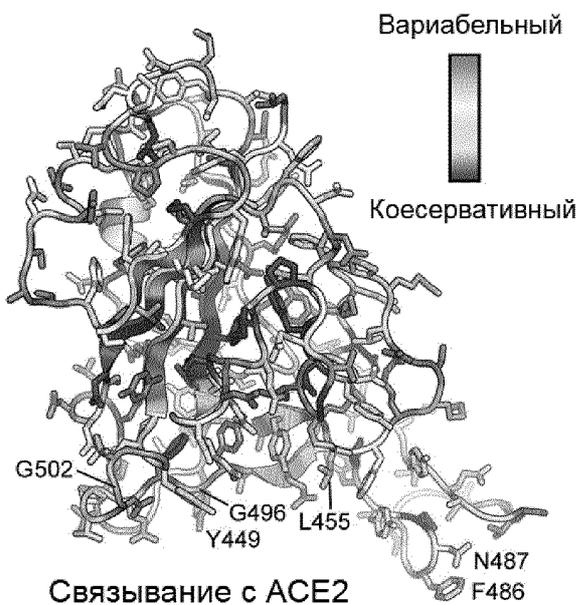
Фиг. 21



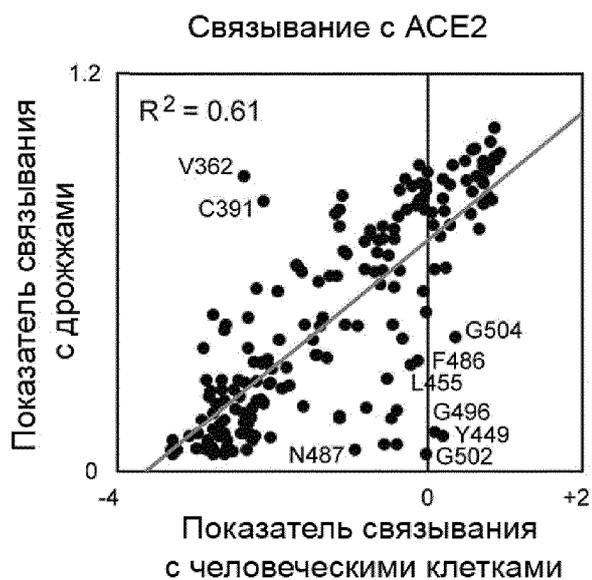
Фиг. 22А



Фиг. 22В

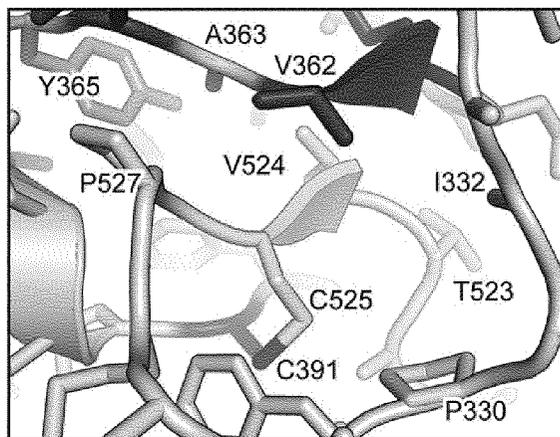


Фиг. 22С



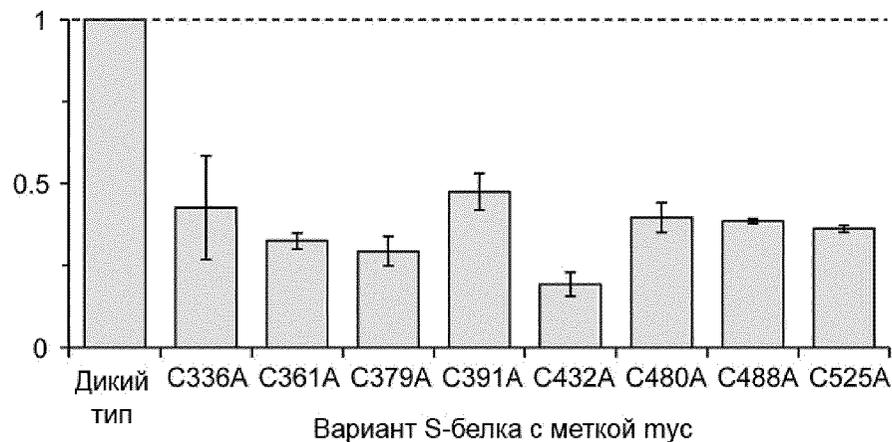
Фиг. 22D

Фиг. 23А

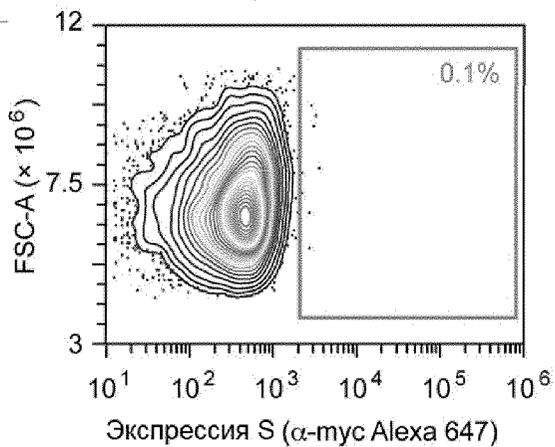


Фиг. 23С

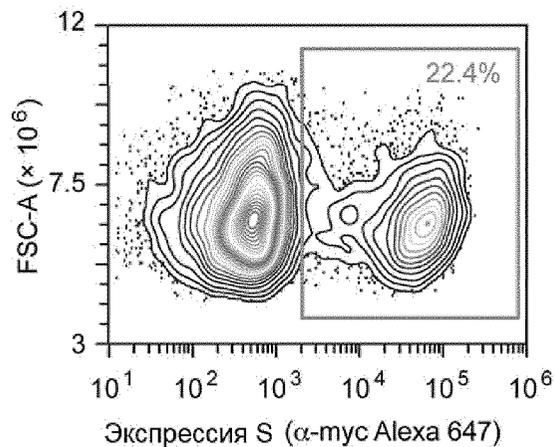
Экспрессия S (изменение среднего значения флуоресценции мутанта/ изменение среднего значения флуоресценции дикого типа)



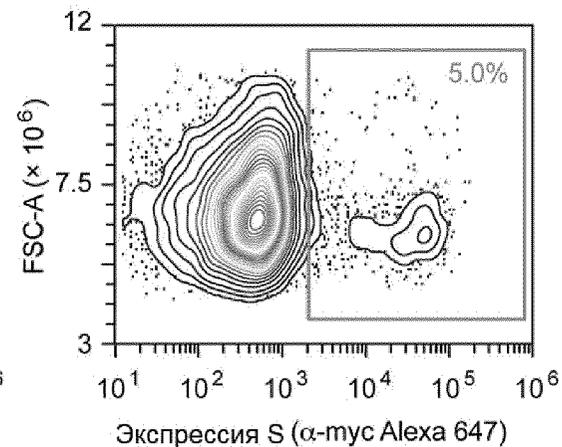
Отрицательный



S дикого типа

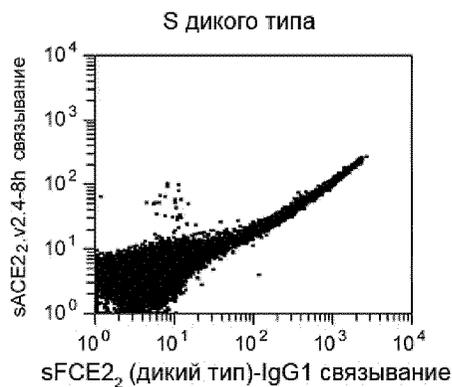


S-C432A

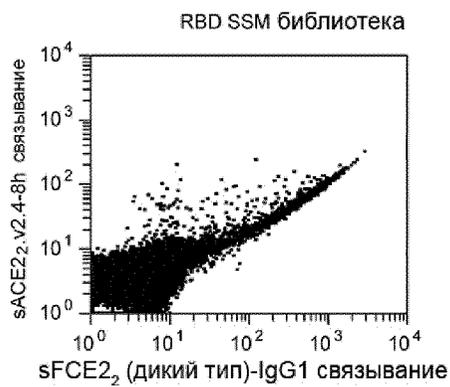


Фиг. 23В

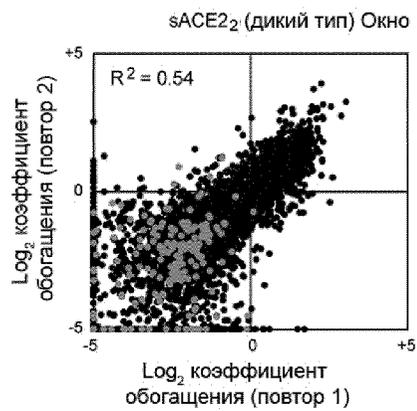
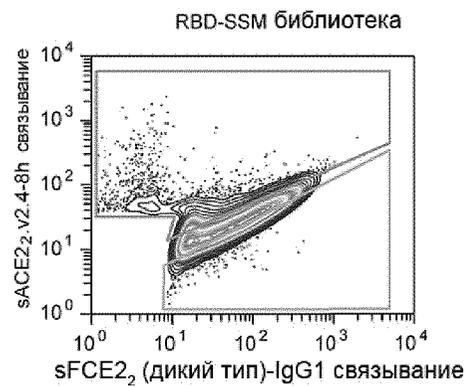
Фиг. 24А



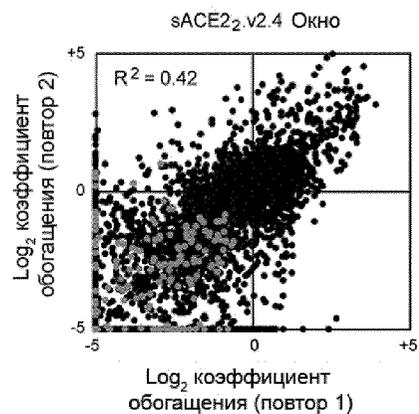
Фиг. 24В



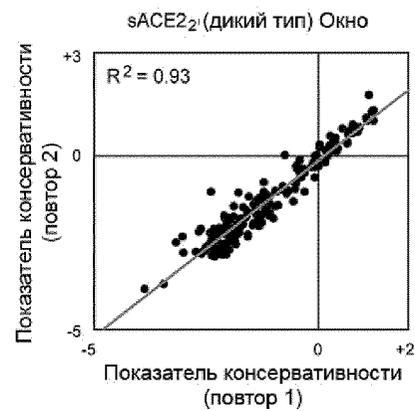
Фиг. 24С



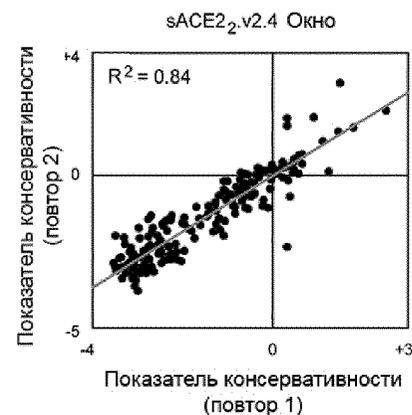
Фиг. 24D



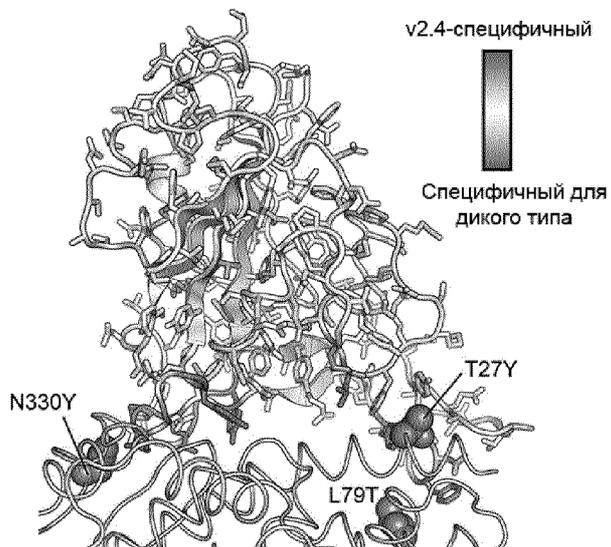
Фиг. 24Е



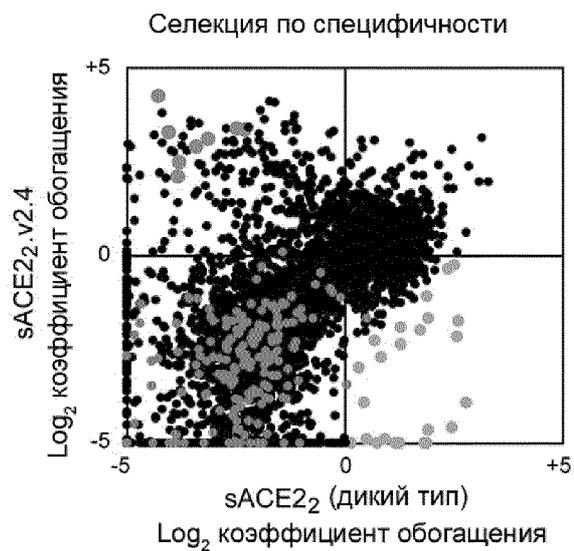
Фиг. 24F



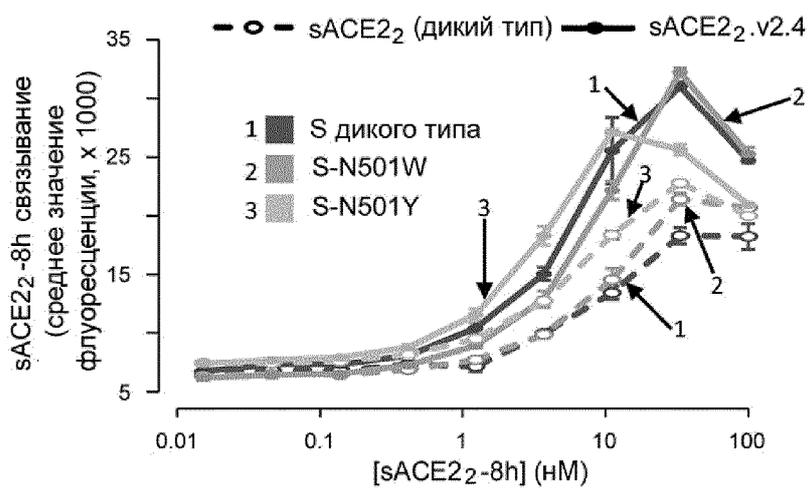
Фиг. 24G



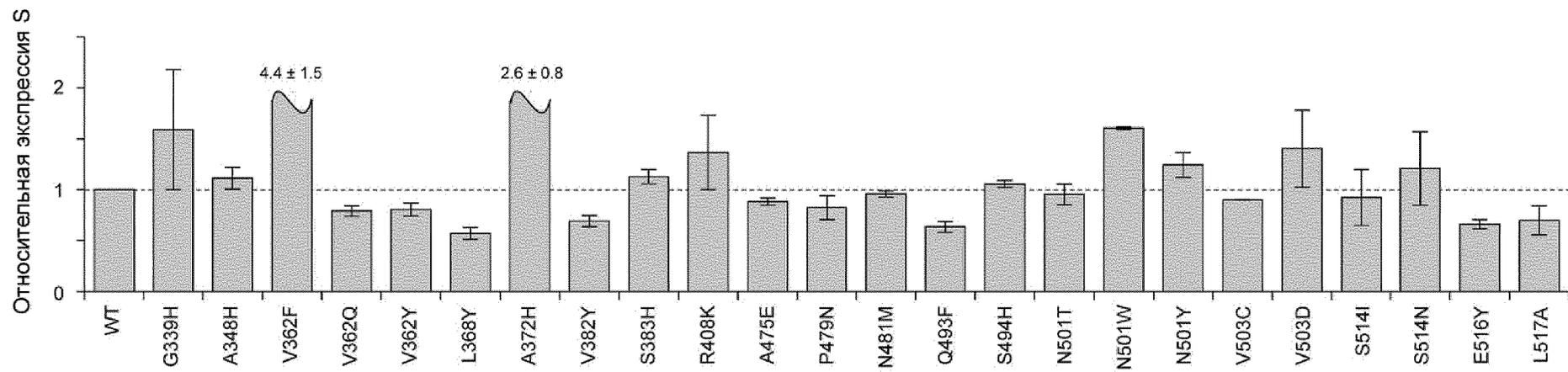
Фиг. 25А



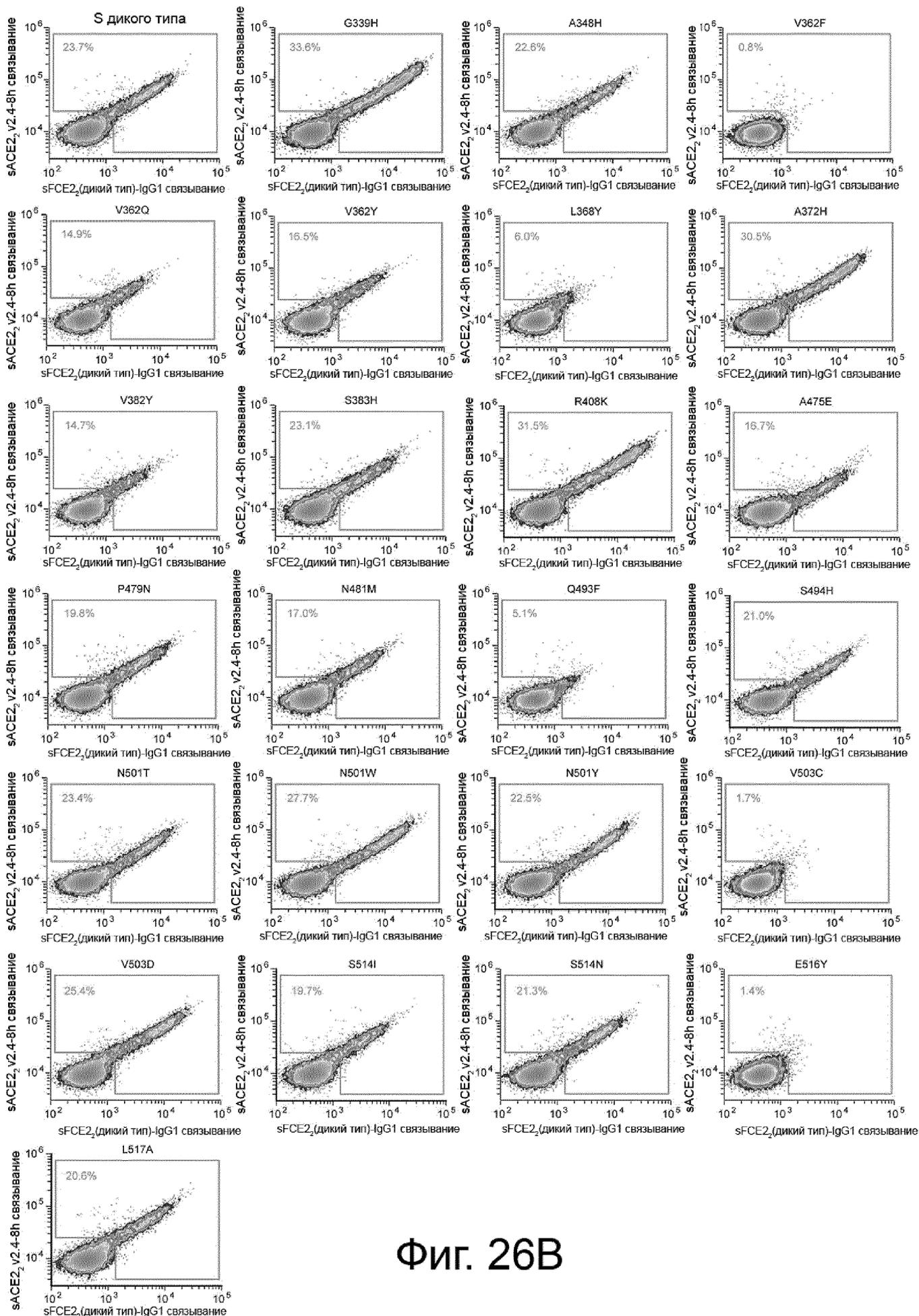
Фиг. 25В



Фиг. 25С

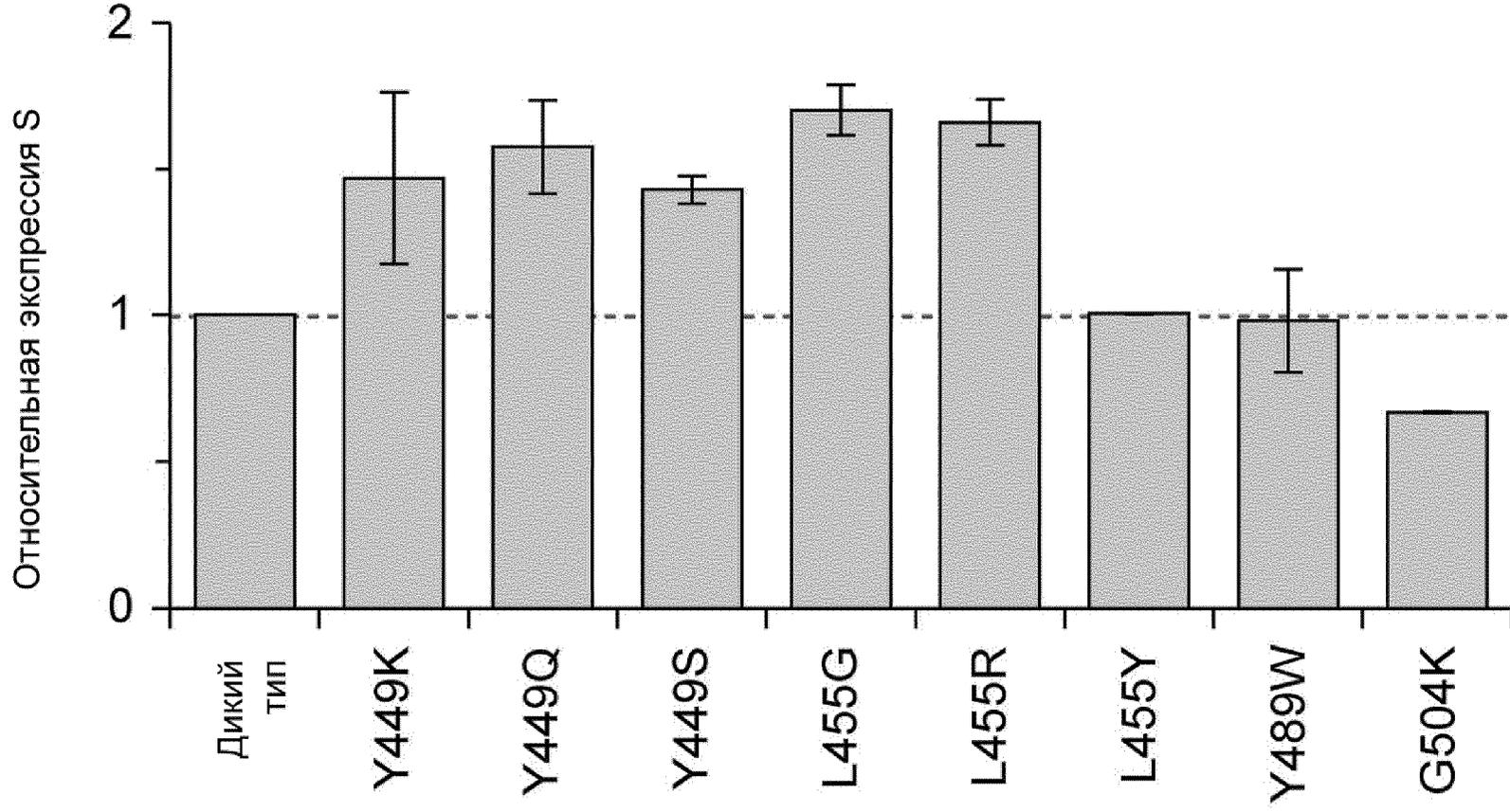


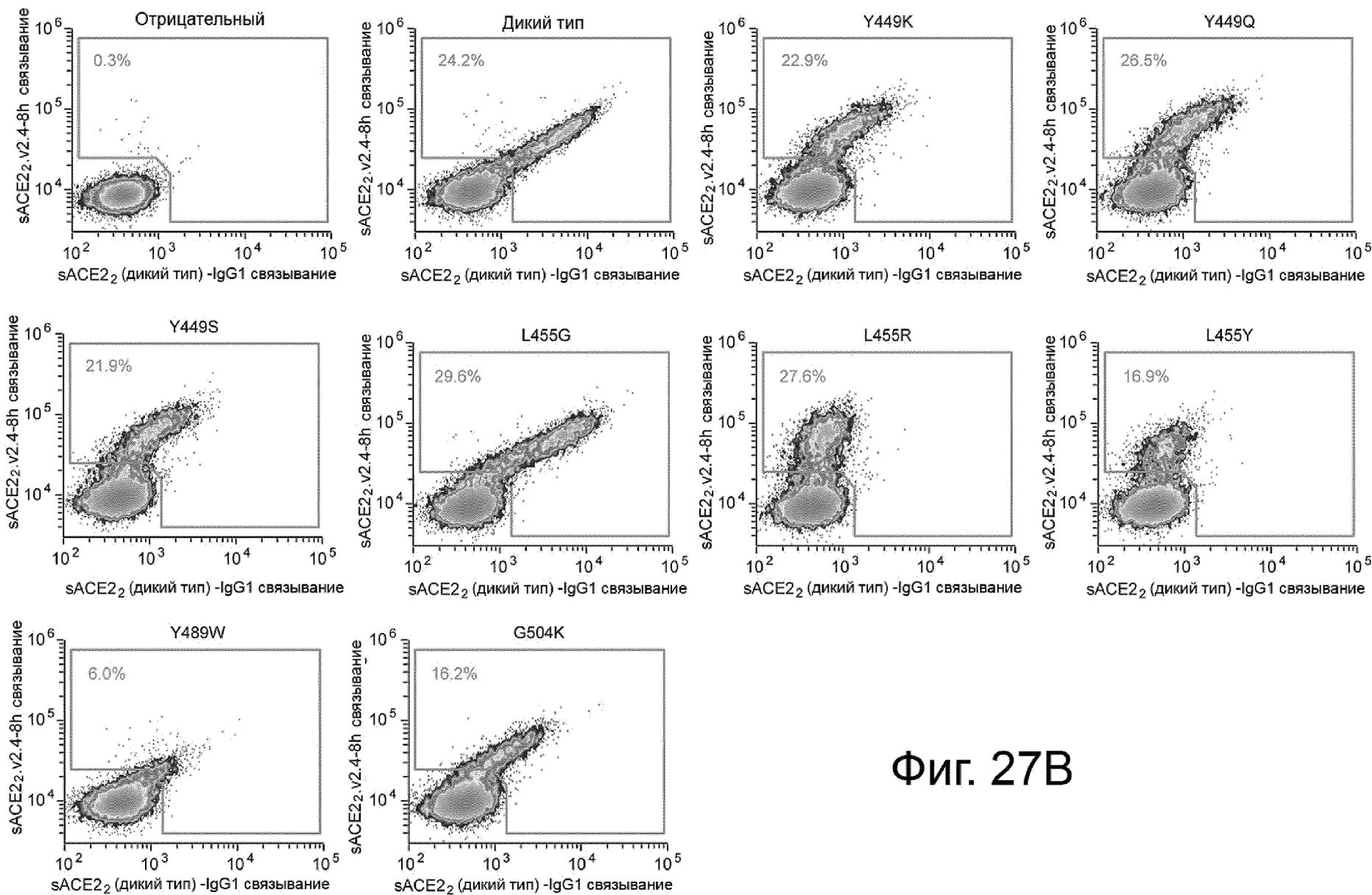
Фиг. 26А



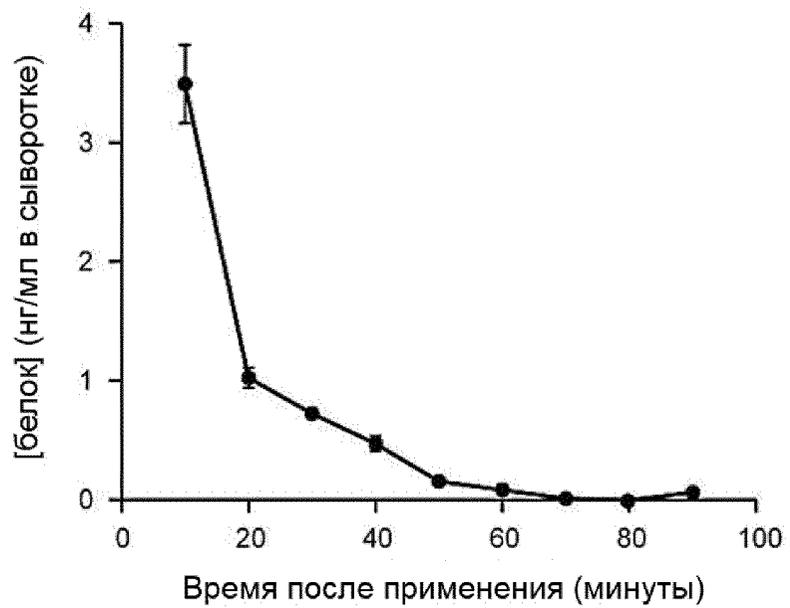
Фиг. 26В

Фиг. 27А

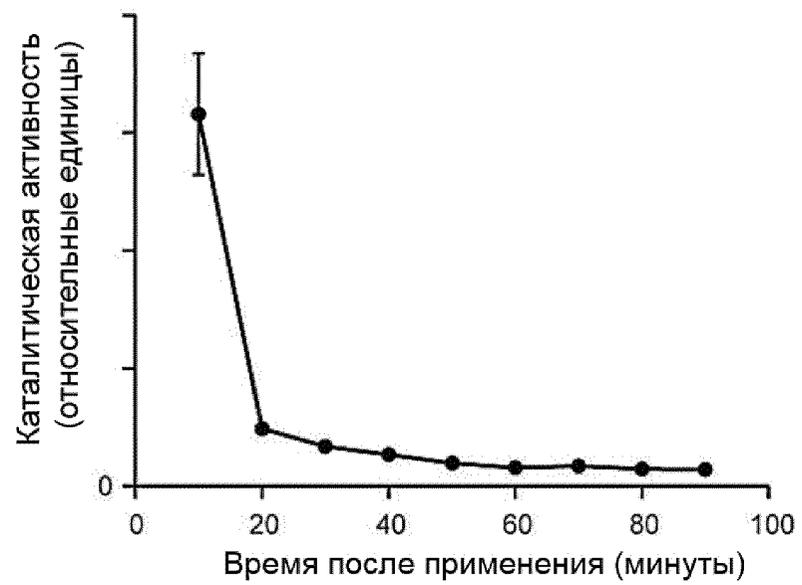




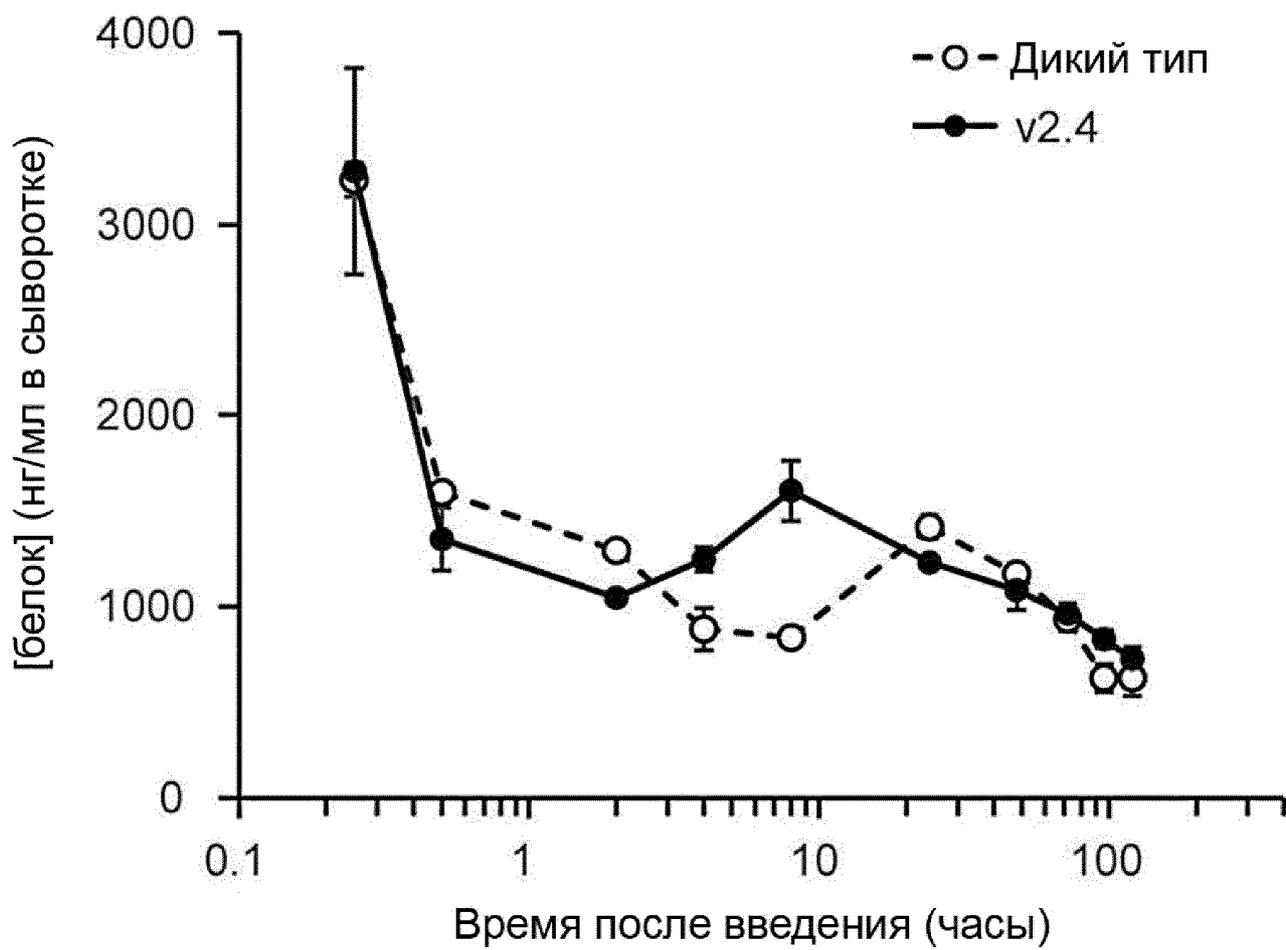
Фиг. 27В



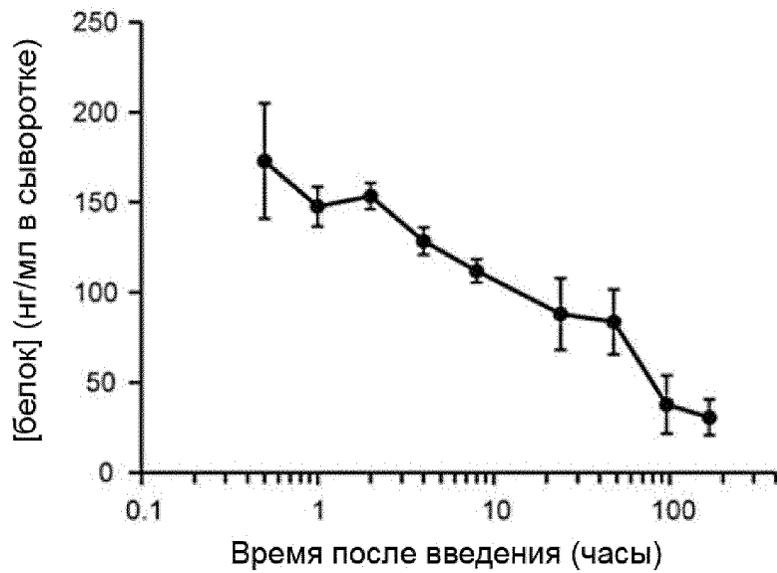
Фиг. 28А



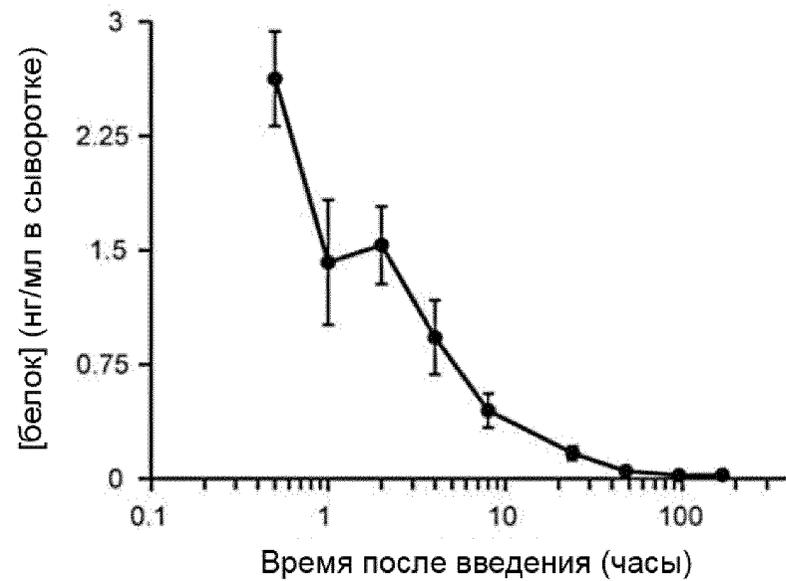
Фиг. 28В



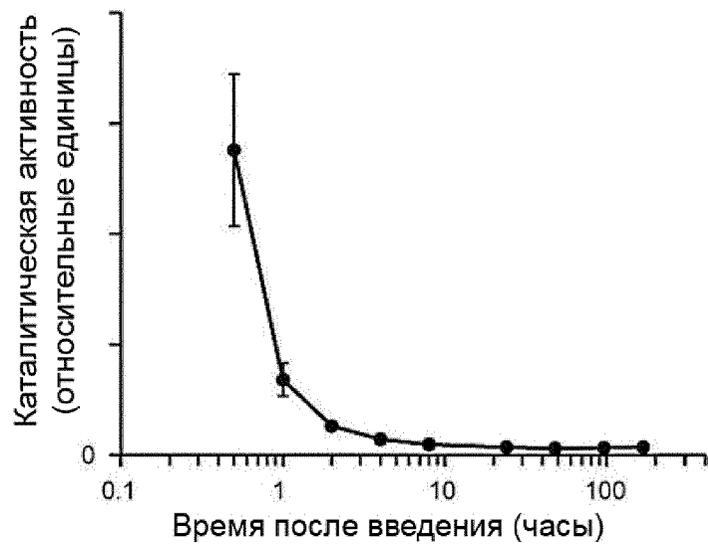
Фиг. 29



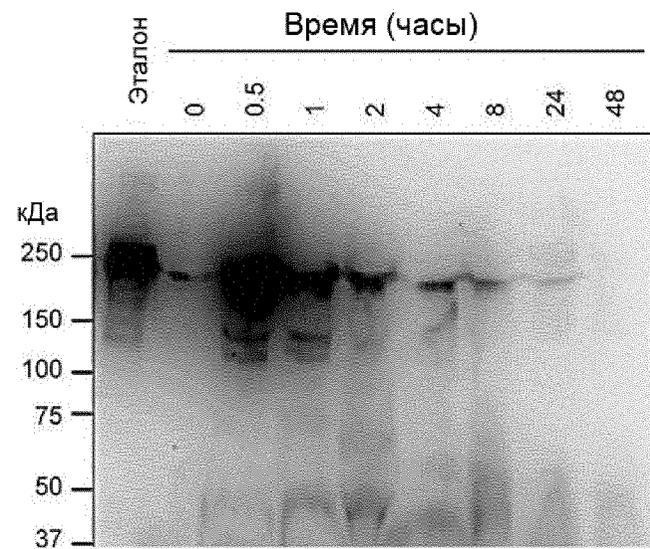
Фиг. 30А



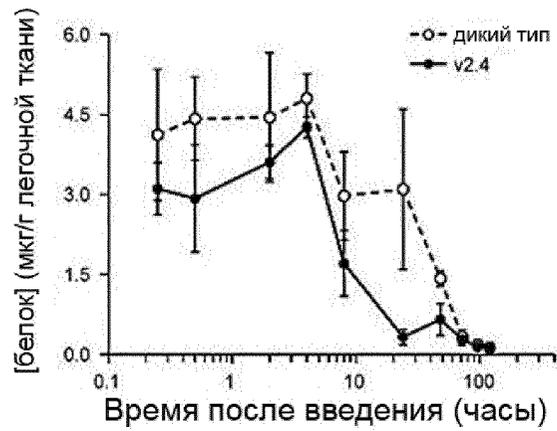
Фиг. 30В



Фиг. 30С



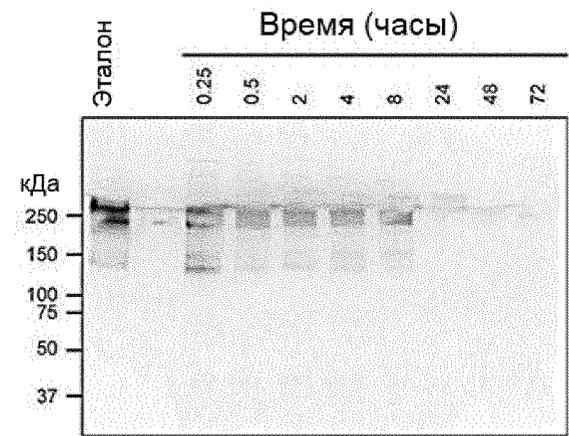
Фиг. 30D



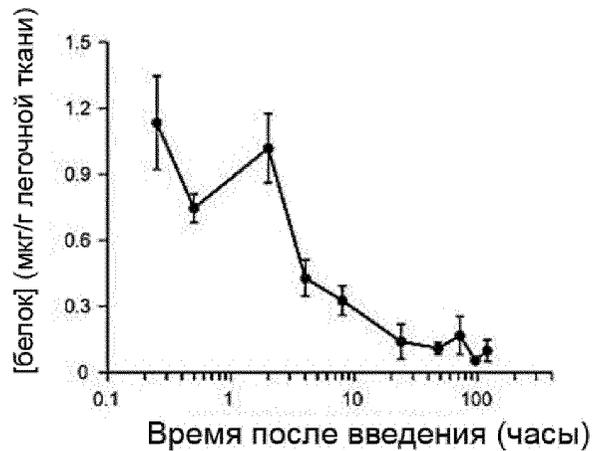
Фиг. 31А



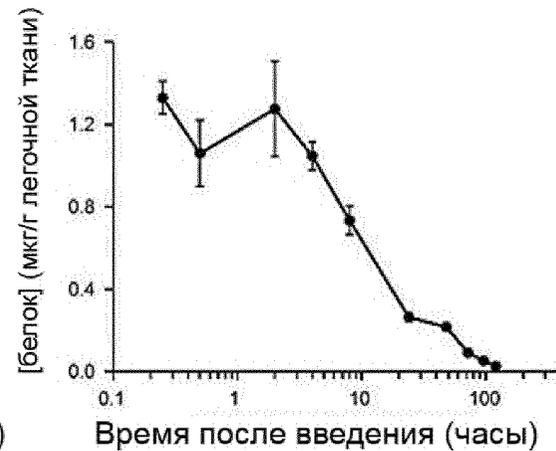
Фиг. 31В



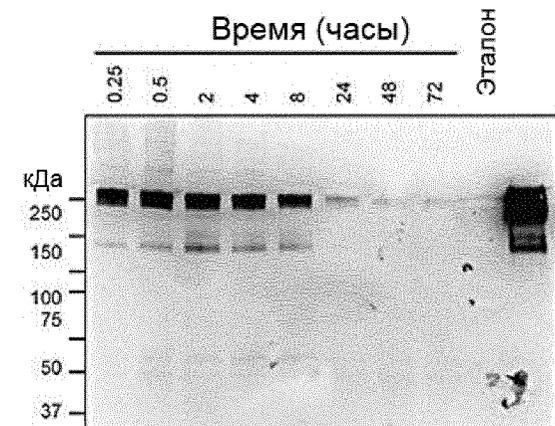
Фиг. 31С



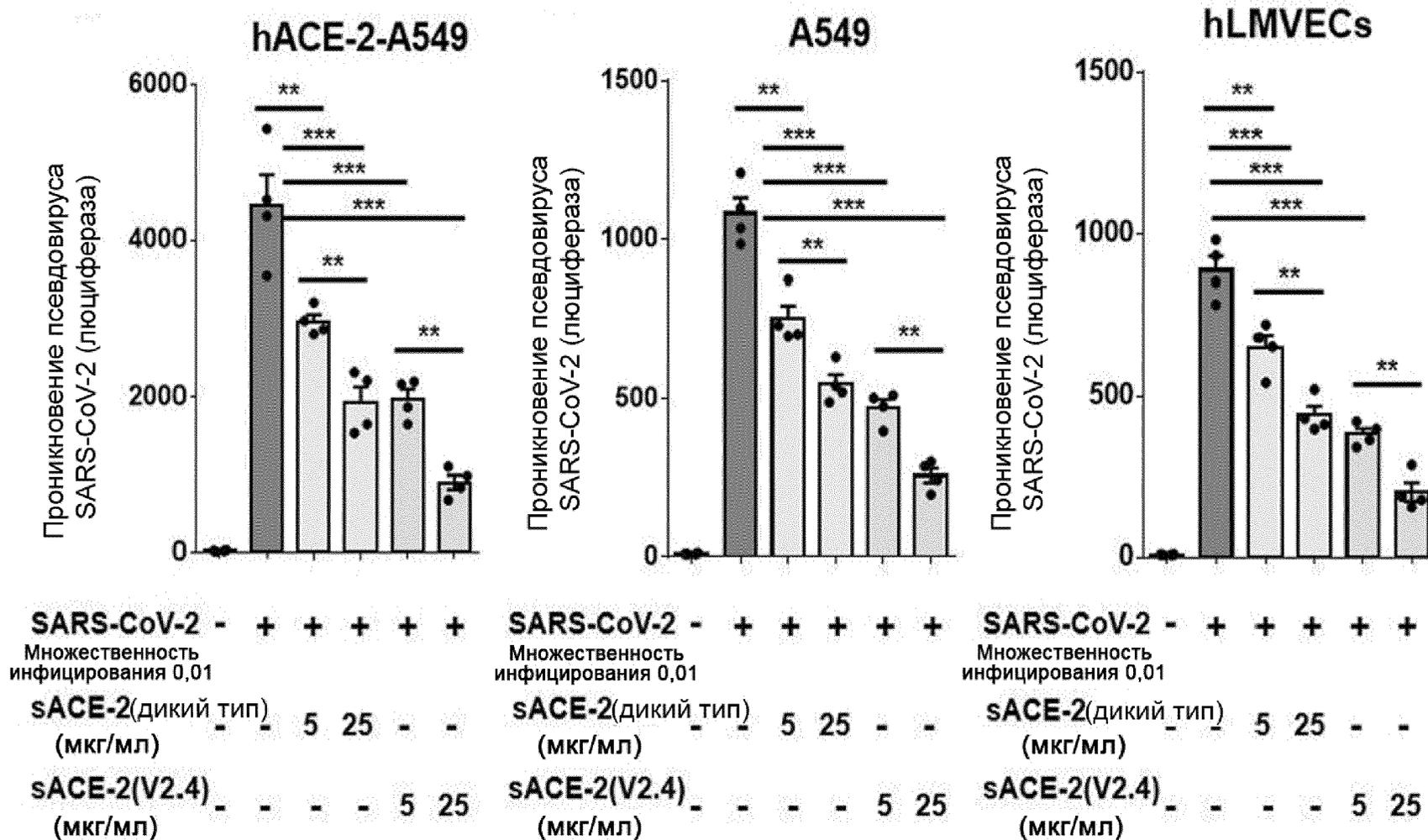
Фиг. 31D



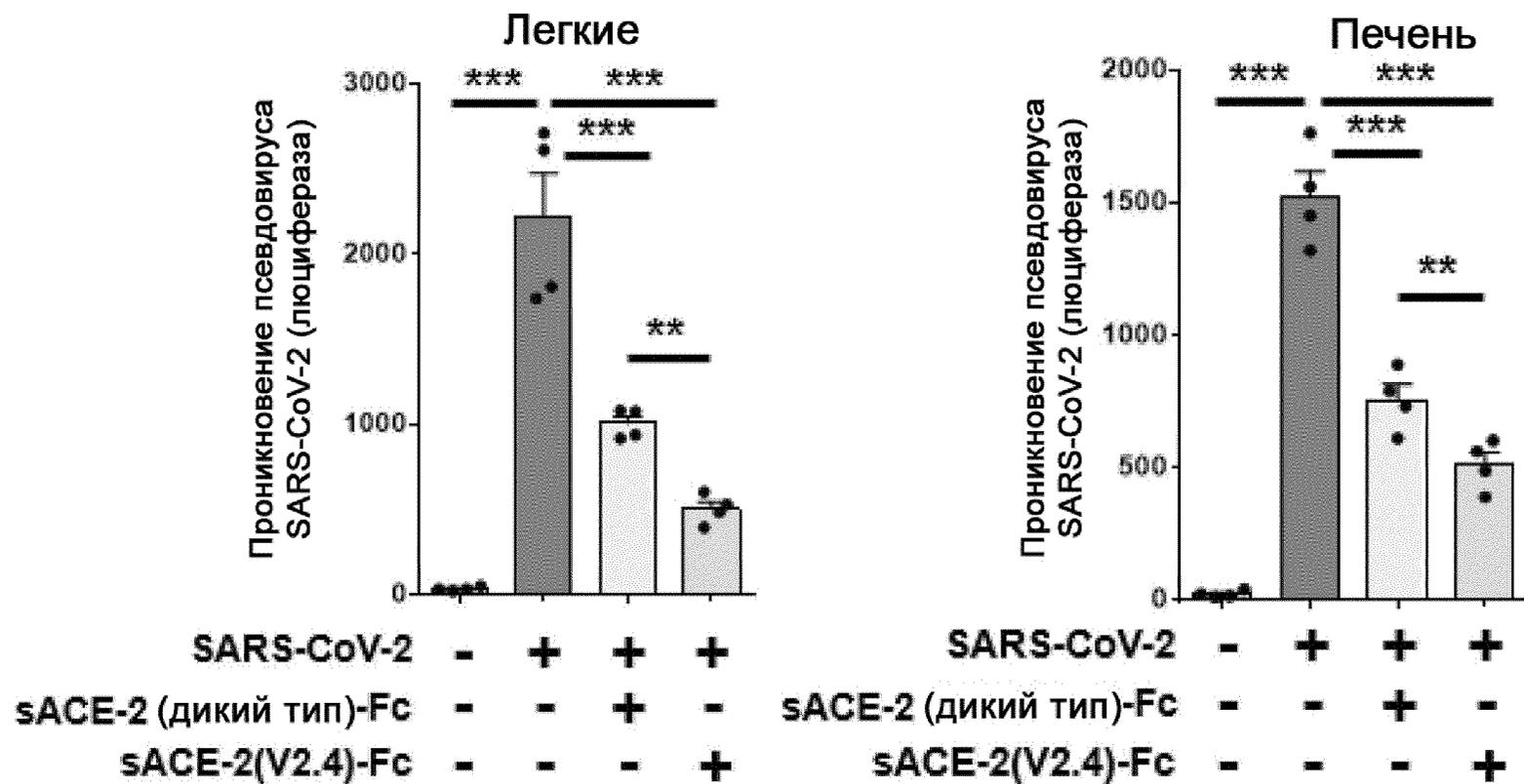
Фиг. 31Е



Фиг. 31F



Фиг. 32



Фиг. 33