

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292619 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.20

(22) Дата подачи заявки
2021.03.25

(51) Int. Cl. C07K 16/10 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К КОРОНАВИРУСУ
ТЯЖЕЛОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА 2 (SARS-CoV-2)

(31) 63/000,299; 63/002,896; 63/003,716;
63/023,545; 63/024,204; 63/024,248;
63/027,173; 63/037,984; 63/040,224;
63/040,246; 63/142,196; 63/161,890
(32) 2020.03.26; 2020.03.31; 2020.04.01;
2020.05.12; 2020.05.13; 2020.05.13;
2020.05.19; 2020.06.11; 2020.06.17;
2020.06.17; 2021.01.27; 2021.03.16
(33) US
(86) PCT/US2021/024215
(87) WO 2021/195418 2021.09.30

(71) Заявитель:
ВАНДЕРБИЛТ ЮНИВЕРСИТИ (US)
(72) Изобретатель:
Кроуи Джеймс И., мл., Зост Сет,
Карнахан Роберт, Гильчук Павло (US)
(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение направлено на антитела, связывающиеся с коронавирусом, обозначенным как SARS-CoV-2, и нейтрализующие его, а также способы их применения.

A1

202292619

202292619

A1

**ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К
КОРОНАВИРУСУ ТЯЖЕЛОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО
СИНДРОМА 2 (SARS-CoV-2)**

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительных заявок на патент США под номерами: 63/000299, поданной 26 марта 2020 г., 63/002896, поданной 31 марта 2020 г., 63/003716, поданной 1 апреля 2020 г., 63/023545, поданной 12 мая 2020 г., 63/024204, поданной 13 мая 2020 г., 63/024248, поданной 13 мая 2020 г., 63/027173, поданной 19 мая 2020 г., 63/037984, поданной 11 июня 2020 г., 63/040224, поданной 17 июня 2020 г., 63/040246, поданной 17 июня 2020 г., 63/142196, поданной 27 января 2021 г., и 63/161890, поданной 16 марта 2021 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**РАСКРЫТИЕ ИНФОРМАЦИИ О ФИНАНСИРОВАНИИ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО
БЮДЖЕТА**

Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства в соответствии с HR0011-18-2-0001, выданным Управлением перспективных исследовательских проектов Министерства обороны США (DARPA), и контрактом HHS 75N93019C00074, выданным Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний/Национальным институтом здравоохранения. Государство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

Содержание перечня последовательностей, представленного в электронном виде (название: 4815-001PC0D_SL_ST25.txt; размер: 87769 байт и дата создания: 24 марта 2021 г.), включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

1. Область изобретения

Настоящее изобретение в целом связано с областями медицины, инфекционных заболеваний и иммунологии. Более конкретно, настоящее изобретение связано с человеческими антителами, связывающимся с новым коронавирусом, обозначенным как SARS-CoV-2, и к способам их применения.

2. Уровень техники

Эпидемия нового коронавируса (SARS-CoV-2) поразила материковый Китай, также случаи заболевания отмечены в 179 других странах и территориях. Он был выявлен в Ухане,

столице китайской провинции Хубэй, после того, как у 41 человека развилась пневмония без явной причины. Вирус, который вызывает острое респираторное заболевание, обозначенное как коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19), способен передаваться от человека к человеку. Инкубационный период (время от контакта с источником заражения до появления симптомов) находится в диапазоне от 0 до 24 дней, в среднем составляет 3-5 дней, но заразность вируса может сохраняться в течение этого периода и после выздоровления. Симптомы включают лихорадку, кашель и затрудненное дыхание. Оценка уровня смертности в феврале 2020 года составила 2% от подтвержденных случаев и была выше среди тех, кому потребовалась госпитализация.

По состоянию на 10 февраля 2020 года было подтверждено 40627 случаев (6495 серьезных), в том числе в каждом административном округе уровня провинции Китая. Большее количество людей, возможно, было инфицировано, но не выявлено (особенно легкие случаи). По состоянию на 10 февраля 2020 года с момента первой подтвержденной смерти от вируса 9 января были зарегистрированы 910 смертей, при этом 3323 человека выздоровели. Первая локальная передача за пределами Китая произошла во Вьетнаме между членами семьи, а первая международная передача за пределы семьи произошла в Германии 22 января. Первая смерть вне Китая произошла на Филиппинах, где 1 февраля скончался мужчина из Уханя. По состоянию на 10 февраля 2020 года число погибших от этого вируса превысило глобальную вспышку SARS в 2003 году.

По состоянию на начало февраля 2020 года не существует ни лицензированной вакцины, ни специфического лечения, хотя в настоящее время исследуются несколько подходов к вакцинам и противовирусным препаратам. Вспышка была объявлена Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение (PHEIC), на основании возможных последствий, к которым может привести вирус, если он распространится в страны с более слабыми системами здравоохранения. Таким образом, существует насущная необходимость в изучении биологии и патологии SARS-CoV-2, а также иммунного ответа человека на этот вирус.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предусмотрен способ обнаружения инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, у субъекта, включающий (а) приведение образца от указанного субъекта в контакт с антителом или фрагментом антитела, содержащими клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно; и (b) обнаружение SARS-CoV-2 в указанном образце при связывании указанного антитела или фрагмента антитела с антигеном SARS-CoV-2 в

указанном образце. Образец может представлять собой физиологическую жидкость, такую как кровь, мокрота, слезы, слюна, слизь или сыворотка крови, сперма, цервикальный или вагинальный секрет, амниотическая жидкость, ткани плаценты, моча, экссудат, транссудат, соскобы тканей или фекалии. Обнаружение может включать ELISA, RIA, иммунохроматографический анализ или вестерн-блоттинг. Способ может дополнительно включать выполнение стадий (а) и (b) во второй раз и определение изменения уровней антигена SARS-CoV-2 по сравнению с первым анализом. Антитело или фрагмент антитела могут кодироваться клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1. Антитело или фрагмент антитела могут кодироваться последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1, или последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися 100% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. Антитело или фрагмент антитела могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2 или последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. Антитело или фрагмент антитела могут связываться с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ лечения субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, или снижения вероятности инфицирования субъекта с риском заражения SARS-CoV-2, включающий доставку указанному субъекту антитела или фрагмента антитела, содержащих клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. Антитело или фрагмент антитела могут кодироваться последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1, или последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися 100% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. Антитело или фрагмент антитела могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в

соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2 или последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из вариабельных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой химерное антитело или биспецифическое антитело. Антитело может представлять собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. Антитело или фрагмент антитела могут связываться с антигеном SARS-CoV-2, таким как поверхностный шиповидный белок. Антитело или фрагмент антитела можно вводить до инфицирования или после инфицирования. Возраст субъекта может составлять 60 лет или старше, субъект может иметь ослабленный иммунитет или может страдать респираторным и/или сердечно-сосудистым нарушением. Доставка может включать введение антитела или фрагмента антитела или генетическую доставку с помощью последовательности РНК или ДНК или вектора, кодирующих антитело или фрагмент антитела.

В еще одном варианте осуществления предусмотрено моноклональное антитело, где антитело или фрагмент антитела характеризуются клонально-спаренными последовательностями CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. Антитело или фрагмент антитела могут кодироваться последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями вариабельных доменов, представленными в таблице 1, или последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися 100% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. Антитело или фрагмент антитела могут содержать последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2 или последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. Фрагмент антитела может представлять собой

рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из вариабельных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой химерное антитело, биспецифическое антитело или интратело. Антитело может представлять собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. Антитело или фрагмент антитела могут связываться с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2.

Гибридома или сконструированная клетка, кодирующая антитело или фрагмент антитела, где антитело или фрагмент антитела характеризуются клонально-спаренными последовательностями CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. Антитело или фрагмент антитела могут кодироваться последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями вариабельных доменов, представленными в таблице 1, или последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися 100% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. Антитело или фрагмент антитела могут содержать последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2 или последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из вариабельных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой химерное антитело, биспецифическое антитело или интратело. Антитело может представлять собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление

гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. Антитело или фрагмент антитела могут связываться с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2.

В еще одном варианте осуществления предусмотрен вакцинный состав, содержащий одно или несколько антител или фрагментов антител, характеризующихся клонально-спаренными последовательностями CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. По меньшей мере одно из указанных антител или фрагментов антител может кодироваться последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1, последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1, или последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. По меньшей мере одно из указанных антител или фрагментов антител может содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2 или может содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. По меньшей мере один из указанных фрагментов антител представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. По меньшей мере одно из указанных антител может представлять собой химерное антитело, биспецифическое антитело или интратело. Антитело может представлять собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. Антитело или фрагмент антитела могут связываться с поверхностным шиповидным белком, являющимся антигеном SARS-CoV-2.

В дополнительном варианте осуществления предусмотрен вакцинный состав, содержащий один или несколько векторов экспрессии, кодирующих первое антитело или

фрагмент антитела, описанные в данном документе. Вектор(-ы) экспрессии может(-гут) представлять собой вирус Синдбис или вектор(-ы) на основе VEE. Вакцина может быть составлена для доставки путем инъекции с помощью иглы, струйной инъекции или электропорации. Вакцинный состав может дополнительно содержать один или несколько векторов экспрессии, кодирующих второе антитело или фрагмент антитела, например отдельное антитело или фрагмент антитела по пп. 26-34.

В еще одном варианте осуществления предусмотрен способ защиты здоровья субъекта в возрасте 60 лет или старше, субъекта с ослабленным иммунитетом или субъекта, страдающего респираторным и/или сердечно-сосудистым нарушением, который инфицирован или подвергается риску инфицирования SARS-CoV-2, включающий доставку указанному субъекту антитела или фрагмента антитела, содержащих клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. Антитело или фрагмент антитела могут кодироваться последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1, или последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися 100% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. Антитело или фрагмент антитела могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2 или последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. Фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. Антитело может представлять собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. Антитело может представлять собой химерное антитело или биспецифическое антитело. Указанное антитело или фрагмент антитела можно вводить до инфицирования или после инфицирования. Антитело или фрагмент антитела могут связываться с антигеном SARS-

CoV-2, таким как поверхностный шиповидный белок. Доставка может включать введение антитела или фрагмента антитела или генетическую доставку с помощью последовательности РНК или ДНК или вектора, кодирующих антитело или фрагмент антитела. Антитело или фрагмент антитела могут улучшать дыхание субъекта по сравнению с необработанным контролем и/или могут снижать вирусную нагрузку по сравнению с необработанным контролем.

В еще одном дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ определения антигенной целостности, правильной конформации и/или правильной последовательности поверхностного шиповидного белка SARS-CoV-2, включающий (а) приведение образца, содержащего указанный антиген, в контакт с первым антителом или фрагментом антитела, содержащими клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно; и (b) определение антигенной целостности, правильной конформации и/или правильной последовательности указанного антигена при детектируемом связывании указанного первого антитела или фрагмента антитела с указанным антигеном. Образец может содержать антиген, полученный рекомбинантным путем, или вакцинный состав, или производственную партию вакцины. Обнаружение может включать ELISA, RIA, вестерн-блоттинг, биосенсор с использованием поверхностного плазмонного резонанса или биослойной интерферометрии или окрашивание при проточной цитометрии. Первое антитело или фрагмент антитела могут кодироваться клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1, последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1, или последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. Первое антитело или фрагмент антитела могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2, могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2 или могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. Первый фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или

Fv-фрагмент. Способ может дополнительно включать выполнение стадий (a) и (b) во второй раз для определения антигенной стабильности антигена с течением времени.

Способ может дополнительно включать (c) приведение образца, содержащего указанный антиген, в контакт со вторым антителом или фрагментом антитела, содержащими клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно; и (d) определение антигенной целостности указанного антигена при детектируемом связывании указанного второго антитела или фрагмента антитела с указанным антигеном. Второе антитело или фрагмент антитела могут кодироваться клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1, последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1, или последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. Второе антитело или фрагмент антитела могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2, могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2 или могут содержать последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. Второй первый фрагмент антитела может представлять собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. Способ может дополнительно включать выполнение стадий (c) и (d) во второй раз для определения антигенной стабильности антигена с течением времени.

Также предусмотрено человеческое моноклональное антитело или фрагмент антитела, или гибридома или сконструированная клетка, продуцирующие их, где указанное антитело связывается с поверхностным шиповидным белком, являющимся антигеном SARS-CoV-2.

В одном аспекте (A1), предусмотренном в данном документе, способ обнаружения инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, у субъекта включает: (a) приведение образца от указанного субъекта в контакт с антителом или фрагментом антитела, содержащими клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно; и (b) обнаружение SARS-CoV-2 в указанном образце при связывании указанного антитела или фрагмента антитела с антигеном SARS-CoV-2 в

указанном образце. В одном аспекте (A2) пункта A1 указанный образец представляет собой физиологическую жидкость. В одном аспекте (A3) пункта A1 или A2 указанный образец представляет собой кровь, мокроту, слезы, слюну, слизь или сыворотку крови, сперму, цервикальный или вагинальный секрет, амниотическую жидкость, ткани плаценты, мочу, экссудат, транссудат, соскобы тканей или фекалии. В одном аспекте (A4) любого из пунктов A1-A3 обнаружение включает ELISA, RIA, иммунохроматографический анализ или вестерн-блоттинг. В одном аспекте (A5) любого из пунктов A1-A4 способ дополнительно включает выполнение стадий (a) и (b) во второй раз и определение изменения уровней антигена SARS-CoV-2 по сравнению с первым анализом. В одном аспекте (A6) любого из пунктов A1-A5 антитело или фрагмент антитела кодируются клонально-спаренными последовательностями вариабельных доменов, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A7) любого из пунктов A1-A5 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями вариабельных доменов, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A8) любого из пунктов A1-A5 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися 100% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A9) любого из пунктов A1-A5 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A10) любого из пунктов A1-A5 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A11) любого из пунктов A1-A10 указанное антитело или фрагмент антитела связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2. В одном аспекте (A12) любого из пунктов A1-A11 фрагмент антитела представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из вариабельных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент.

В одном аспекте (A13), предусмотренном в данном документе, способ лечения субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, или снижения вероятности инфицирования субъекта с риском заражения SARS-CoV-2 включает доставку указанному субъекту антитела или фрагмента антитела, содержащих клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. В одном аспекте (A14) пункта A13 антитело

или фрагмент антитела кодируются клонально-спаренными последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A15) пункта A13 или A14 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A16) пункта A13 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A17) пункта A13 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A18) пункта A13 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A19) любого из пунктов A13-A18 фрагмент антитела представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. В одном аспекте (A20) любого из пунктов A13-A19 указанное антитело представляет собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. В одном аспекте (A21) любого из пунктов A13-A18 указанное антитело представляет собой химерное антитело или биспецифическое антитело. В одном аспекте (A22) любого из пунктов A13-A21 указанное антитело или фрагмент антитела связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2. В одном аспекте (A23) любого из пунктов A13-A22 указанное антитело или фрагмент антитела вводят до инфицирования или после инфицирования. В одном аспекте (A24) любого из пунктов A13-A23 возраст указанного субъекта составляет 60 лет или старше, он имеет ослабленный иммунитет или страдает респираторным и/или сердечно-сосудистым нарушением. В одном аспекте (A25) любого из пунктов A13-A24 доставка включает введение антитела или фрагмента антитела

или генетическую доставку с помощью последовательности РНК или ДНК или вектора, кодирующих антитело или фрагмент антитела.

В одном аспекте (A26) в данном документе предусмотрено моноклональное антитело, где антитело или фрагмент антитела характеризуются клонально-спаренными последовательностями CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. В одном аспекте (A27) пункта A26 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A28) пункта A26 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A29) пункта A26 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A30) пункта A26 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A31) любого из пунктов A26-A30 фрагмент антитела представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. В одном аспекте (A32) любого из пунктов A26-A30 указанное антитело представляет собой химерное антитело или биспецифическое антитело. В одном аспекте (A33) любого из пунктов A26-A32 указанное антитело представляет собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. В одном аспекте (A34) любого из пунктов A26-A33 указанное антитело или фрагмент антитела связываются с антигеном SARS-CoV-2, таким как поверхностный шиповидный белок. В одном аспекте (A35) любого из пунктов A26-A34 указанное антитело представляет собой интратело.

В одном аспекте (A36), предусмотренном в данном документе, гибридома или сконструированная клетка кодируют антитело или фрагмент антитела, где антитело или

фрагмент антитела характеризуются клонально-спаренными последовательностями CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. В одном аспекте (A37) пункта A36 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A38) пункта A36 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями переменных доменов из таблицы 1. В одном аспекте (A39) пункта A36 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A40) пункта A36 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A41) пункта A36 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями переменных доменов из таблицы 2. В одном аспекте (A42) пункта A36 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A43) любого из пунктов A36-A42 фрагмент антитела представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. В одном аспекте (A44) любого из пунктов A36-A43 указанное антитело представляет собой химерное антитело, биспецифическое антитело или интратело. В одном аспекте (A45) любого из пунктов A36-A43 указанное антитело представляет собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. В одном аспекте (A46) любого из пунктов A36-A45 указанное антитело или фрагмент антитела связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2.

В одном аспекте (A47), предусмотренном в данном документе, вакцинный состав содержит одно или несколько антител или фрагментов антител, характеризующихся клонально-спаренными последовательностями CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. В одном аспекте (A48) пункта A47 по меньшей мере одно из указанных антител или фрагментов антител кодируется последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A49) пункта A47 по меньшей мере одно из указанных антител или фрагментов антител кодируется последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A50) пункта A47 по меньшей мере одно из указанных антител или фрагментов антител кодируется последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A51) пункта A47 по меньшей мере одно из указанных антител или фрагментов антител содержит последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A52) пункта A47 по меньшей мере одно из указанных антител или фрагментов антител содержит последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A53) любого из пунктов A47-A52 по меньшей мере один из указанных фрагментов антител представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. В одном аспекте (A54) любого из пунктов A47-A52 по меньшей мере одно из указанных антител представляет собой химерное антитело, биспецифическое антитело или интратело. В одном аспекте (A55) любого из пунктов A47-A54 указанное антитело представляет собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. В одном аспекте (A56) любого из пунктов A47-A55 указанное антитело или фрагмент антитела связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2.

В одном аспекте (A57), предусмотренном в данном документе, вакцинный состав содержит один или несколько векторов экспрессии, кодирующих первое антитело или фрагмент антитела в соответствии с любым из пунктов A26-A34. В одном аспекте (A58) пункта A57 указанный(-е) вектор(-ы) экспрессии представляет(-ют) собой вирус Синдбис или вектор(-ы) на основе VEE. В одном аспекте (A59) пункта A57 или A58 вакцинный состав составлен для доставки путем инъекции с помощью иглы, струйной инъекции или электропорации. В одном аспекте (A60) пункта A57 вакцинный состав дополнительно содержит один или несколько векторов экспрессии, кодирующих второе антитело или фрагмент антитела, например, отдельное антитело или фрагмент антитела по любому из пунктов A26-A34.

В одном аспекте (A61), предусмотренном в данном документе, способ защиты здоровья субъекта в возрасте 60 лет или старше, субъекта с ослабленным иммунитетом или субъекта, страдающего респираторным и/или сердечно-сосудистым нарушением, который инфицирован или подвергается риску инфицирования SARS-CoV-2, включает доставку указанному субъекту антитела или фрагмента антитела, содержащих клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно. В одном аспекте (A62) пункта A61 антитело или фрагмент антитела кодируются клонально-спаренными последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A63) пункта A61 или A62 антитело или фрагмент антитела кодируются клонально-спаренными последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностями, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A64) пункта A61 или A62 указанное антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 1. В одном аспекте (A65) пункта A61 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A66) пункта A61 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A67) пункта A61 указанное антитело или фрагмент антитела содержат последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном

аспекте (A68) любого из пунктов A61-A67 фрагмент антитела представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из вариабельных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. В одном аспекте (A69) любого из пунктов A61-A68 указанное антитело представляет собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования. В одном аспекте (A70) любого из пунктов A61-A67 указанное антитело представляет собой химерное антитело или биспецифическое антитело. В одном аспекте (A71) любого из пунктов A61-A70 указанное антитело или фрагмент антитела вводят до инфицирования или после инфицирования. В одном аспекте (A72) любого из пунктов A61-A71 указанное антитело или фрагмент антитела связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2. В одном аспекте (A73) любого из пунктов A61-A72 доставка включает введение антитела или фрагмента антитела или генетическую доставку с помощью последовательности РНК или ДНК или вектора, кодирующих антитело или фрагмент антитела. В одном аспекте (A74) пункта A61 антитело или фрагмент антитела улучшают дыхание субъекта по сравнению с необработанным контролем. В одном аспекте (A75) пункта A61 антитело или фрагмент антитела снижают вирусную нагрузку по сравнению с необработанным контролем.

В одном аспекте (A76), предусмотренном в данном документе, способ определения антигенной целостности, правильной конформации и/или правильной последовательности поверхностного шиповидного белка SARS-CoV-2 включает: (a) приведение образца, содержащего указанный антиген, в контакт с первым антителом или фрагментом антитела, содержащими клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно; и (b) определение антигенной целостности, правильной конформации и/или правильной последовательности указанного антигена при детектируемом связывании указанного первого антитела или фрагмента антитела с указанным антигеном. В одном аспекте (A77) пункта A76 указанный образец содержит антиген, полученным рекомбинантным путем. В одном аспекте (A78) пункта A76 указанный образец содержит вакцинный состав или производственную партию вакцины. В одном аспекте (A79) пунктов A76-A78 обнаружение включает ELISA, RIA, вестерн-блоттинг, биосенсор с использованием поверхностного плазмонного резонанса или

биослойной интерферометрии или окрашивание при проточной цитометрии. В одном аспекте (A80) пунктов A76-A79 первое антитело или фрагмент антитела кодируются клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A81) пунктов A76-A79 указанное первое антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A82) любого из пунктов A76-A79 указанное первое антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A83) любого из пунктов A76-A79 указанное первое антитело или фрагмент антитела содержит последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A84) любого из пунктов A76-A79 указанное первое антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A85) любого из пунктов A76-A79 указанное первое антитело или фрагмент антитела содержат последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A86) любого из пунктов A76-A85 фрагмент первого антитела представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из переменных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. В одном аспекте (A87) любого из пунктов A76-A86 способ дополнительно включает выполнение стадий (a) и (b) во второй раз для определения антигенной стабильности антигена с течением времени. В одном аспекте (A88) любого из пунктов A76-A87 способ дополнительно включает (c) приведение образца, содержащего указанный антиген, в контакт со вторым антителом или фрагментом антитела, содержащими клонально-спаренные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей из таблиц 3 и 4 соответственно; и (d) определение антигенной целостности указанного антигена при детектируемом связывании указанного второго антитела или фрагмента антитела с указанным антигеном. В одном аспекте (A89) пункта A88 второе антитело или фрагмент антитела кодируются клонально-спаренными последовательностями переменных доменов, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A90) пункта A89 указанное второе антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями

вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями вариабельных доменов, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A91) пункта A89 указанное второе антитело или фрагмент антитела кодируются последовательностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующимися по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями, представленными в таблице 1. В одном аспекте (A92) пункта A89 указанное второе антитело или фрагмент антитела содержат последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей в соответствии с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A93) пункта A89 указанное второе антитело или фрагмент антитела содержат последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A94) пункта A89 указанное второе антитело или фрагмент антитела содержат последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 95% идентичностью с клонально-спаренными последовательностями из таблицы 2. В одном аспекте (A95) пункта A89 фрагмент второго антитела представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из вариабельных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. В одном аспекте (A96) пункта A89 способ дополнительно включает выполнение стадий (c) и (d) во второй раз для определения антигенной стабильности антигена с течением времени.

В одном аспекте (A97) в данном документе предусмотрено человеческое моноклональное антитело или фрагмент антитела, или гибридома или сконструированная клетка, продуцирующие их, где указанное антитело связывается с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2.

Использование формы единственного числа в сочетании с термином «содержащий» в формуле изобретения и/или описании может означать «один», но оно также согласуется со значением «один или несколько», «по меньшей мере один» и «один или более одного». Слово «приблизительно» означает плюс или минус 5% от указанного числа.

Предполагается, что любой способ или композиция, описанные в данном документе, могут быть реализованы применительно к любому другому способу или композиции, описанным в данном документе. Другие цели, особенности и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, даны только в качестве

иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области из этого подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Материалы для подачи патента или заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии публикации данного патента или заявки на патент с цветным(-и) графическим(-и) материалом(-ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Настоящее изобретение можно лучше понять при обращении к одному или нескольким из этих графических материалов в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

ФИГ. 1. Матрица доза-ответ для оценки синергической нейтрализующей активности смеси COV2-2196 + COV2-2130 с использованием живого вируса BSL3 SARS-CoV-2. При самых высоких протестированных концентрациях (250 нг/мл) взятых по отдельности mAb (рамки с 0 нг/мл COV2-2196 + 250 нг/мл COV2-2130 и 250 нг/мл COV2-2196 + 0 нг/мл COV2-2130) наблюдали качественный ответ с отсутствием нейтрализации вируса в небольшой фракции образцов, однако при комбинации в диапазоне более низких концентраций Ab наблюдалась полная нейтрализация (100%). Рамка с 15,6 нг/мл COV2-2196 + 63 нг/мл COV2-2130 указывает на область с максимальным синергизмом при 15,6 нг/мл mAb COV2-2196 и 63 нг/мл mAb COV2-2130 в комбинации, которая нейтрализует 96% вируса, в то время как взятые по отдельности антитела показали только 6 или 0% нейтрализации соответственно (овалы с 0 нг/мл COV2-2196 + 63 нг/мл COV2-2130 и 15,6 нг/мл COV2-2196 + 0 нг/мл COV2-2130). Показаны средние значения для трех измерений в технических повторях.

ФИГ. 2А-В. Матрица доза-ответ для оценки синергической нейтрализующей активности смеси mAb COV2-2196 + mAb COV2-2130 с использованием живого вируса BSL3 SARS-CoV-2. Показаны средние значения для трех измерений в технических повторях. Визуализацию данных и оценку синергизма осуществляли с помощью программного обеспечения SynergyFinder.

ФИГ. 3. Матрица доза-ответ для оценки синергической нейтрализующей активности смеси mAb COV2-2196 + mAb COV2-2130 с использованием живого вируса BSL3 SARS-CoV-2. Интерпретация показателя синергизма: ≤ -10 : взаимодействие,

вероятно, будет антагонистическим; от -10 до 10: взаимодействие, вероятно, будет аддитивным; >10: взаимодействие, вероятно, будет синергическим.

ФИГ. 4А-С. Терапевтическая эффективность нейтрализующих человеческих mAb против развившейся инфекции SARS-CoV-2. (ФИГ. 4А) Мышам интраназально инокулировали 10^5 БОЕ MA-SARS-CoV-2, а через 12 часов проводили обработку указанными антителами путем внутрибрюшинной инъекции. Вирусную нагрузку в легких измеряли через 2 дня после контрольного заражения вирусом с использованием анализа бляшкообразования. Показаны измерения для отдельных мышей и медианный титр, и каждую группу сравнивали с изотипическим контролем с использованием ANOVA Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна (* $p < 0,05$). Данные представляют один эксперимент. (ФИГ. 4В) Мышей BALB/c в возрасте от десяти до одиннадцати недель (один эксперимент с 3-9 мышами на группу) обрабатывали mAb к Ifnar1 и спустя один день их интраназально трансдуцировали с помощью AdV-hACE2. Через четыре дня мышам интраназально инокулировали 10^5 БОЕ аутентичного SARS-CoV-2, а через 12 часов проводили обработку данными mAb путем внутрибрюшинной инъекции. Вирусную нагрузку в легких измеряли через 2 dpi после контрольного заражения вирусом с использованием анализа бляшкообразования. Два контроля для анализа эффективности нейтрализации бляшкообразования включали гомогенаты легких отдельных мышей, обработанных изотипами, которые смешивали в соотношении 1:1 (объем:объем) с гомогенатами легких отдельных неинфицированных мышей или мышей, обработанных смесью mAb COV2-2196 + COV2-2130. Показаны измерения для отдельных мышей и медианный титр, и каждую группу сравнивали с изотипическим контролем с использованием ANOVA Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна (** $p < 0,01$). Данные представляют один эксперимент. (ФИГ. 4С) Экспрессию генов цитокинов и хемокинов измеряли с помощью qPCR-анализа в легких, собранных, как показано на ФИГ. 4В. Показаны измерения для отдельных мышей и медианные значения. Группы сравнивали с использованием U-критерия Манна-Уитни (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

ФИГ. 5. Фармакокинетика антител после инфузии человеческих mAb макакам.

ФИГ. 6. Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 (измеряемая как субгеномная новообразованная РНК) в бронхоальвеолярном лаваже макак после интраназального и интратрахеального контрольного заражения вирусом SARS-CoV-2 дикого типа.

ФИГ. 7. Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 (измеряемая как субгеномная новообразованная РНК) в образцах мазка из носа макак после интраназального и интратрахеального контрольного заражения вирусом SARS-CoV-2 дикого типа.

ФИГ. 8А-Е. Кристаллическая структура RBD S-белка в комплексе с Fab COV2-2196. (ФИГ. 8А) Ленточная форма представления COV2-2196 в комплексе с RBD. Тяжелая цепь COV2-2196 показана голубым цветом, легкая цепь – пурпурным, а RBD – зеленым. Выделение цветом имеется на фиг. 8А в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 8В) Структура комплекса COV2-2196-RBD наложена на структуру комплекса RBD-ACE2 человека (идентификатор PDB: 6M0J) с использованием структуры RBD в качестве эталона. Цветовая схема комплекса COV2-2196-RBD такая же, как на ФИГ. 8А. RBD в комплексе RBD-ACE2 окрашен в светло-голубой цвет, домен пептидазы ACE2 человека – в серый. Выделение цветом имеется на фиг. 8В в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 8С) Структура комплекса COV2-2196-RBD наложена на структуру шиповидного белка с одиночным RBD в конформации "вверх" (идентификатор PDB: 6XM4) с использованием RBD в конформации «вверх» в качестве эталона. Цветовая схема комплекса COV2-2196-RBD такая же, как на ФИГ. 8А. Три субъединицы шиповидного белка окрашены в серый, желтый или светло-голубой цвет соответственно (субъединица с RBD в конформации "вверх" окрашена в желтый цвет). Выделение цветом имеется на фиг. 8С в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 8D) Форма представления эпитопа RBD, распознаваемого COV2-2196, в виде поверхности. Остатки эпитопа окрашены в разные оттенки зеленого и помечены черным цветом. Выделение цветом имеется на фиг. 8D в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 8Е) Взаимодействия антитело-антиген между COV2-2196 и RBD. RBD показан в той же форме представления в виде поверхности и ориентации, что и на ФИГ. 8D. Остатки паратопа COV2-2196 показаны в палочковой форме представления. Тяжелая цепь окрашена в голубой цвет, а легкая цепь – в пурпурный. Выделение цветом имеется на фиг. 8Е в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ФИГ. 9А-F. Кристаллическая структура RBD S-белка в комплексе с Fab COV2-2196 и COV2-2130 одновременно. (ФИГ. 9А) Ленточная форма представления кристаллической структуры RBD S-белка в комплексе с Fab COV2-2196 и COV2-2130. RBD показан зеленым цветом, тяжелая цепь COV2-2196 – голубым, легкая цепь COV2-2196 – пурпурным, тяжелая цепь COV2-2130 – желтым, а легкая цепь COV2-2130 – оранжевым. В COV2-2130 помечены CDR. Выделение цветом имеется на фиг. 9А в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 9В) Структура комплекса COV2-2130-RBD наложена на структуру комплекса RBD-ACE2 (идентификатор PDB:

6M0J) с использованием структуры RBD в качестве эталона. Цветовая схема комплекса COV2-2130-RBD такая же, как и на ФИГ. 9А. RBD в комплексе RBD-ACE2 окрашен в светло-голубой цвет, домен пептидазы ACE2 человека – в серый. Выделение цветом имеется на фиг. 9В в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 9С) Структура комплекса COV2-2130-RBD наложена на структуру шиповидного белка, при этом все RBD находятся в конформации "вниз" (ID PDB: 6ZOY), с использованием RBD в одном протомере в качестве эталона. Цветовая схема комплекса COV2-2130-RBD такая же, как на ФИГ. 9А. Три протомера шиповидного белка окрашены в серый, светло-голубой или фиолетовый цвет соответственно. Выделение цветом имеется на фиг. 9С в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 9D) Структура комплекса COV2-2196-2130-RBD наложена на структуру шиповидного белка с одним RBD в конформации "вверх" (ID PDB: 7CAK) с использованием RBD в конформации «вверх» в качестве эталона. Цветовая схема комплекса COV2-2130-RBD такая же, как на ФИГ. 9А. Три протомера шиповидного белка окрашены в серый, светло-голубой или фиолетовый цвет соответственно. Выделение цветом имеется на фиг. 9D в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 9Е) Форма представления эпитопа RBD, распознаваемого COV2-2130, в виде поверхности. Остатки эпитопа обозначены разными цветами и помечены черным цветом. Выделение цветом имеется на фиг. 9Е в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 9F) Взаимодействие остатков паратопа COV2-2130 с эпитопом. RBD показан в той же форме представления в виде поверхности и ориентации, что и на ФИГ. 9Е. Остатки паратопа показаны в палочковой форме представления. Тяжелая цепь окрашена в желтый, а легкая – в оранжевый. Выделение цветом имеется на фиг. 9F в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ФИГ. 10А-В. (ФИГ. 10А) Результаты выравнивания с введением гэпов IMGT/доменов тяжелой и легкой цепей COV2-2196. Ключевые взаимодействующие остатки и соответствующие им остатки в генах зародышевой линии показаны в рамках. SEQ ID NO для последовательностей на ФИГ. 10А являются следующими:

	FR2-HCDR2	HCDR3-FR4	LCDR1-FR2	LCDR3-FR4
IGHV1-58	SEQ ID NO. 101	SEQ ID NO. 102		
IGHD2-2		SEQ ID NO. 103		
IGHD2-8		SEQ ID NO. 104		
IGHD2-15		SEQ ID NO. 105		
IGHJ3*02		SEQ ID NO. 106		
IGKV3-20			SEQ ID NO. 107	SEQ ID NO. 108
IGKJ1*01				SEQ ID NO. 109
COV2-2196	SEQ ID NO. 110	SEQ ID NO. 111	SEQ ID NO. 112	SEQ ID NO. 113
COV2-2381	SEQ ID NO. 114	SEQ ID NO. 115	SEQ ID NO. 116	SEQ ID NO. 117
COV2-2072	SEQ ID NO. 118	SEQ ID NO. 119	SEQ ID NO. 120	SEQ ID NO. 121
McC5t2p1_G1	SEQ ID NO. 122	SEQ ID NO. 123	SEQ ID NO. 124	SEQ ID NO. 125
HbnC3t1p2_C6	SEQ ID NO. 126	SEQ ID NO. 127	SEQ ID NO. 128	SEQ ID NO. 129
HbnC3t1p1_C6	SEQ ID NO. 130	SEQ ID NO. 131	SEQ ID NO. 132	SEQ ID NO. 133
S2E12	SEQ ID NO. 134	SEQ ID NO. 135	SEQ ID NO. 136	SEQ ID NO. 137
COV107_1	SEQ ID NO. 138	SEQ ID NO. 139	SEQ ID NO. 140	SEQ ID NO. 141
COV107_2	SEQ ID NO. 142	SEQ ID NO. 143	SEQ ID NO. 144	SEQ ID NO. 145
COV72	SEQ ID NO. 146	SEQ ID NO. 147	SEQ ID NO. 148	SEQ ID NO. 149
COV21_1	SEQ ID NO. 150	SEQ ID NO. 151	SEQ ID NO. 152	SEQ ID NO. 153
COV21_2	SEQ ID NO. 154	SEQ ID NO. 155	SEQ ID NO. 156	SEQ ID NO. 157
COV57_1	SEQ ID NO. 158	SEQ ID NO. 159	SEQ ID NO. 160	SEQ ID NO. 161
COV57_2	SEQ ID NO. 162	SEQ ID NO. 163	SEQ ID NO. 164	SEQ ID NO. 165

(ФИГ. 10В) Кривые связывания точечных мутантов COV2-2196. кДНК, кодирующие точечных мутантов для тяжелой цепи, указанных выше в рамке, сконструировали, синтезировали в виде ДНК для получения рекомбинантных белков IgG и тестировали в отношении активности связывания с шиповидным белком. Мутанты по остатку D108 представлены на верхнем левом графике, обратная мутация предполагаемых соматических мутаций в последовательность зародышевой линии представлена на верхнем правом графике, мутанты по Р99 представлены на нижнем левом графике, а мутант с удалением дисульфидной связи в HCDR3 представлен на нижнем правом графике.

ФИГ. 11А-Н. Идентификация критически важных остатков для COV2-2196 и COV2-2130 посредством глубокого мутационного сканирования в сочетании с отбором устойчивых вариантов. (ФИГ. 11А) Графики в виде логотипов последовательности, изображающие фракции мутаций ускользания от всех в сайтах RBD с сильным ускользанием для COV2-2196 (слева) или COV2-2130 (справа). Более высокие буквы указывают на большее ускользание от связывания антителом. Мутации окрашены в зависимости от степени, в которой они снижают связывание RBD с ACE2 человека. Показанные данные представляют собой среднее значение двух независимых экспериментов по отбору ускользания с использованием двух независимых дрожжевых библиотек; корреляции показаны на ФИГ. 18В-С. Интерактивные, масштабируемые версии этих графиков в виде логотипов последовательности доступны по адресу jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/. Авторы настоящего изобретения определили фракции ускользания, описанные в способах, как представляющие расчетную относительную долю клеток, экспрессирующих такой конкретный вариант, который попадает в категорию ускользания от антитела, так что значение 0 означает, что вариант всегда связывается антителом, а значение 1 означает, что он всегда ускользает от связывания антителом. (ФИГ. 11В) Графики в виде логотипа последовательности для фракции мутаций ускользания для COV2-2196 и COV2-2130, которых можно достичь с помощью однонуклеотидных замен в эталонном штамме Wuhan-Hu-1, используемом при отборе ускользания (ФИГ. 11Е-Ф). Влияние каждой замены на связывание с ACE2 представлено на ФИГ. 11А. (ФИГ. 11С) Левая панель: картирование мутаций ускользания от COV2-2196, которые определены с помощью глубокого мутационного сканирования, на поверхности RBD в структуре RBD-COV2-2196. Мутации, препятствующие связыванию с COV2-2196, продемонстрированы на структуре RBD с использованием тепловой карты, где синий цвет представляет сайт RBD с наибольшим кумулятивным ускользанием от антитела, а белый цвет представляет отсутствие обнаруженного ускользания. Серым цветом обозначены остатки, чье вредное воздействие на экспрессию RBD помешало оценить

влияние мутации на связывание антителом. Правая панель: увеличенное изображение левой панели, показывающее взаимодействующие остатки вокруг сайтов RBD с самым сильным ускользанием. Тяжелая цепь COV2-2196 окрашена в голубой, а легкая цепь – в пурпурный. Выполняли два повторных измерения с независимыми библиотеками, как описано на ФИГ. 11А. Выделение цветом имеется на фиг. 11С в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (ФИГ. 11D). Правая панель: картирование мутаций ускользания от COV2-2130, которые определены с помощью глубокого мутационного сканирования, на поверхности RBD в структуре RBD-COV2-2130. Мутации, которые нарушают связывание с COV2-2130, продемонстрированы в структуре RBD с использованием тепловой карты, как на ФИГ. 11С. Левая панель: увеличенное изображение левой панели, показывающее взаимодействующие остатки вокруг сайтов RBD с самым сильным ускользанием. Тяжелая цепь COV2-2130 окрашена в желтый, а легкая цепь – в оранжево-розовый. Выделение цветом имеется на фиг. 11D в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 11E) Таблица, показывающая результаты экспериментов по отбору ускользания VSV-SARS-CoV-2 с COV2-2196, COV2-2130 и их комбинацией. Отмечено число отобранных ускользающих мутантов и общее число выполненных повторов отбора ускользания, а также остатки, идентифицированные с помощью секвенирования ускользающих мутантных вирусов. (ФИГ. 11F) Таблица, показывающая результаты пассирования SARS-CoV-2 в присутствии субнейтрализующих концентраций AZD8895 (на основе COV2-2196), AZD1061 (на основе COV2-2130) и AZD7442 (AZD8895 + AZD1061). Отмечены ассоциированные с устойчивостью вирусные мутации, идентифицированные путем секвенирования устойчивых к нейтрализации бляшек. (ФИГ. 11G) Диаграмма рассеяния, показывающая данные DMS из ФИГ. 11А, при этом фракция мутаций ускользания нанесена на ось абсцисс, а влияние на связывание с ACE2 на ось ординат. Крестики обозначают мутации, которых можно достичь только при замене нескольких нуклеотидов, в то время как кружками обозначены мутации, которых можно достичь при замене одного нуклеотида. Отмечены аминокислотные замены, отобранные с помощью COV2-2130 в VSV-SARS-CoV-2 (K444R, K444E) или аутентичном SARS-CoV-2 (R346I). (ФИГ. 11H) Реакция нейтрализации с помощью антител, измеренная с помощью FRNT против эталонных штаммов и вызывающих озабоченность вариантов SARS-CoV-2. Анализы на основе реакции нейтрализации выполняли в двух опытах и повторяли дважды, при этом результаты показаны для одного экспериментального опыта. Столбики погрешностей отмечают диапазон для каждой точки. Мутации обозначены по сравнению с

эталонным штаммом WA-1. В.1.1.7-OXF содержит делецию 69-70 и 144-145 и следующие замены: N501Y, A570D, D614G, P681H и T716I.

ФИГ. 12. Наложение субструктуры RBD-COV2-2196 в комплексе RBD-COV2-2196-2130 и кристаллической структуры RBD-COV2-2196.

ФИГ. 13А-Г. Сходные паттерны ароматического стэкинга и гидрофобного взаимодействия в сайте F486 RBD являются общими для комплексов RBD-COV2-2196 и шиповидный белок-S2E12. (ФИГ. 13А и В) Одинаковый паттерн водородных связей, окружающих остаток F486 в структурах двух комплексов. (ФИГ. 13С) Подробная картина взаимодействий между COV2-2196 и RBD. Тяжелая цепь COV2-2196 окрашена в голубой, легкая цепь окрашена в пурпурный, а RBD окрашен в зеленый. Важные взаимодействующие остатки показаны в палочковой форме представления. Молекулы воды, участвующие во взаимодействии Ab-Ag, представлены в виде розовых сфер. Непосредственные водородные связи показаны как оранжевые пунктирные линии, водородные связи, опосредованные водой, как желтые пунктирные линии. Выделение цветом имеется на фиг. 2С дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 13D) Наложение структуры S2E12/RBD, полученной с помощью криоэлектронной микроскопии, на кристаллическую структуру COV2-2196/RBD, при этом переменные домены антител используются в качестве эталонов. Тяжелая цепь COV2-2196 выделена голубым, а легкая цепь – пурпурным; тяжелая цепь S2E12 окрашена в бледно-голубой, а его легкая цепь – в светло-розовый. Две соответствующие структуры RBD окрашены в зеленый или желтый соответственно. Выделение цветом имеется на фиг. 2D дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 13E) Подробная картина взаимодействий между тяжелой цепью COV2-2130 и RBD. Остатки паратопов показаны в палочковой форме представления и окрашены в желтый, остатки эпитопов – в виде зеленых палочек. Водородные связи или сильные полярные взаимодействия представлены как пунктирные пурпурные линии. Выделение цветом имеется на фиг. 2E дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 13F) Подробная картина взаимодействий между легкой цепью COV2-2130 и RBD. Остатки паратопов показаны в палочковой форме представления и окрашены в оранжевый, остатки эпитопов – в виде зеленых палочек. Водородные связи представлены как пунктирные пурпурные линии. Выделение цветом имеется на фиг. 2F дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ФИГ. 14А-Е. Общий клонотип антител к RBD с одинаковым механизмом связывания. (ФИГ. 14А) Кристаллическая структура COV2-2196/RBD. (ФИГ. 14В) Структура S2E12/RBD, полученная с помощью криоэлектронной микроскопии. (ФИГ. 14С) Модель гомологии COV2-2381/RBD. COV2-2072 кодирует сиквон N-связанного гликозилирования в HCDR3, обозначенный серыми сферами. Выделение цветом имеется на фиг. 3D дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 14D) Модель гомологии COV2-2072/RBD. (ФИГ. 14Е) Наложение кристаллической структуры COV2-2196/RBD (ФИГ. 14А) и структуры S2E12/RBD, полученной с помощью криоэлектронной микроскопии (ФИГ. 14В).

ФИГ. 15А-В. Идентификация предполагаемых представителей публичного клонотипа, генетически сходных с COV2-2196, в репертуарах генов переменных доменов антител у лиц, ранее не подвергавшихся воздействию вируса. Выравнивают последовательности генов переменных доменов антител от здоровых людей с такими же особенностями последовательностей, как у тяжелой цепи COV2-2196 (ФИГ. 15А) и легкой цепи (ФИГ. 15А и 15В). Последовательности от трех разных доноров, а также из пуповинной крови включали последовательности с особенностями публичного клонотипа. Особенности последовательности и контактные остатки, используемые в COV2-2196, выделены цветными прямоугольниками под каждым множественным выравниванием последовательностей (прямоугольники окрашены красным на фиг. 4А дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). SEQ ID NO для последовательностей тяжелой цепи на ФИГ. 15А являются следующими: HIP1: SEQ ID NO: 166, HIP2: SEQ ID NO: 167, HIP3: SEQ ID NO: 168 и CORD: SEQ ID NO: 169. SEQ ID NO для последовательностей легкой цепи на ФИГ. 15А являются следующими: HIP1: SEQ ID NO: 170, HIP2: SEQ ID NO: 171 и HIP3: SEQ ID NO: 172. SEQ ID NO для последовательностей легкой цепи от HIP1 на ФИГ. 15В являются следующими: SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176 и SEQ ID NO: 177 (сверху вниз). SEQ ID NO для последовательностей легкой цепи от HIP2 на ФИГ. 15В являются следующими: SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 182 (сверху вниз). SEQ ID NO для последовательностей легкой цепи от HIP3 на ФИГ. 15В являются следующими: SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 и SEQ ID NO: 187 (сверху вниз).

ФИГ. 16А-Д. (ФИГ. 16А) Подробная картина структуры петли HCDR3 в COV2-2130. Водородные связи ближнего порядка, стабилизирующие конформацию петли, показаны пунктирными линиями (пунктирные линии окрашены в пурпурный на фиг. 5А

дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). (ФИГ. 16B) Остатки легкой цепи COV2-2130 формируют ароматические стэкинг-взаимодействия и водородные связи с HCDR3 для дополнительной стабилизации петли HCDR3. (ФИГ. 16C) Длинные LCDR1, HCDR2 и HCDR3 образуют комплементарную связывающую поверхность для эпитопа RBD. RBD показан в форме представления в виде поверхности, окрашенной в серый цвет. Тяжелая цепь COV2-2130 окрашена в желтый с оранжевым HCDR3, а легкая цепь – в оранжево-розовый с пурпурным LCDR1. Выделение цветом имеется на фиг. 3D дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки о всей своей полноте. (Фиг. 16D) Вид ФИГ. 16C с поворотом на 180°.

ФИГ. 17. Поверхность контакта между COV2-2196 и COV2-2130 в кристаллической структуре RBD в комплексе с COV2-2196 и COV2-2130. Тяжелая или легкая цепи COV2-2196 показаны в ленточной форме представления, окрашенной голубым или пурпурным цветом соответственно, а тяжелая или легкая цепи COV2-2130 – желтым или оранжево-розовым цветом соответственно. RBD окрашен в зеленый. Выделение цветом имеется на фиг. 6 дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всем своем объеме. Остатки поверхности контакта показаны в палочковой форме представления.

ФИГ. 18A-I. Идентификация путем глубокого мутационного сканирования мутаций, влияющих на связывание антителом, и способ отбора устойчивых к антителам мутантов с вирусом VSV-SARS-CoV-2. (ФИГ. 18A) Вверху: графики проточной цитометрии, показывающие репрезентативную стратегию гейтирования для отбора отдельных дрожжевых клеток с использованием прямого и бокового рассеяния (первые три панели) и отбора дрожжевых клеток, экспрессирующих RBD (правая панель). Каждый график является производным предыдущего гейтирования. Внизу: графики проточной цитометрии, показывающие гейтирование для RBD⁺, антитело⁻ дрожжевых клеток (т. е. клеток, которые экспрессируют RBD, но в которых мутация предотвращает связывание антителом). Эксперименты по отбору показаны для COV2-2196 или COV2-2130, при этом для каждого из них показаны две независимые библиотеки. (ФИГ. 18B) Корреляция по наблюдаемым сайтам ускользания от связывания антителом между экспериментами по отбору дрожжевой библиотеки с использованием COV2-2196, COV2-2130 или смеси COV2-2196 и COV2-2130 в соотношении 1:1. По осям X показана кумулятивная фракция ускользания для каждого сайта для библиотеки 1, а по осям Y показана кумулятивная относительная доля ускользания для каждого сайта для библиотеки 2. Для каждого графика обозначены коэффициент корреляции и *n*. (ФИГ. 18C) Корреляция

по наблюдаемым мутациям, которые ускользают от связывания антителом, между экспериментами по отбору дрожжевой библиотеки с использованием COV2-2196, COV2-2130 или смеси COV2-2196 и COV2-2130 в соотношении 1:1. По осям X показана фракция ускользания каждой аминокислотной мутации для библиотеки 1, а по осям Y показана фракция ускользания каждой аминокислотной мутации для библиотеки 2. Для каждого графика обозначены коэффициент корреляции и *n*. (ФИГ. 18D-F) Результаты DMS для COV2-2196 (ФИГ. 18D), COV2-2130 (ФИГ. 18E) или смеси COV2-2196 и COV2 2130 в соотношении 1:1 (ФИГ. 18F). Левые панели: сайты ускользания по всему RBD обозначены пиками, которые соответствуют графикам в виде логотипа последовательности на средней и правой панели. Средняя панель: как на ФИГ. 11A, график в виде логотипа последовательности кумулятивных фракций мутаций ускользания для всех сайтов RBD с мутациями сильного ускользания для COV2-2196, или COV2-2130, или COV2-2196+COV2-2130. Мутации окрашены в зависимости от степени, в которой они устраняют связывание RBD с ACE2 человека. Правая панель: снова, графики в виде логотипа последовательности показывают кумулятивные фракции ускользания, но окрашены в зависимости от степени, в которой мутации влияют на экспрессию RBD в системе дрожжевого дисплея. Интерактивные, масштабируемые версии этих графиков в виде логотипа последовательности доступны по адресу jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/. Выделение цветом имеется на фиг. 7F дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (ФИГ. 18G). Репрезентативные сенсограммы RTCA, показывающие вирус, ускользнувший от нейтрализации антителом. Цитопатический эффект (CPE) отслеживали кинетическим образом в клетках Vero E6, инокулированных вирусом в присутствии насыщающей концентрации (5 мкг/мл) антитела COV2-2130. Показаны репрезентативные случаи ускользания (пурпурный) или отсутствия обнаруживаемого ускользания (синий). Неинфицированные клетки (зеленые) или клетки, инокулированные вирусом без антитела (красные), служат в качестве контроля. Пурпурные и синие кривые представляют отдельную репрезентативную лунку; красный и зеленый контроли представляют среднее значение технических повторов. Выделение цветом имеется на фиг. 7G дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 18H) Репрезентативные сенсограммы RTCA, подтверждающие, что вариант вируса, отобранный с помощью COV2-2130 на ФИГ. 18G, действительно ускользал от COV2-2130 (пурпурный), но нейтрализовался с помощью COV2-2196 (голубой). Выделение цветом имеется на фиг. 7H дополнительных данных в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 18I)

Примеры сенсограмм из отдельных лунок в анализе с 96-луночным Е-планшетом для экспериментов по отбору ускользания с COV2-2196, COV2-2130 или смесью COV2-2196 и COV2-2130 в соотношении 1:1. Отмечены случаи ускользания от COV2-2130, при этом не выявлено ускользания в присутствии COV2-2196 или COV2-2196+COV2-2130. Положительный и отрицательный контроли обозначены на первом планшете.

ФИГ. 19. Способ отбора устойчивых к антителам мутантов с применением аутентичного вируса SARS-CoV-2.

ФИГ. 20(A-I). Функциональные характеристики mAb, нейтрализующих SARS-CoV-2. (ФИГ. 20A) Тепловая карта нейтрализующей активности mAb, активности блокирования hACE2 и связывания либо с тримерным белком S2Pecto, либо с мономерным SRBD. MAб упорядочены по эффективности нейтрализации (самая высокая сверху, самая низкая внизу). Пунктирные линии показывают 13 антител со значением IC50 нейтрализации ниже 150 нг/мл для вируса дикого типа (wt). Значения IC50 визуализированы для нейтрализации вируса и блокирования hACE2, тогда как для связывания визуализированы значения EC50. Рекомбинантная форма перекрестно-реактивного mAb к SRBD SARS-CoV, CR3022, показана в качестве положительного контроля, тогда как mAb к вирусу лихорадки денге, 2D22, показано в качестве отрицательного контроля. Данные представляют по меньшей мере 2 независимых эксперимента, каждый из которых выполняли с техническими повторами. Отсутствие ингибирования указывает значение IC50, составляющее >10000 нг/мл, тогда как отсутствие связывания указывает значение EC50, составляющее >10000 нг/мл. (ФИГ. 20B-E) Корреляция блокирования hACE2, связывания тримера S2Pecto или связывания SRBD под действием mAb с их нейтрализующей активностью. Значения R2 показаны для линейного регрессионного анализа логарифмически преобразованных значений. Темные кружки (показаны фиолетовым цветом на ФИГ. 1B-E из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) указывают на mAb со значением IC50 нейтрализации ниже 150 нг/мл. (ФИГ. 20E) Корреляция блокирования hACE2 и связывания тримера S2Pecto. Значения R2 показаны для линейного регрессионного анализа логарифмически преобразованных значений. (ФИГ. 20F) Кривые нейтрализации для COV2-2196 и COV2-2130 в анализе нейтрализации аутентичного вируса SARS-CoV-2. Рассчитанные значения IC50 отмечены на графике. Столбики погрешностей обозначают стандартное отклонение каждой точки. Данные представляют по меньшей мере 2 независимых эксперимента, каждый из которых выполняли с техническими повторами. (ФИГ. 20G) Кривые нейтрализации для COV2-2196 и COV2-2130 в анализе нейтрализации псевдовируса. Столбики погрешностей обозначают стандартное отклонение каждой точки.

Показанные значения являются измерениями в двух технических повторах из одного эксперимента. На графике обозначены рассчитанные значения IC50 из минимум 6 экспериментов. (ФИГ. 20H) Кривые блокирования hACE2 для COV2-2196, COV2-2130 и неблокирующего mAb к SARS-CoV, rCR3022, в анализе ELISA блокирования hACE2. Рассчитанные значения IC50 отмечены на графике. Столбики погрешностей обозначают стандартное отклонение каждой точки. Показанные значения являются измерениями в трех технических повторах из репрезентативного эксперимента, повторенного дважды. (ФИГ. 20I) ELISA-анализ связывания COV2-2196, COV2-2130 и rCR3022 с тримерным S2Pecto. Рассчитанные значения EC50 отмечены на графике. Столбики погрешностей обозначают стандартное отклонение каждой точки. Показанные значения являются измерениями в трех технических повторах из репрезентативного эксперимента, повторенного дважды.

ФИГ. 21 (A-D). Картирование эпитопов mAb в анализе конкурентного связывания и синергической нейтрализации с помощью пары mAb. (ФИГ. 21A) Слева: анализ конкурентного связывания на основе биослойной интерферометрии, измеряющий способность mAb предотвращать связывание эталонных mAb COV2-2196 и rCR3022 с RBD, слитым с Fc мыши (RBD-mFc), загруженным на биосенсоры с антителами к Fc мыши. Значения в клетках представляют собой % связывания эталонного mAb в присутствии конкурирующего mAb относительно контроля с имитационной конкуренцией. Черные клетки обозначают полную конкуренцию (<33% связывания относительно контроля без конкуренции), тогда как белые клетки обозначают отсутствие конкуренции (>67% связывания относительно контроля без конкуренции). Справа: анализ конкурентного связывания на основе биослойной интерферометрии, измеряющий способность mAb предотвращать связывание hACE2. Значения обозначают % связывания hACE2, нормализованные по связыванию hACE2 в отсутствие конкуренции. Штриховка обозначает конкуренцию mAb с hACE2. (Штриховка показана красным цветом на ФИГ. 2A из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). (ФИГ. 21B) Конкуренция панели нейтрализующих mAb с эталонными mAb COV2-2130, COV2-2196 или rCR3022. Эталонные mAb биотинилировали, и связывание эталонных mAb с тримерным S2Pecto измеряли в присутствии насыщающих количеств каждого mAb в конкурентном ELISA. Сигнал ELISA для каждого эталонного mAb нормализовали по сигналу в присутствии несвязывающего mAb к вирусу лихорадки денге 2D22. Черный цвет обозначает полную конкуренцию (<25% связывания эталонного mAb), серый цвет обозначает частичную конкуренцию (25-60% связывания эталонного mAb), а белый цвет обозначает отсутствие конкуренции (>60% связывания эталонного mAb).

(ФИГ. 21C) Синергическая нейтрализация SARS-CoV-2 дикого типа с помощью COV2-2196 и COV2-2130. Вверху: матрица реакции нейтрализации с серийными разведениями каждого mAb. Эксперимент проводили в трех технических повторях. Показан репрезентативный эксперимент из нескольких, который выполняли в трех технических повторях. % нейтрализации для каждой комбинации mAb показан в каждой клетке. Тепловая карта от белого к черному обозначает от 0% нейтрализации до 100% нейтрализации соответственно. (Тепловая карта показана от белого к красному на ФИГ. 2C из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). (ФИГ. 21D) Матрица синергизма, рассчитанная на основе реакции нейтрализации SARS-CoV-2 на ФИГ. 21C. Более темный цвет (показан красным на ФИГ. 2D примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) обозначает области, где наблюдалась синергическая нейтрализация, а черный прямоугольник обозначает область максимального синергизма между двумя mAb.

ФИГ. 22 (A-F). Идентификация эпитопов и структурная характеристика mAb.

(ФИГ. 22A) Идентификация критически важных контактных остатков с помощью аланинового и аргининового мутагенеза. Вверху: связывание COV2-2130 (золотой), COV2-2165 (бордовый) или COV2-2196 (темно-фиолетовый) с конструкцией SRBD дикого типа (wt) или мутантной конструкцией, измеренное с помощью биослойной интерферометрии. По оси Y показан ответ, нормализованный по сигналу, наблюдаемому при связывании с SRBD wt. Внизу: репрезентативные кривые связывания COV2-2196 с конструкцией SRBD wt или конструкцией с мутированными критически важными контактными остатками. Выделение цветом имеется на ФИГ. 3A из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 22B) Кристаллическая структура SARS-CoV-2 (синий) и hACE2 (зеленый) (PDB 6M0J). Мотив распознавания hACE2 окрашен в оранжевый. Критически важные контактные остатки для COV2-2130 показаны как золотые сферы, тогда как критически важные контактные остатки для COV2-2196 показаны как фиолетовые сферы. Выделение цветом имеется на ФИГ. 3B из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 22C) ELISA-анализ связывания mAb с мотивом распознавания hACE2 из 60 аминокислот. r2D22, mAb к вирусу лихорадки денге, показано в качестве отрицательного контроля. Внизу: структура мотива распознавания hACE2 выделена оранжевым, а критически важные контактные остатки COV2-2196 показаны фиолетовым. Выделение цветом имеется на ФИГ. 3C из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 22D) Комплексы одиночный

Fab:тример S2Pecto, визуализированные с помощью электронной микроскопии с негативным окрашиванием, для COV2-2130 (золотой), COV2-2165 (бордовый) или COV2-2196 (темно-фиолетовый). RBD показан синим, а N-концевой домен (NTD) S-белка показан красным. Электронная плотность показана серым. Состояние тримера (открытое или закрытое) обозначено для каждого комплекса. Репрезентативные средние значения класса 2D для каждого комплекса показаны внизу (размер окна 128 пикселей). Выделение цветом имеется на ФИГ. 3D из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 22E) Fab COV2-2130 и Fab COV2-2196 в комплексе с тримером S2Pecto. Одновременное связывание Fab COV2-2130 (золотой) и Fab COV2-2196 (фиолетовый) с тримером S2Pecto. Электронная плотность показана серым. Обозначено состояние тримера (открытый или закрытый). Репрезентативные средние значения класса 2D для комплексов показаны внизу (размер окна 128 пикселей). Все изображения выполнены с помощью Chimera. Выделение цветом имеется на ФИГ. 3E из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (ФИГ. 22F) Анализ конкурентного связывания, визуализированный на тримере S2Pecto. Осуществляли докинг кристаллической структуры CR3022 в структуру двойной Fab:тример S2Pecto. CR3022 показан голубым. Выделение цветом имеется на ФИГ. 3F из примера 5 в U.S. 63/161890, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Внизу: на количественной диаграмме Венна отмечено число mAb в каждой группе конкуренции и перекрытие между группами.

ФИГ. 23 (А-Е). Защитная эффективность нейтрализующих человеческих mAb против инфицирования SARS-CoV-2. (ФИГ. 23А) Модель контрольного заражения SARS-CoV-2. Мышей BALB/c в возрасте от десяти до одиннадцати недель (два эксперимента с 4-5 мышами на группу) обрабатывали mAb к Ifnar1 и спустя один день их трансдуцировали с помощью AdV-hACE2 i.n. путем. Через четыре дня мышей обрабатывали внутрибрюшинно с помощью 200 мкг mAb CoV2-2196, -2130 или комбинации (в соотношении 1:1), или mAb изотипического контроля. Спустя один день инокулировали SARS-CoV-2 i.n. путем. Ткани для анализа собирали через 7 dpi (ФИГ. 23С и 23D). (ФИГ. 23В) Изменение массы тела мышей из панели а. (двусторонний обычный ANOVA с апостериорным критерием Тьюки: **** $P < 0,0001$). (ФИГ. 2С) Вирусную нагрузку в легких, селезенке и сердце измеряли с помощью RT-qPCR: ANOVA Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна (*, $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$). Пунктирная линия указывает предел обнаружения анализа. (ФИГ. 23D). Экспрессию генов цитокинов и хемокинов измеряли с помощью анализа на основе qPCR. ANOVA Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна (*, $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ***

$P < 0,001$). (ФИГ. 23Е) Модель контрольного заражения MA-SARS-CoV-2. Мышам BALB/c в возрасте двенадцать недель ($n=10$) инокулировали 10^5 БОЕ MA-SARS-CoV-2 i.n. путем. Показано изменение массы тела мышей. (ФИГ. 23F) Вирусную нагрузку в легких измеряли через 2 dpi с помощью RT-qPCR (слева) или анализа бляшкообразования (справа) из (ФИГ. 23Е): ANOVA Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна (** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$).

ФИГ. 24. Кривые нейтрализации SARS-CoV-2 для панели mAb. Нейтрализация аутентичного SARS-CoV-2 с помощью человеческих mAb. Показано среднее значение $\pm$ SD для двух технических повторов. Данные представляют один из двух или более независимых экспериментов.

ФИГ. 25А-В. Кривые ингибирования для ингибирования связывания S2Pecto с hACE2 с помощью mAb. Блокирование связывания hACE2 с S2Pecto с помощью нейтрализующих человеческих mAb к SARS-CoV-2. Показано среднее значение $\pm$ SD для трех повторов одного эксперимента. Антитела CR3022 и 2D22 служили в качестве контроля.

ФИГ. 26А-В. ELISA-анализ связывания нейтрализующих человеческих mAb к SARS-CoV-2 с тримерным антигеном SRBD, S2Pecto или SARS-CoV S2Pecto. Показано среднее значение $\pm$ SD для трех повторов и репрезентативное значение для двух экспериментов. Антитела CR3022 и 2D22 служили в качестве контроля.

ФИГ. 27А-В. Картирование критически важных контактных остатков mAb с помощью аланинового и аргининового мутагенеза и биослойной интерферометрии. (ФИГ. 27А) Слева: значения ответа для связывания mAb с конструкцией SRBD wt или мутантной конструкцией, нормализованные по wt. Звездочками обозначены остатки, в которых наблюдалась повышенная диссоциация mAb, что, вероятно, указывает на то, что остаток находится вблизи к эпитопу mAb. Справа: кривые полного ответа для ассоциации и диссоциации mAb с конструкцией SRBD wt или мутантной конструкцией. (ФИГ. 27В) Структура RBD с выделением цветом критически важных контактных остатков для нескольких mAb и их расположения в структуре.

ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Как обсуждалось выше, SARS-CoV-2 представляет собой большую проблему в области здравоохранения с ежедневным увеличением числа активных случаев заболевания. Поэтому понимание биологии этого вируса, а также природы и степени иммунного ответа человека на вирус имеет первостепенное значение. Авторы настоящего изобретения идентифицировали последовательности человеческих антител к SARS-CoV-2. Эти последовательности и пути применения таких антител раскрыты в данном документе.

Более того, подробно изучив взаимодействие одного антитела (COV2-2196) с RBD, авторы настоящего изобретения идентифицировали молекулярную основу для выбора публичного клонотипа для SARS-CoV-2, который определяется сложной структурной конфигурацией, включающей как тяжелые, так и легкие цепи. Общие структурные особенности этого клонотипа приводят к образованию паратопа, содержащего остатки как в тяжелой, так и в легкой цепях, но, что удивительно, независимы от HCDR3, который обычно доминирует во взаимодействиях антиген-антитело. Авторы настоящего изобретения показывают, что этот публичный клонотип является одним из наиболее часто используемых типов в активных нейтрализующих антителах, вырабатываемых людьми в ответ на RBD S-белка SARS-CoV-2. Подробные структурные исследования выявили, что обычно образующийся паратоп антитела приводит к "ароматической клетке", образованной пятью ароматическими остатками в паратопе, окружающем поверхность контакта тяжелой и легкой цепей. Эта структура в виде клетки образует координационные связи с ароматическим остатком на S-белке SARS-CoV-2, что объясняет высокую специфичность и аффинность этих антител. Примечательно, что хотя для образования этого публичного клонотипа требуются как тяжелая, так и легкая цепи (таким образом, в клонотипе определены канонические гены IGHV, IGHJ, IGLV и IGLJ), HCDR3 минимально влияет на взаимодействие. Поскольку эти рекомбинации тяжелой цепи IGHV1-58-IGHJ3 и легкой цепи IGKV3-20-IGKJ1 являются общими в репертуаре преиммунных В-клеток, у многих людей, вероятно, такие клоны создаются во время ответа на инфицирование SARS-CoV-2 или вакцинацию. Антигенный сайт, распознаваемый сложной предопределенной структурой этого публичного клонотипа, вероятно, является важным компонентом защитной вакцины от COVID-19 в силу частоты клона В-клеток в человеческой популяции и нейтрализующей и защитной эффективности антител, кодируемых генными сегментами переменных доменов.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения подробно описаны ниже.

I. Коронавирус 2019 (SARS-CoV-2)

SARS-CoV-2 представляет собой контагиозный вирус, вызывающий острое респираторное заболевание, обозначенное как коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19), респираторная инфекция. Он является причиной продолжающейся вспышки коронавируса в 2019–2020 годах, глобальной чрезвычайной ситуации в области здравоохранения. Геномное секвенирование показало, что он представляет собой коронавирус с положительно-полярной однонитевой РНК.

Во время продолжающейся вспышки вирус часто упоминался в разговорной речи как "коронавирус", "новый коронавирус" и "уханьский коронавирус", в то время как ВОЗ

рекомендует обозначение "SARS-CoV-2". Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) объявил, что официальное данное название вируса – SARS-CoV-2.

Многие ранние случаи были связаны с крупным рынком морепродуктов и животных в китайском городе Ухань, и считается, что вирус имеет зоонозное происхождение. Сравнение генетических последовательностей этого вируса и других образцов вируса показало сходство с SARS-CoV (79,5%) и коронавирусами летучих мышей (96%). Это открытие делает вероятным первичное происхождение от летучих мышей, хотя нельзя исключать промежуточного хозяина, такого как панголин. Вирус может быть рекомбинантным вирусом, образованным из двух или более коронавирусов.

Была подтверждена передача вируса от человека к человеку. Коронавирусы в основном распространяются при тесном контакте, в частности, воздушно-капельным путем при кашле и чихании на расстоянии приблизительно 6 футов (1,8 м). Вирусная РНК также была обнаружена в образцах стула инфицированных пациентов. Не исключено, что вирус может быть заразным даже во время инкубационного периода.

Первоначально предполагалось, что животные, продаваемые для употребления в пищу, являются резервуаром или промежуточными хозяевами SARS-CoV-2, поскольку многие из первых людей, инфицированных данным вирусом, были работниками рынка морепродуктов Хуанань. Во вспышке SARS в 2003 году также обвиняли рынок, где продавали живых животных для употребления в пищу; такие рынки считаются инкубаторами для новых патогенов. Вспышка вызвала временный запрет на торговлю и употребление в пищу диких животных в Китае. Однако некоторые исследователи высказали предположение, что рынок морепродуктов Хуанань не может быть первоначальным источником передачи вируса человеку.

При наличии достаточного числа секвенированных геномов можно реконструировать филогенетическое дерево истории мутаций семейства вирусов. Исследование происхождения вспышки SARS в 2003 году привело к открытию многих SARS-подобных коронавирусов летучих мышей, большинство из которых берет начало от подковоносых летучих мышей рода *Rhinolophus*. SARS-CoV-2 попадает в эту категорию SARS-связанных коронавирусов. Две геномные последовательности из *Rhinolophus sinicus*, опубликованные в 2015 и 2017 годах, показывают сходство с SARS-CoV-2 на 80%. Третий вирусный геном из *Rhinolophus affinis*, "RaTG13", собранный в провинции Юньнань, характеризуется 96% сходством с SARS-CoV-2.^{[28][29]} Для сравнения, эта величина изменчивости среди вирусов подобна количеству мутаций, наблюдаемых за десять лет в штамме вируса гриппа человека H3N2.

SARS-CoV-2 принадлежит к широкому семейству вирусов, известных как коронавирусы; "nCoV" является стандартным термином, используемым для обозначения новых коронавирусов до тех пор, пока не будет выбрано более конкретное обозначение. Он представляет собой вирус с положительно-полярной однонитевой РНК (+ssRNA). Другие коронавирусы способны вызывать недомогания, начиная от обычной простуды и заканчивая более тяжелыми заболеваниями, такими как ближневосточный респираторный синдром (MERS) и тяжелый острый респираторный синдром (SARS). Это седьмой известный коронавирус, инфицирующий людей, после 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV и SARS-CoV.

Подобно SARS-CoV, SARS-CoV-2 является представителем подрода *Sarbecovirus* (линия В бета-CoV). Длина его последовательности РНК составляет примерно 30000 оснований. К 12 января в Ухане было выделено пять геномов SARS-CoV-2, о которых сообщил Китайский центр по контролю и профилактике заболеваний (CCDC) и другие учреждения; к 26 января число геномов увеличилось до 28. За исключением самого раннего генома, внесенного GenBank, геномы находятся под эмбарго GISAID. Филогенетический анализ образцов доступен через Nextstrain.

Публикация генома SARS-CoV-2 привела к нескольким экспериментам по моделированию белка в отношении рецептор-связывающего белка (RBD) шиповидного (S) белка вируса. Результаты показывают, что S-белок сохраняет достаточную аффинность с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), чтобы использовать его в качестве механизма проникновения в клетку. 22 января группа в Китае, работающая с полным вирусом, и группа в США, работающая на основе обратной генетики, независимо и экспериментально продемонстрировали, что ACE2 человека является рецептором для SARS-CoV-2.

Для поиска потенциальных ингибиторов протеазы также была смоделирована вирусная 3С-подобная протеаза M(pro) из полипротеина ORF1a для экспериментов по докингу лекарственных средств. Innophore создала две вычислительные модели на основе протеазы SARS, а Китайская академия наук создала неопубликованную экспериментальную структуру рекомбинантной протеазы SARS-CoV-2. Кроме того, исследователи из Мичиганского университета смоделировали структуры всех зрелых пептидов в геноме SARS-CoV-2 с помощью I-TASSER.

Первое известное инфицирование человека произошло в начале декабря 2019 года. Вспышка SARS-CoV-2 была впервые обнаружена в Ухане, Китай, в середине декабря 2019 года, вероятно, она берет начало от одного инфицированного животного. Впоследствии вирус распространился по всем провинциям Китая и более чем двух десяткам других стран

Азии, Европы, Северной Америки и Океании. Во всех этих регионах подтверждена передача вируса от человека к человеку. 30 января 2020 года ВОЗ объявила SARS-CoV-2 глобальной чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения.

По состоянию на 10 февраля 2020 года (17:15 UTC) было зарегистрировано 40645 подтвержденных случаев инфицирования, из которых 40196 в пределах материкового Китая. Первоначально почти все случаи заболевания за пределами Китая встречались у людей, которые либо приехали из Уханя, либо находились в непосредственном контакте с кем-то, кто приехал из этой местности. Позже распространение от путешественников в другие страны привело к передаче во многих странах мира. Хотя доля инфекций, которые приводят к подтвержденному инфицированию или развитию диагностируемого острого респираторного заболевания SARS-CoV-2, остается неясной, общее число смертей, связанных с данным вирусом, по состоянию на 25 марта 2020 года превысило 19000 человек.

По оценкам, базовый индекс репродукции (R_0) вируса составляет от 1,4 до 3,9. Это означает, что если его не сдерживать, как правило, вирус приводит к 1,4-3,9 новым случаям заболевания на установленную инфекцию. Было установлено, что вирус может передаваться по цепочке из по меньшей мере четырех человек.

В январе 2020 года несколько организаций и учреждений начали работу по созданию вакцин от SARS-CoV-2 на основе опубликованного генома. В Китае вакцину против нового коронавируса разрабатывает Китайский центр по контролю и профилактике заболеваний. Университет Гонконга также объявил, что в нем разрабатывается вакцина. Восточная больница Шанхая также разрабатывает вакцину в сотрудничестве с биотехнологической компанией Stemirna Therapeutics.

За рубежом Коалиция за инновации в сфере готовности к эпидемиям (CEPI) поддерживает три проекта вакцин, в том числе проекты биотехнологических компаний Moderna и Inovio Pharmaceuticals и еще один проект Университета Квинсленда. Национальные институты здравоохранения США (NIH) сотрудничают с Moderna для создания РНК-вакцины, соответствующей шиповидному белку на поверхности коронавируса; клинические испытания фазы I начались в марте 2020 года. Inovio Pharmaceuticals разрабатывает вакцинацию на основе ДНК и сотрудничает с китайской фирмой, чтобы ускорить ее одобрение регулирующими органами Китая, в надежде провести испытания вакцины на людях летом 2020 года. В Австралии Университет Квинсленда исследует потенциал вакцины на основе "молекулярного зажима", которая будет генетически модифицировать вирусные белки, чтобы они имитировали коронавирус и стимулировали иммунную реакцию.

В рамках независимого проекта Агентство общественного здравоохранения Канады предоставило Международному центру вакцин (VIDO-InterVac) при Университете Саскачевана разрешение начать работу над вакциной. VIDO-InterVac планирует начать производство и тестирования на животных в марте 2020 года, а тестирования на людях – в 2021 году. Медицинский факультет Имперского колледжа в Лондоне в настоящее время находится на стадии тестирования вакцины на животных.

Острое респираторное заболевание COVID-19 представляет собой вирусное респираторное заболевание, вызываемое SARS-CoV-2. Впервые оно было обнаружено во время вспышки коронавируса в Ухане в 2019–2020 годах. Симптомы могут включать лихорадку, сухой кашель и затруднение дыхания. По состоянию на март 2020 года специфическое лицензированное лечение недоступно, и усилия сосредоточены на уменьшении симптомов и поддержке жизнедеятельности.

Инфицированные люди могут быть либо бессимптомными, либо иметь симптомы от легких до тяжелых, такие как лихорадка, кашель, затруднение дыхания. Диарея или симптомы со стороны верхних дыхательных путей (например, чихание, насморк, боль в горле) встречаются реже. Случаи тяжелой инфекции могут прогрессировать до тяжелой пневмонии, полиорганной недостаточности и смерти. Всемирная организация здравоохранения оценивает время от контакта с источником заражения до появления симптомов от 2 до 10 дней, а Центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC) США – от 2 до 14 дней.

Международные организации по здравоохранению опубликовали профилактические меры, которые люди могут предпринять, чтобы снизить вероятность инфицирования SARS-CoV-2. Рекомендации аналогичны ранее опубликованным для других коронавирусов и включают: частое мытье рук с мылом и водой; не касаться глаз, носа или рта немытыми руками; и соблюдать правила респираторной гигиены.

ВОЗ опубликовала несколько протоколов тестирования на SARS-CoV-2. В тестировании используется полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (rRT-PCR). Тест может быть проведен на образцах из дыхательных путей или образцах крови. Результаты обычно доступны в течение нескольких часов или дней.

Исследования потенциальных методов лечения заболевания были начаты в январе 2020 года. В конце января Китайский центр по контролю и профилактике заболеваний приступил к тестированию существующих методов лечения пневмонии, связанной с коронавирусом. Также было проведено исследование ингибитора РНК-полимеразы ремдесивира и бета-интерферона. В конце января 2020 года китайские медицинские исследователи выразили намерение начать клиническое тестирование ремдесивира, хлорохина и

лопинавира/ритонавира, все из которых по данным предварительных исследований оказывали "довольно хорошее ингибирующее действие" на SARS-CoV-2 на клеточном уровне. 5 февраля 2020 года Китай начал патентовать применение ремдесивира для лечения заболевания.

Общие показатели смертности и заболеваемости в результате инфекции SARS-CoV-2 неизвестны как вследствие того, что уровень летальности может меняться с течением времени в ходе текущей вспышки, так и вследствие того, что доля инфекций, которые прогрессируют в диагностируемое заболевание, остается неясной. Однако предварительное исследование острого респираторного заболевания SARS-CoV-2 показало, что уровень летальности составляет от 2% до 3%, а в январе 2020 года ВОЗ предположила, что уровень летальности составляет примерно 3%. Нерецензированное предварительное опубликованное исследование Имперского колледжа среди 55 случаев со смертельным исходом показало, что ранние оценки смертности могут быть слишком высокими, поскольку бессимптомные инфекции не учитываются. Они оценили средний коэффициент летальности инфекции (смертность среди инфицированных) в диапазоне от 0,8% при включении бессимптомных носителей до 18% при включении только случаев с клиническими симптомами из провинции Хубэй.

Ранние данные показывают, что среди первого 41 подтвержденного случая поступивших в больницы в Ухане 13 (32%) человек нуждались в интенсивной терапии, а 6 (15%) человек умерли. Многие из тех, кто умер, изначально имели слабое здоровье, проявляя такие состояния, как гипертензия, диабет или сердечно-сосудистые заболевания, которые ослабляли их иммунную систему. В ранних случаях острого респираторного заболевания SARS-CoV-2, приведших к летальному исходу, обнаружили, что медиана времени заболевания составила 14 дней с общим диапазоном от шести до 41 дня.

II. Моноклональные антитела и их получение

"Выделенное антитело" представляет собой антитело, которое было отделено и/или извлечено из компонента его естественного окружения. Загрязняющие компоненты его естественного окружения представляют собой материалы, которые будут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворимые вещества. В конкретных вариантах осуществления антитело очищают: (1) до более чем 95% по массе антитела, как определено способом Лоури, и наиболее конкретно до более чем 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с применением секвенатора с вращающейся чашкой; или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE в

восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания кумасси синим или серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, поскольку по меньшей мере один компонент естественного окружения антитела не будет присутствовать. Однако обычно выделенное антитело будут получать с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

Основная четырехцепочечная структурная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. IgM-антитело состоит из 5 основных гетеротетрамерных структурных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и, следовательно, содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, в то время как секретируемые IgA-антитела могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов, содержащих 2-5 основных 4-цепочечных структурных единиц вместе с J-цепью. В случае IgG 4-цепочечная структурная единица обычно составляет приблизительно 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. На N-конце каждой H-цепи расположена переменная область (V_H), за которой следуют три константных домена (C_H) в случае каждой из альфа- и гамма-цепей и четыре домена C_H в случае мю- и изоформ. На N-конце каждой L-цепи расположена переменная область (V_L), за которой следует константный домен (C_L) на ее другом конце. V_L выравнивается с V_H , а C_L выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (C_{H1}). Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность контакта между переменными областями легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание V_H и V_L вместе образует единый антигенсвязывающий сайт. Структуру и свойства различных классов антител см., например, в Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, стр. 71 и глава 6.

L-цепь любого вида позвоночных животных может быть отнесена к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов (C_L). В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (C_H) иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам или изоформам. Различают пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющие тяжелые цепи, обозначенные как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Гамма- и альфа-классы дополнительно разделены на подклассы на основе относительно незначительных различий в

последовательности и функции C_H , у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термин "вариабельный" обращает внимание на тот факт, что определенные сегменты V-доменов сильно различаются по последовательности у разных антител. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность неравномерно распределена на протяжении интервала из 110 аминокислот вариабельных областей. Вместо этого V-области состоят из относительно инвариантных отрезков, называемых каркасными областями (FR), состоящих из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями крайней вариабельности, называемыми "гипервариабельными областями", длина каждой из которых составляет 9-12 аминокислот. Каждая из вариабельных областей нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в значительной степени принимающих конфигурацию бета-листа, соединенных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру бета-листа и в некоторых случаях образующие ее часть. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR и вместе с гипервариабельными областями из другой цепи приводят к образованию антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены непосредственно не участвуют в связывании антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP), антителозависимом фагоцитозе нейтрофилов (ADNP) и антителозависимом депонировании комплемента (ADCD).

Используемый в данном документе термин "гипервариабельная область" относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельная область обычно содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (например, в зоне приблизительно остатков 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в V_L , и в зоне приблизительно 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в V_H при нумерации в соответствии с системой нумерации Kabat; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); и/или такие остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в V_L и 26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3) в V_H при нумерации в соответствии с системой нумерации Chothia; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); и/или такие остатки из "гипервариабельной петли"/CDR (например, остатки 27-38 (L1), 56-65 (L2) и 105-120 (L3) в V_L и 27-38 (H1), 56-65 (H2) и 105-120 (H3) в

V_H при нумерации в соответствии с системой нумерации IMGT; Lefranc, M. P. *et al.* Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999), Ruiz, M. *et al.* Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000)). Необязательно антитело имеет симметричные вставки в одной или нескольких из следующих точек 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) и 123 (L3) в V_L и 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) и 123 (H3) в V_{subH} при нумерации в соответствии с АНo; Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001)).

"Остаток нуклеиновой кислоты зародышевой линии" означает остаток нуклеиновой кислоты, который естественным образом встречается в гене зародышевой линии, кодирующем константную или переменную область. "Ген зародышевой линии" представляет собой ДНК, обнаруженную в зародышевой клетке (т. е. клетке, которой предстоит стать яйцеклеткой или сперматозоидом). "Мутация зародышевой линии" относится к наследуемому изменению в конкретной ДНК, которое произошло в зародышевой клетке или зиготе на стадии одной клетки, и при передаче потомству такая мутация включается в каждую клетку организма. Мутация зародышевой линии отличается от соматической мутации, которая обнаруживается в отдельной клетке организма. В некоторых случаях нуклеотиды в последовательности ДНК зародышевой линии, кодирующей переменную область, подвергаются мутации (т. е. соматической мутации) и заменяются другим нуклеотидом.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов на основе поликлональных антител, которые включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты антигена. В дополнение к их специфичности, преимущество моноклональных антител состоит в том, их можно синтезировать в виде, не загрязненном другими антителами. Модификатор "моноклональное" не следует понимать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применимые в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью метода гибридомы, впервые описанного Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), или могут быть изготовлены с использованием способов рекомбинантной ДНК в бактериальных, эукариотических животных или растительных клетках (см., например, патент США 4816567) после сортировки одиночных клеток, используемой в отношении

антигенспецифической В-клетки, антигенспецифического плазмобласта, отвечающих на инфекцию или иммунизацию, или захвата связанных тяжелых и легких цепей из отдельных клеток в совокупности антигенспецифических клеток, отсортированных большой массой. "Моноклональные антитела" также могут быть, например, выделены из фаговых библиотек антител с использованием методик, описанных Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) и Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

А. Общие способы

Будет очевидно, что моноклональные антитела, связывающиеся с SARS-CoV-2, будут иметь несколько применений. К ним относится производство диагностических наборов для применения при выявлении и диагностике инфекции SARS-CoV-2, а также для ее лечения. В этих контекстах такие антитела можно связать с диагностическими или терапевтическими средствами, применять их в качестве средств захвата или конкурентов в конкурентных анализах или применять их по отдельности без присоединения к ним дополнительных средств. В антитела можно вводить мутации или модификации, как дополнительно обсуждается ниже. Способы получения и определения характеристик антител хорошо известны в данной области (см., например, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; патент США № 4196265).

Способы получения моноклональных антител (MAb) обычно начинаются так же, как и способы получения поликлональных антител. Первой стадией для обоих этих способов является иммунизация соответствующего хозяина или идентификация субъектов, обладающих иммунитетом из-за предшествующей естественной инфекции или вакцинации лицензированной или экспериментальной вакциной. Как хорошо известно в данной области, отдельно взятая композиция для иммунизации может отличаться по своей иммуногенности. Поэтому зачастую необходимо стимулировать иммунную систему хозяина, что может быть достигнуто путем связывания пептидного или полипептидного иммуногена с носителем. Иллюстративными и предпочтительными носителями являются гемоцианин лимфы улитки (KLH) и бычий сывороточный альбумин (BSA). В качестве носителей также могут быть использованы другие альбумины, такие как овальбумин, сывороточный альбумин мыши или сывороточный альбумин кролика. Средства для конъюгации полипептида с белком-носителем хорошо известны в данной области и включают глутаровый альдегид, сложный эфир м-малеимидобенкоил-N-гидроксисукцинимид, карбодимид и бис-биазотированный бензидин. Как также хорошо известно в данной области, иммуногенность конкретной иммуногенной композиции может быть усилена путем применения неспецифических стимуляторов иммунного ответа, известных как адъюванты. Иллюстративные и предпочтительные адъюванты для животных

включают полный адъювант Фрейнда (неспецифический стимулятор иммунного ответа, содержащий убитые *Mycobacterium tuberculosis*), неполные адъюванты Фрейнда и адъювант на основе гидроксида алюминия, а для человека включают квасцы, CpG, MFP59 и комбинации иммуностимулирующих молекул ("адъювантные системы", такие как AS01 или AS03). Для индукции В-клеток, специфичных в отношении SARS-CoV-2, возможны дополнительные экспериментальные формы инокуляции, включая вакцины на основе наночастиц или закодированные в генах антигены, доставляемые как гены в виде ДНК или РНК в физической системе доставки (такой как липидная наночастица или на золотой биолистической грануле), и доставляемые с помощью иглы, генной пушки, устройства для чрескожной электропорации. Ген антигена также можно переносить как закодированный в способном к репликации или дефектном вирусном векторе, таком как репликон на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса, поксвируса, герпесвируса или альфавируса, или в качестве альтернативы в вирусоподобной частице.

В случае человеческих антител против естественных патогенов подходящим подходом является выявление субъектов, которые подверглись воздействию патогенов, например, тех, у кого было диагностировано заражение заболеванием, или тех, кто был вакцинирован для выработки защитного иммунитета против патогена или для тестирования безопасности или эффективности экспериментальной вакцины. Могут быть обнаружены циркулирующие антитела к патогену, а затем от субъекта с положительным результатом на антитело могут быть получены В-клетки, кодирующие или продуцирующие антитело.

Количество иммуногенной композиции, применяемой для получения поликлональных антител, зависит от природы иммуногена, а также от животного, применяемого для иммунизации. Для введения иммуногена можно использовать различные пути (подкожный, внутримышечный, внутрикожный, внутривенный и внутрибрюшинный). Выработку поликлональных антител можно отслеживать путем отбора образцов крови иммунизированного животного в различные моменты после иммунизации. Также может быть проведена вторая, бустерная инъекция. Процесс бустерной иммунизации и титрования повторяют до тех пор, пока не будет достигнут подходящий титр. При получении требуемого уровня иммуногенности у иммунизированного животного можно собирать кровь, выделять и хранить сыворотку крови, и/или животное можно использовать для получения МАb.

После иммунизации соматические клетки, способные продуцировать антитела, в частности В-лимфоциты (В-клетки), отбирают для применения в протоколе получения МАb. Эти клетки могут быть получены из биоптатов селезенки, лимфатических узлов, миндалин или аденоидов, аспиратов или биопсий костного мозга, биоптатов тканей

слизистых органов, таких как легкие или желудочно-кишечный тракт, или из циркулирующей крови. Затем продуцирующие антитела В-лимфоциты от иммунизированного животного или иммунного человека сливают с клетками бессмертной клетки миеломы, как правило, того же вида, что и иммунизированное животное, или с клетками человека или химерными клетками человека/мыши. Линии клеток миеломы, подходящие для применения в процедурах слияния с получением гибридомы, предпочтительно не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью слияния и дефицитом ферментов, что делает их неспособными к росту в определенных селективных средах, которые поддерживают рост только требуемых слитых клеток (гибридом). Можно использовать любую из целого ряда клеток миеломы, известных специалистам в данной области (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984). Клетки НММА2.5 или клетки MFP-2 являются особенно применимыми примерами таких клеток.

Способы создания гибридов антитело-продуцирующих клеток селезенки или лимфатических узлов и клеток миеломы обычно включают смешивание соматических клеток с клетками миеломы в соотношении 2:1, хотя соотношение может варьироваться от приблизительно 20:1 до приблизительно 1:1 соответственно, в присутствии средства или средств (химических или электрических), которые способствуют слиянию клеточных мембран. В некоторых случаях трансформация В-клеток человека вирусом Эпштейна-Барр (EBV) в качестве начальной стадии увеличивает размер В-клеток, что усиливает слияние с относительно крупными клетками миеломы. Эффективность трансформации с помощью EBV повышается за счет использования CpG и лекарственного средства-ингибитора Chk2 в среде для трансформации. В качестве альтернативы В-клетки человека можно активировать путем совместного культивирования с линиями трансфицированных клеток, экспрессирующими лиганд CD40 (CD154), в среде, содержащей дополнительные растворимые факторы, такие как IL-21 и фактор активации В-клеток человека (BAFF), представитель типа II суперсемейства TNF. Способы слияния с использованием вируса Сендай были описаны Kohler и Milstein (1975; 1976), а способы с использованием полиэтиленгликоля (PEG), такого как 37% (об./об.) PEG, в Geftter *et al.* (1977). Также целесообразно использование способов электроиндуцированного слияния (Goding, стр. 71-74, 1986), и существуют способы повышения эффективности (Yu *et al.*, 2008). Процедуры слияния обычно дают жизнеспособные гибриды с низкой частотой, от приблизительно 1×10^{-6} до 1×10^{-8} , но при оптимизированных процедурах можно достичь эффективности слияния, близкой к 1 из 200 (Yu *et al.*, 2008). Тем не менее, относительно низкая эффективность слияния не представляет проблемы, поскольку жизнеспособные слитые гибриды отделяют от родительских неслитых клеток (в частности, неслитых клеток

миеломы, которые в норме будут продолжать делиться бесконечно) путем культивирования в селективной среде. Селективная среда обычно представляет собой среду, содержащую средство, которое блокирует *de novo* синтез нуклеотидов в среде для культуры ткани. Иллюстративными и предпочтительными средствами являются аминоптерин, метотрексат и азасерин. Аминоптерин и метотрексат блокируют *de novo* синтез как пуринов, так и пиримидинов, тогда как азасерин блокирует только синтез пуринов. При использовании аминоптерина или метотрексата среду дополняют гипоксантином и тимидином в качестве источника нуклеотидов (среда НАТ). При использовании азасерина среду дополняют гипоксантином. Если источником В-клеток является линия EBV-трансформированных В-клеток человека, добавляют убаин, чтобы устранить EBV-трансформированные линии, которые не слились с миеломой.

Предпочтительной средой для отбора является НАТ или НАТ с убаином. Только клетки, способные использовать пути "реутилизации" нуклеотидов, могут выжить в среде НАТ. Клетки миеломы являются дефектными по ключевым ферментам пути "реутилизации", например, по гипоксантинфосфорибозилтрансферазе (HPRТ), и не могут выжить. В-клетки могут использовать этот путь, но они имеют ограниченный срок жизни в культуре и обычно погибают в течение приблизительно двух недель. Таким образом, единственными клетками, которые могут выживать в селективной среде, являются гибриды, образованные из клеток миеломы и В-клеток. Если источником В-клеток, используемых для слияния, является линия EBV-трансформированных В-клеток, как в данном случае, для отбора гибридов с использованием лекарственного средства также можно использовать убаин, поскольку EBV-трансформированные В-клетки восприимчивы к лизису под действием лекарственного средства, тогда как используемого партнера, клетку миеломы, выбирают с устойчивостью к убаину.

Культивирование приводит к образованию популяции гибридом, из которых отбирают специфические гибридомы. Как правило, отбор гибридом осуществляют путем культивирования клеток при разведении до одиночных клонов в планшетах для микротитрования с последующим тестированием супернатантов отдельных клонов (через приблизительно две-три недели) в отношении требуемой реактивности. Анализ должен быть чувствительным, простым и быстрым, таким как радиоиммуноанализы, иммуноферментные анализы, анализы цитотоксичности, анализы бляшкообразования, анализ на основе дот-блоттинга и т. п. Затем отобранные гибридомы подвергают серийному разбавлению или сортировке одиночных клеток с помощью сортировки методом проточной цитометрии и клонируют в виде отдельных линий клеток, продуцирующих антитела, при этом клоны затем можно размножать до бесконечности для получения mAb. Линии клеток

можно использовать для получения МАb с помощью двух основных способов. Образец гибридомы можно ввести путем инъекции (зачастую в брюшную полость) животному (например, мыши). Необязательно перед инъекцией животных примируют с помощью углеводорода, особенно масел, таких как пристан (тетраметилпентадекан). Если таким способом используют человеческие гибридомы, оптимально делать инъекции мышам с ослабленным иммунитетом, таким как мыши SCID, для предотвращения отторжения опухоли. У животного после инъекции развиваются опухоли, секретирующие специфическое моноклональное антитело, продуцируемое гибридом из слитых клеток. Затем биологические жидкости животного, такие как сыворотка крови или асцитная жидкость, можно отбирать для получения МАb в высокой концентрации. Отдельные линии клеток также можно культивировать *in vitro*, где МАb естественным образом секретируются в культуральную среду, из которой их можно легко получить в высоких концентрациях. В качестве альтернативы линии клеток человеческих гибридом можно использовать *in vitro* для получения иммуноглобулинов в клеточном супернатанте. Линии клеток можно адаптировать для выращивания в бессывороточной среде для оптимизации возможности выделения человеческих моноклональных иммуноглобулинов высокой чистоты.

При необходимости МАb, полученные любым способом, можно дополнительно очищать с использованием фильтрации, центрифугирования и различных способов хроматографии, таких как FPLC или аффинная хроматография. Фрагменты моноклональных антител по настоящему изобретению можно получать из очищенных моноклональных антител с помощью способов, включающих расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или путем расщепления дисульфидных связей с помощью химического восстановления. В качестве альтернативы фрагменты моноклональных антител, охватываемые настоящим изобретением, можно синтезировать с использованием автоматического синтезатора пептидов.

Также предполагается, что подход на основе молекулярного клонирования можно использовать для получения моноклональных антител. Одиночные В-клетки, идентифицированные как отвечающие на инфекцию или вакцинацию по наличию маркеров плазмобластов или активированных В-клеток, или В-клетки памяти, меченные представляющим интерес антигеном, можно отсортировать физически путем отбора с помощью парамагнитных гранул или сортировки с помощью проточной цитометрии, затем можно выделить РНК из одиночных клеток и амплифицировать гены антител с помощью RT-PCR. Доступны различные способы секвенирования РНК одиночных клеток для получения генов вариабельных доменов антител из одиночных клеток. В качестве

альтернативы популяции антигенспецифических клеток, отсортированных большой массой, можно изолировать на микровезикулы, и соответствующие гены переменных доменов тяжелой и легкой цепей извлечь из одиночных клеток с использованием физического связывания ампликонов тяжелой и легкой цепей или введения общего штрих-кода для генов тяжелой и легкой цепей из везикулы. Соответствующие гены тяжелой и легкой цепей из одиночных клеток также можно получить из популяций антигенспецифических В-клеток путем обработки клеток с помощью проникающих в клетку наночастиц, несущих праймеры для RT-PCR и штрих-коды для маркировки транскриптов одним штрих-кодом на клетку. Гены переменных доменов антител также можно выделить путем экстракции РНК из линии гибридом, и гены антител получают с помощью RT-PCR и клонируют в вектор экспрессии иммуноглобулина. В качестве альтернативы из РНК, выделенной из линий клеток получают комбинаторные фагмидные библиотеки иммуноглобулинов и фагмиды, экспрессирующие соответствующие антитела, отбирают посредством пэннинга с использованием вирусных антигенов. Преимущества этого подхода над традиционными гибридными методиками заключаются в том, что за один раунд можно получить и подвергнуть скринингу примерно в 10^4 раз больше антител, а новые специфичности создаются комбинацией Н- и L-цепей, что дополнительно увеличивает вероятность обнаружения подходящих антител.

Другие патенты США, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки, в которых изложено получение антител, применимых в настоящем изобретении, включают патент США № 5565332, в котором описано получение химерных антител с использованием комбинаторного подхода; патент США № 4816567, в котором описаны препараты на основе рекомбинантных иммуноглобулинов; и патент США № 4867973, в котором описаны конъюгаты антитело-терапевтическое средство.

В. Антитела по настоящему изобретению

Антитела в соответствии с настоящим изобретением можно определить, в первую очередь, по их специфичности связывания. Специалисты в данной области путем оценки специфичности/аффинности связывания данного антитела с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области, могут определить, подпадают ли такие антитела под объем формулы настоящего изобретения. Например, эпитоп, с которым связывается данное антитело, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) аминокислот, расположенных в пределах молекулы антигена (например, линейный эпитоп в домене). В качестве альтернативы эпитоп может состоять из совокупности несмежных

аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах молекулы антигена (например, конформационный эпитоп).

Двумя основными категориями антигенов SARS-CoV-2 являются поверхностный шиповидный (S) белок и внутренние белки, в частности, белок нуклеокапсида (N). Антитела к S-белку будут применимы для профилактики, или терапии, или диагностики, или для определения характеристик вакцин. Антитела к S-белку будут характеризоваться дополнительной специфичностью связывания с таким белком, в частности антитела, связывающиеся с полноразмерным эктодоменом S-белка SARS-CoV-2 (представленным в виде мономера или олигомера, такого как тример; со стабилизирующими конформацию мутациями, такими как введение пролинов в критически важные сайты ("мутация 2P"), или без них), а также (а) антитела к S-белку, которые связываются с рецептор-связывающим доменом (RBD), (b) антитела к S-белку, которые связываются с доменами, отличными от RBD. Некоторые из подмножества, которые связываются с доменами, отличными от RBD, связываются с N-концевым доменом (NTD), в то время как другие связываются с эпитопом, отличным от NTD или RBD, и, как обнаружено дополнительно, (c) антитела к S-белку, которые могут нейтрализовать SARS-CoV-2 путем блокирования связывания S-белка SARS-CoV-2 с его рецептором, ангиотензинпревращающим ферментом 2 человека (hACE2), с другими, которые нейтрализуют, но не блокируют связывание рецептора. Наконец, антитела могут перекрестно реагировать как с S-белком SARS-CoV-2, так и с S-белком других коронавирусов, таких как SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 и/или HCoV-HKU1, а также перекрестно нейтрализовать как SARS-CoV-2, так и эти другие коронавирусы.

Другую специфичность будут иметь антитела, которые связываются с N-антителами (или другими внутренними мишенями), которые будут использоваться в первую очередь для диагностики. Например, антитела к N-белку или другим внутренним белкам SARS-CoV-2, которые позволяют специфически распознавать SARS-CoV-2 или перекрестно распознавать SARS-CoV-2 и другие коронавирусы, такие как SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 и/или HCoV-HKU1.

Различные методики, известные специалистам среднего уровня в данной области, могут применяться для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" в пределах полипептида или белка. Примеры методик включают, например, традиционные анализы перекрестного блокирования, такие как анализы, описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Перекрестное блокирование можно измерить с помощью различных анализов связывания, таких как ELISA, биослойная интерферометрия или поверхностный

плазмонный резонанс. Другие способы включают мутационный анализ с использованием аланинового сканирования, пептидный блот-анализ (Reineke, *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63, 2004), анализ расщепления пептидов, методики электронной микроскопии высокого разрешения с использованием реконструкции одиночных частиц, криоэлектронную микроскопию или томографию, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer *Prot. Sci.* 9: 487-496, 2000). Другим способом, который может быть использован для идентификации тех аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена включает мечение представляющего интерес белка дейтерием с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и обменоспособные протоны в пределах аминокислот, которые защищены комплексом на основе антитела, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород с меньшей скоростью, чем обменоспособные протоны в пределах аминокислот, которые не являются частью поверхности контакта. В результате аминокислоты, которые образуют часть поверхности контакта белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, характеризоваться относительно большей массой по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность контакта. После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, за счет чего выявляют меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring, *Analytical Biochemistry* 267: 252-259 (1999); Engen and Smith, *Anal. Chem.* 73: 256A-265A (2001). Если антитело нейтрализует SARS-CoV-2, ускользающие от антитела мутантные варианты организмов можно выделить путем размножения SARS-CoV-2 *in vitro* или в животных моделях в присутствии высоких концентраций антитела. Анализ последовательности гена SARS-CoV-2, кодирующего антиген, на который нацелено антитело, выявляет мутацию(-и), придающую(-ие) способность ускользания от антитела, указывая на остатки в эпитопе или на остатки, которые аллостерически влияют на структуру эпитопа.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, сближенными в результате третичного фолдинга белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные за счет третичного фолдинга, как правило, разрушаются при обработке денатурирующими

растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3 и чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Профилирование при содействии модификации (MAP), также известное как профилирование антител на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой способ, который классифицирует большое количество моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, в соответствии со сходством профиля связывания каждого антитела с поверхностью антигена, модифицированного химическим или ферментативным способом (см. публикацию патента США 2004/0101920, которая явным образом включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного другой категорией, либо частично перекрывается с ним. Эта технология позволяет быстро отфильтровать генетически идентичные антитела, чтобы можно было сфокусировать внимание на определении характеристик генетически различных антител. При применении в отношении скрининга гибридом MAP может облегчить идентификацию редких клонов гибридом, которые продуцируют mAb с требуемыми характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител по настоящему изобретению на группы антител, связывающих разные эпитопы.

В настоящее изобретение включены антитела, которые могут связываться с одним и тем же эпитопом или частью эпитопа. Аналогичным образом, в настоящее изобретение также включены антитела, которые конкурируют за связывание с мишенью или ее фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе. Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или конкурирует ли оно за связывание с ним, используя традиционные способы, известные в данной области. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное, эталонному антителу обеспечивают возможность связываться с мишенью в условиях насыщения. Далее оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой-мишенью. Если тестируемое антитело способно связываться с молекулой-мишенью после насыщающего связывания с эталонным антителом, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой-мишенью после насыщающего связывания с эталонным антителом, тогда тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к SARS-CoV-2, описанный выше метод связывания выполняют в двух направлениях: В

первом направлении эталонному антителу обеспечивают возможность связаться с антигеном SARS-CoV-2 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой SARS-CoV-2. Во втором направлении тестируемому антителу обеспечивают возможность связаться с молекулой антигена SARS-CoV-2 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой SARS-CoV-2. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с SARS-CoV-2, то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с SARS-CoV-2. Как будет понятно специалисту средней квалификации в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с идентичным эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела при связывании с перекрывающимся или соседним эпитопом.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже на 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). В качестве альтернативы два антитела характеризуются связыванием с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Два антитела характеризуются связыванием с перекрывающимися эпитопами, если некоторые аминокислотные мутации, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. В некоторых аспектах антитело или фрагмент антитела, которые связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и COV2-2196, используют в комбинации с антителом или фрагментом антитела, которые связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и COV2-2130.

Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, мутации пептида и анализы связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела является следствием связывания с тем же эпитопом, что и для эталонного антитела, или за отсутствие наблюдаемого связывания ответственна стерическая блокировка (или другое явление). Эксперименты такого рода можно проводить с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области. Структурные исследования с помощью

электронной микроскопии или кристаллографии также могут продемонстрировать, распознают ли два антитела, конкурирующие за связывание, один и тот же эпитоп.

В другом аспекте предусмотрены моноклональные антитела, имеющие клонально-спаренные CDR из тяжелой и легкой цепей, проиллюстрированные в таблицах 3 и 4 соответственно. Такие антитела могут быть получены при помощи клонов, обсуждаемыми ниже в разделе "Примеры", с использованием описанных в данном документе способов.

В другом аспекте антитела могут определяться по их последовательности переменного домена, которая включает дополнительные "каркасные" области. Кроме того, последовательности антител могут отличаться от этих последовательностей, необязательно с использованием способов, более подробно обсуждаемых ниже. Например, последовательности нуклеиновых кислот могут отличаться от указанных выше тем, что (а) переменные области могут быть отделены от константных доменов легкой и тяжелой цепей, (b) нуклеиновые кислоты могут отличаться от нуклеиновых кислот, указанных выше, но не изменять кодируемые ими остатки, (с) нуклеиновые кислоты могут отличаться от нуклеиновых кислот, указанных выше, на определенный процент, например, характеризоваться 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологией, (d) нуклеиновые кислоты могут отличаться от нуклеиновых кислот, указанных выше, при способности гибридизоваться в условиях высокой жесткости, например, в условиях с низким содержанием солей и/или в условиях высокой температуры, таких как обеспечиваемые с помощью от приблизительно 0,02 М до приблизительно 0,15 М NaCl при температурах от приблизительно 50°C до приблизительно 70°C, (е) аминокислоты могут отличаться от аминокислот, указанных выше, на определенный процент, например, характеризоваться 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологией, или (f) аминокислоты могут отличаться от аминокислот, указанных выше, за счет разрешения консервативных замен (обсуждаемых ниже). Каждое из вышеизложенного относится к последовательностям нуклеиновых кислот и аминокислотным последовательностям.

При сравнении полинуклеотидных и полипептидных последовательностей две последовательности считаются "идентичными", если последовательность нуклеотидов или аминокислот в двух последовательностях является одинаковой при выравнивании для максимального соответствия, как описано ниже. Сравнения между двумя последовательностями, как правило, выполняют путем сравнения последовательностей в окне сравнения, чтобы идентифицировать и сравнить локальные области сходства последовательностей. Используемый в данном документе термин "окно сравнения" относится к сегменту, состоящему из по меньшей мере приблизительно 20 смежных

положений, обычно от 30 до приблизительно 75, от 40 до приблизительно 50, в котором последовательность может сравниваться с эталонной последовательностью с таким же числом смежных положений после того, как две последовательности оптимально выровнены.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может проводиться с использованием программы Megalign в составе программного обеспечения для биоинформатики Lasergene (DNASTAR, Inc., Мэдисон, Висконсин, США) с использованием параметров по умолчанию. Эта программа реализует несколько схем выравнивания, описанных в следующих источниках: Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins--Matrices for detecting distant relationships. В Dayhoff M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C., Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogeny, pp. 626-645, Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Higgins D. G. and Sharp P. M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers E. W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou N., Nes M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath P. H. A. and Sokal R. R. (1973) Numerical Taxonomy--the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, Calif.; Wilbur W. J. and Lipman D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

В качестве альтернативы оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может проводиться с помощью алгоритма локальной идентичности по Smith и Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482, алгоритма выравнивания идентичности по Needleman и Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, с помощью способов поиска сходства по Pearson и Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин) или путем визуального осмотра.

Одним конкретным примером алгоритмов, подходящих для определения процентной идентичности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul *et al.* (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 и Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 соответственно. BLAST и BLAST 2.0 можно использовать, например, с параметрами, описанными в данном документе, для определения процентной идентичности последовательностей полинуклеотидов и полипептидов по настоящему изобретению. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации. Реаранжированная природа последовательности антитела и переменная длина каждого гена требуют нескольких

раундов поиска BLAST для одной последовательности антитела. Кроме того, ручная сборка различных генов является сложной и подвержена ошибкам. Инструмент анализа последовательности IgBLAST (адрес во всемирной сети ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) идентифицирует совпадения с генами V, D и J зародышевой линии, детали в местах соединения при реаранжировке, очертание каркасных областей и определяющих комплементарность областей V-домена Ig. IgBLAST может анализировать нуклеотидные или белковые последовательности и может обрабатывать последовательности партиями, а также позволяет выполнять поиски в базах данных генов зародышевой линии и других базах данных последовательностей одновременно, чтобы свести к минимуму вероятность пропуска, возможно, наиболее подходящего V-гена зародышевой линии.

В одном иллюстративном примере совокупные баллы можно рассчитать с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров M (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). Продление слов-совпадений в каждом направлении останавливается, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от максимально достигнутого значения; совокупный балл становится равным нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательным баллом; или достигнут конец любой из последовательностей. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует при выравниваниях по умолчанию длину слова (W) 11 и ожидание (E) 10, а также матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих нитей.

Для аминокислотных последовательностей можно использовать матрицу замен для расчета совокупного балла. Продление слов-совпадений в каждом направлении останавливается, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от максимально достигнутого значения; совокупный балл становится равным нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательным баллом; или достигнут конец любой из последовательностей. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания.

В одном подходе "процент идентичности последовательности" определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей на протяжении окна сравнения, состоящем из по меньшей мере 20 положений, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы), составляющие 20 процентов или менее, обычно от 5 до 15 процентов или от 10 до 12 процентов, по сравнению с эталонными последовательностями (которые не

содержат добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают путем определения числа положений, в которых идентичные основания нуклеиновой кислоты или аминокислотные остатки встречаются в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее количество положений в эталонной последовательности (т. е. размер окна) и умножения результаты на 100 с получением процента идентичности последовательности.

Еще одним способом определения антитела является его определение как "производного" любого из описанных ниже антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Термин "производное" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые иммуноспецифически связываются с антигеном, но которые содержат одну, две, три, четыре, пять или более аминокислотных замен, добавлений, делеций или модификаций по сравнению с "исходной" молекулой (или молекулой дикого типа). Такие аминокислотные замены или добавления могут вводить встречающиеся в природе (т. е. кодируемые с помощью ДНК) или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки. Термин "производное" охватывает, например, как варианты с измененными областями СН1, шарнирной, СН2, СН3 или СН4, так и образующие, например, антитела и т. д., имеющие вариантные Fc-области, которые проявляют усиленные или ослабленные эффекторные характеристики или характеристики связывания. Термин "производное" дополнительно охватывает отличные от аминокислот модификации, например, аминокислоты, которые могут быть гликозилированы (например, характеризуются измененным содержанием маннозы, 2-N-ацетилглюкозамина, галактозы, фукозы, глюкозы, сиаловой кислоты, 5-N-ацетилнейраминовой кислоты, 5-глицольнейраминовой кислоты и т. д.), ацетилированы, пегилированы, фосфорилированы, амидированы, дериватизированы известными защитными/блокирующими группами, подвергнуты протеолитическому расщеплению, связаны с клеточным лигандом или другим белком и т. д. В некоторых вариантах осуществления модификации на основе измененных углеводов модулируют одно или несколько из следующего: солубилизацию антитела, облегчение внутриклеточного транспорта и секреции антитела, стимуляцию сборки антитела, конформационную целостность и антителоопосредованную эффекторную функцию. В конкретном варианте осуществления модификации на основе измененных углеводов усиливают антителоопосредованную эффекторную функцию по сравнению с антителом, не содержащим углеводной модификации. Модификации углеводов, которые приводят к изменению антителоопосредованной эффекторной функции, хорошо известны в данной области (например, см. Shields R. L. *et al.* (2002) "*Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked*

Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcγ₃ RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity," J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740; Davies J. *et al.* (2001) "Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For FC Gamma RIII," Biotechnology & Bioengineering 74(4): 288-294). Способы изменения содержания углеводов известны специалистам в данной области, см., например, Wallick S. C. *et al.* (1988) "Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha (1----6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen", J. Exp. Med. 168(3): 1099-1109; Tao M. H. *et al.* (1989) "Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role of Carbohydrate in The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region", J. Immunol. 143(8): 2595-2601; Routledge E. G. *et al.* (1995) "The Effect of Aglycosylation on The Immunogenicity of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody", Transplantation 60(8):847-53; Elliott S. *et al.* (2003) "Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering", Nature Biotechnol. 21:414-21; Shields R. L. *et al.* (2002) "Lack of Fucose on Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fcγ₃ RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity", J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740).

Производное антитело или фрагмент антитела могут быть получены с помощью сконструированной структуры последовательности или гликозилирования для обеспечения предпочтительных уровней активности в отношении функций антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), антителозависимого фагоцитоза нейтрофилов (ADNP) или антителозависимого депонирования комплемента (ADCD), измеряемых в анализах с гранулами или клеточных анализах или в исследованиях *in vivo* на животных моделях.

Производное антитело или фрагмент антитела могут быть модифицированы с помощью химических модификаций с использованием методов, известных специалистам в данной области, включая без ограничения специфическое химическое расщепление, ацетилирование, составление, метаболический синтез туникамицина и т. д. В одном варианте осуществления производное антитела будет обладать сходной или идентичной функцией, что и родительское антитело. В другом варианте осуществления производное антитело будет проявлять измененную активность по сравнению с родительским антителом. Например, производное антитело (или его фрагмент) может связываться со своим эпитопом более плотно или быть более устойчивым к протеолизу, чем родительское антитело.

С. Конструирование последовательностей антитела

В различных вариантах осуществления можно выбирать конструирование последовательностей идентифицированных антител по целому ряду причин, таких как улучшение экспрессии, улучшение перекрестной реактивности или уменьшение нецелевого связывания. Модифицированные антитела можно получать с помощью любой методики, известной специалистам в данной области, включая экспрессию посредством стандартных методик молекулярной биологии или химический синтез полипептидов. Способы рекомбинантной экспрессии рассматриваются в другом месте этого документа. Ниже приводится общее обсуждение соответствующих целей для методик конструирования антител.

Гибридомы можно культивировать, затем лизировать клетки и экстрагировать общую РНК. Случайные гексамеры можно использовать при РТ для создания кДНК-копий РНК, а затем проводить ПЦР с использованием мультиплексной смеси праймеров для ПЦР, которые, как ожидается, амплифицируют все последовательности генов варибельных доменов человека. ПЦР-продукт можно клонировать в вектор pGEM-T Easy, затем секвенировать с помощью автоматического секвенирования ДНК с использованием стандартных для вектора праймеров. Анализ связывания и нейтрализации можно проводить с использованием антител, собранных из супернатантов гибридомы и очищенных с помощью FPLC с использованием колонок с белком G.

Рекомбинантные полноразмерные антитела-IgG можно получить путем субклонирования ДНК Fv тяжелой и легкой цепей из клонирующего вектора в плазмидный вектор с IgG, трансфицированный в клетки 293 (например, Freestyle) или клетки CHO, и антитела можно собрать и очистить из супернатанта клеток 293 или CHO. Другие подходящие системы клеток-хозяев включают бактерий, таких как *E. coli*, клетки насекомых (S2, Sf9, Sf29, High Five), растительные клетки (например, табака, с конструированием для обеспечения подобных человеческим гликанов или без него), водоросли или различные отличные от человека трансгенные окружения, такие как мыши, крысы, козы или коровы.

Также предполагается экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, как с целью последующей очистки антител, так и для иммунизации хозяина. Последовательности, кодирующие антитело, могут представлять собой РНК, такую как нативная РНК или модифицированная РНК. Модифицированная РНК предполагает определенные химические модификации, которые придают мРНК повышенную стабильность и низкую иммуногенность, тем самым облегчая экспрессию терапевтически важных белков. Например, N1-метил-псевдоуридин (N1mΨ) превосходит несколько других модификаций нуклеозидов и их комбинации с точки зрения способности к трансляции.

Помимо отключения иммунного/зависимого от фосфорилирования eIF2 α ингибирования трансляции, встроенные нуклеотиды N1m Ψ резко изменяют динамику процесса трансляции за счет увеличения паузы рибосом и плотности на мРНК. Повышенная загрузка модифицированных мРНК на рибосомы приводит к их большей перmissивности для инициации, благоприятствуя либо рециркуляции рибосом на той же мРНК, либо рекрутированию рибосом *de novo*. Такие модификации можно будет использовать для усиления экспрессии антител *in vivo* после инокуляции РНК. РНК, нативная или модифицированная, может доставляться в виде "голой" РНК или в среде-носителе для доставки, такой как липидная наночастица.

В качестве альтернативы для тех же целей можно использовать ДНК, кодирующую антитело. ДНК включают в кассету экспрессии, содержащую промотор, активный в клетке-хозяине, для которой она предназначена. Кассету экспрессии преимущественно включают в реплицируемый вектор, такой как обычная плазида или минивектор. Векторы включают вирусные векторы, при этом предусмотрены векторы на основе поксвирусов, аденовирусов, герпесвирусов, аденоассоциированных вирусов и лентивирусов. Также предусмотрены репликоны, кодирующие гены антител, такие как альфавирусные репликоны на основе вируса VEE или вируса Синдбис. Доставка таких векторов может осуществляться с помощью иглы посредством внутримышечного, подкожного или внутрикожного путей, или путем чрескожной электропорации, если требуется экспрессия *in vivo*.

Быстрая доступность антитела, полученного в такой же клетке-хозяине и процессе культивирования клеток, что и конечный процесс производства согласно cGMP, может сократить продолжительность программ разработки технологического процесса. Компания Lonza разработала универсальный способ с использованием объединенных трансфектантов, выращенных в среде CDACF, для быстрого получения малых количеств (до 50 г) антител в клетках CHO. Хотя это немного медленнее, чем настоящая система с временной экспрессией, преимущества включают более высокую концентрацию продукта и применение того же хозяина и процесса, что и для производственной линии клеток. Пример роста и продуктивности пулов GS-CHO, экспрессирующих модельное антитело, в одноразовом биореакторе: при культивировании в биореакторе в виде одноразового мешка (рабочий объем 5 л), проводимом в режиме периодического культивирования с подпиткой, концентрация собранного антитела, составляющая 2 г/л, достигалась в течение 9 недель после трансфекции.

Молекулы антител будут предусматривать фрагменты (такие как F(ab'), F(ab')₂), которые образуются, например, при протеолитическом расщеплении mAb, или одноцепочечные иммуноглобулины, продуцируемые, например, рекомбинантными способами.

Производные F(ab')-антитела являются моновалентными, тогда как производные F(ab')₂-антитела являются бивалентными. В одном варианте осуществления такие фрагменты можно комбинировать друг с другом или с другими фрагментами антител или лигандами рецепторов с образованием "химерных" связывающих молекул. Важно отметить, что такие химерные молекулы могут содержать заместители, способные связываться с разными эпитопами одной и той же молекулы.

В родственных вариантах осуществления антитело представляет собой производное раскрытых антител, например, антитело, содержащее последовательности CDR, идентичные последовательностям у раскрытых антител (например, химерное антитело или антитело с привитыми CDR). В качестве альтернативы могут потребоваться модификации, такие как введение консервативных изменений в молекулу антитела. При осуществлении таких изменений можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Важность гидропатического индекса аминокислот в обеспечении биологической функции взаимодействия белка общеизвестна в данной области (Kyte and Doolittle, 1982). Принято считать, что относительное гидропатическое свойство аминокислоты вносит вклад в формирование вторичной структуры образующегося белка, что, в свою очередь, определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например, ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т. п.

В данной области также понятно, что замена подобных аминокислот может быть эффективно осуществлена на основе гидрофильности. В патенте США № 4554101, включенном в данный документ посредством ссылки, утверждается, что наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью соседних аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка. Как подробно описано в патенте США № 4554101, аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: основные аминокислоты: аргинин (+3,0), лизин (+3,0) и гистидин (-0,5); кислотные аминокислоты: аспартат (+3,0 ± 1), глутамат (+3,0 ± 1), аспарагин (+0,2) и глутамин (+0,2); гидрофильные, неионогенные аминокислоты: серин (+0,3), аспарагин (+0,2), глутамин (+0,2) и треонин (-0,4), серосодержащие аминокислоты: цистеин (-1,0) и метионин (-1,3); гидрофобные, неароматические аминокислоты: валин (-1,5), лейцин (-1,8), изолейцин (-1,8), пролин (-0,5 ± 1), аланин (-0,5) и глицин (0); гидрофобные, ароматические аминокислоты: триптофан (-3,4), фенилаланин (-2,5) и тирозин (-2,3).

Понятно, что одна аминокислота может быть заменена другой, характеризующейся аналогичной гидрофильностью, и давать биологически или иммунологически модифицированный белок. При таких изменениях предпочтительной является замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ±2, особенно

предпочтительными являются те, которые находятся в пределах ± 1 , и еще более предпочтительными являются те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$.

Как отмечено выше, аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей боковой цепи аминокислоты, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т. п. Примеры замен, при которых учитываются различные вышеуказанные характеристики, хорошо известны специалистам в данной области и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; а также валин, лейцин и изолейцин.

В настоящем изобретении также предусмотрена модификацию изотипа. Путем модификации Fc-области с получением другого изотипа можно достичь отличающихся функциональных возможностей. Например, изменение на IgG₁ может повысить антителозависимую клеточную цитотоксичность, переключение на класс A может улучшить распределение в тканях, а переключение на класс M может повысить валентность.

В качестве альтернативы или дополнительно может быть полезно комбинировать аминокислотные модификации с одной или несколькими дополнительными аминокислотными модификациями, которые изменяют связывание C1q и/или функцию комплементзависимой цитотоксичности (CDC) Fc-области IL-23p19-связывающей молекулы. Связывающий полипептид, представляющий особый интерес, может быть полипептидом, который связывается с C1q и проявляет комплементзависимую цитотоксичность. Полипептиды с ранее существовавшей активностью связывания C1q, необязательно дополнительно характеризующиеся способностью опосредовать CDC, можно модифицировать таким образом, что одна или обе эти активности усиливаются. Аминокислотные модификации, которые изменяют C1q и/или модифицируют его комплементзависимую цитотоксичность, описаны, например, в WO/0042072, которая настоящим включена посредством ссылки.

Можно сконструировать Fc-область антитела с измененной эффекторной функцией, например, путем модификации связывания C1q и/или связывания FcγR и, таким образом, изменения активности CDC и/или активности ADCC. "Эффекторные функции" отвечают за активацию или снижение биологической активности (например, у субъекта). Примеры эффекторных функций включают без ограничения: связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; ингибирование рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR) и т. д. Такие эффекторные функции могут потребовать объединения Fc-области со связывающим

доменом (например, варибельным доменом антитела) и могут быть оценены с использованием различных анализов (например, анализов связывания Fc, анализов ADCC, анализов CDC и т. д.).

Например, можно создать вариантную Fc-область антитела с улучшенным связыванием C1q и улучшенным связыванием FcγRIII (например, характеризующуюся как повышенной активностью ADCC, так и повышенной активностью CDC). В качестве альтернативы, если желательно, чтобы эффекторная функция была снижена или удалена, можно сконструировать вариантную Fc-область со сниженной активностью CDC и/или сниженной активностью ADCC. В других вариантах осуществления может быть повышена только одна из этих активностей и, необязательно, также может быть снижена другая активность (например, для получения варианта Fc-области с улучшенной активностью ADCC, но сниженной активностью CDC, и наоборот).

Связывание FcRn. Мутации Fc также можно вводить и конструировать для изменения ее взаимодействия с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) и улучшения ее фармакокинетических свойств. Была описана коллекция вариантов Fc человека с улучшенным связыванием с FcRn (Shields *et al.*, (2001). Картирование с высоким разрешением сайта связывания на IgG1 человека для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn и дизайн вариантов IgG1 с улучшенным связыванием с FcγR (J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Известен целый ряд способов, которые могут привести к увеличению периода полужизни (Kuo and Aveson, (2011)), в том числе аминокислотные модификации, которые можно получить с помощью методик, включающих аланин-сканирующий мутагенез, случайный мутагенез и скрининг для оценки связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) и/или поведение *in vivo*. Вычислительные стратегии с последующим мутагенезом также можно использовать для выбора одной из аминокислотных мутаций для проведения мутации.

Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрен вариант антигенсвязывающего белка с оптимизированным связыванием с FcRn. В конкретном варианте осуществления указанный вариант антигенсвязывающего белка содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в Fc-области указанного антигенсвязывающего белка, где указанная модификация выбрана из группы, состоящей из 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 и 447 Fc-области по сравнению с указанным

родительским полипептидом, где нумерация аминокислот в Fc-области соответствует индексу EU согласно Kabat. В дополнительном аспекте настоящего изобретения модификации представляют собой M252Y/S254T/T256E.

Кроме того, в различных публикациях описаны способы получения физиологически активных молекул, период полужизни которых модифицирован, см., например, Kontermann (2009), либо путем введения в молекулы FcRn-связывающего полипептида, либо путем слияния молекул с антителами, аффинность связывания FcRn которых сохранена, но аффинность к другим Fc-рецепторам значительно снижена, или путем слияния с FcRn-связывающими доменами антител.

Дериватизированные антитела можно использовать для изменения периода полужизни (например, периода полужизни в сыворотке крови) родительских антител у млекопитающего, в частности у человека. Такие изменения могут привести к увеличению периода полужизни до более 15 дней, предпочтительно более 20 дней, более 25 дней, более 30 дней, более 35 дней, более 40 дней, более 45 дней, более 2 месяцев, более 3 месяцев, более 4 месяцев или более 5 месяцев. Увеличенный период полужизни антител по настоящему изобретению или их фрагментов у млекопитающего, предпочтительно у человека, приводит к более высокому титру указанных антител или фрагментов антител в сыворотке крови млекопитающего и, таким образом, снижает частоту введения указанных антител или фрагментов антител и/или снижает концентрацию указанных антител или фрагментов антител, подлежащую введению. Антитела или их фрагменты, характеризующиеся увеличенным периодом полужизни *in vivo*, могут быть получены с помощью методик, известных специалистам в данной области. Например, антитела или их фрагменты с увеличенным периодом полужизни *in vivo* можно получить путем модификации (например, замены, делеции или добавления) аминокислотных остатков, идентифицированных как участвующие во взаимодействии между Fc-доменом и FcRn-рецептором.

Beltramello *et al.* (2010) ранее сообщали о модификации нейтрализующих mAb вследствие их тенденции к усилению заражения вирусом денге, путем образования антител, у которых остатки лейцина в положениях 1.3 и 1.2 домена CH2 (согласно уникальной нумерации IMGT для C-домена) заменили на остатки аланина. Эта модификация, также известная как мутация "LALA", отменяет связывание антител с FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa, как описано Hessell *et al.* (2007). Вариантные и немодифицированные рекомбинантные mAb сравнивали по их способности нейтрализовать и усиливать заражение четырьмя серотипами вируса денге. Варианты LALA сохраняли ту же нейтрализующую активность, что и немодифицированные mAb, но были полностью лишены усиливающей активности.

Таким образом, мутации LALA такой природы предусмотрены в контексте антител, раскрытых в данном документе.

Измененное гликозилирование. Конкретный вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие по существу гомогенный гликан без сиаловой кислоты, галактозы или фукозы. Моноклональное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, обе из которых могут быть присоединены к константным областям тяжелой цепи или легкой цепи соответственно. Вышеупомянутый по существу гомогенный гликан может быть ковалентно присоединен к константной области тяжелой цепи.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения включает mAb с новым паттерном гликозилирования Fc. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в виде по существу гомогенной композиции, представленной гликоформой GNGN или G1/G2. Гликозилирование Fc играет важную роль в противовирусных и противораковых свойствах терапевтических mAb. Настоящее изобретение согласуется с недавним исследованием, которое показывает повышенное клеточно-опосредованное вирусное ингибирование, направленное против лентивирусов, у не содержащего фукозы mAb к ВИЧ *in vitro*. Этот вариант осуществления настоящего изобретения с гомогенными гликанами без коровой фукозы продемонстрировал более чем в два раза повышенную защиту от конкретных вирусов. Устранение коровой фукозы резко улучшает активность ADCC у mAb, опосредованную естественными клетками-киллерами (NK), но, по-видимому, оказывает противоположный эффект на активность ADCC у полиморфноядерных клеток (PMN).

Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие по существу гомогенную композицию, представленную гликоформой GNGN или G1/G2, проявляют повышенную аффинность связывания с Fc-гамма-RI и Fc-гамма-RIII по сравнению с тем же антителом, у которого отсутствует по существу гомогенная гликоформа GNGN и присутствуют гликоформы, содержащие G0, G1F, G2F, GNF, GNGNF или GNGNFX. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело диссоциирует от Fc-гамма-RI при Kd, составляющей 1×10^{-8} М или меньше, и от Fc-гамма-RIII при Kd, составляющей 1×10^{-7} М или меньше.

Гликозилирование Fc-области, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к

гидроксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин. Последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к пептидным последовательностям с боковой цепью аспарагина представляют собой аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина. Таким образом, присутствие любой из этих пептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования.

Паттерн гликозилирования можно изменить, например, путем делеции одного или нескольких сайтов гликозилирования, обнаруженных в полипептиде, и/или добавления одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые не присутствуют в полипептиде. Добавление сайтов гликозилирования к Fc-области антитела удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Иллюстративный вариант гликозилирования имеет аминокислотную замену остатка Asn 297 тяжелой цепи. Изменение также можно осуществлять путем добавления одного или нескольких остатков серина или треонина или замены на них в последовательности исходного полипептида (для сайтов O-связанного гликозилирования). Кроме того, изменение Asn 297 на Ala может удалить один из сайтов гликозилирования.

В определенных вариантах осуществления антитело экспрессируется в клетках, которые экспрессируют бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT III), так что GnT III добавляет GlcNAc к антителу IL-23p19. Способы получения антител таким образом представлены в WO/9954342, WO/03011878, патентной публикации 20030003097A1 и в Umana *et al.*, Nature Biotechnology, 17:176-180, February 1999. Линии клеток можно изменить для усиления, или уменьшения, или устранения определенных посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, с использованием технологии редактирования генома, такой как кластерные короткие палиндромные повторы с регулярными интервалами (CRISPR). Например, технологию CRISPR можно использовать для устранения генов, кодирующих ферменты гликозилирования в клетках 293 или CHO, используемых для экспрессии рекомбинантных моноклональных антител.

Устранение недостатков в белковой последовательности моноклонального антитела. Возможно конструировать последовательности генов переменных доменов антитела, полученные из В-клеток человека, для повышения их технологичности и безопасности. Потенциальные недостатки в белковой последовательности можно

идентифицировать путем поиска мотивов последовательности, ассоциированных с сайтами, содержащими:

- 1) неспаренные остатки Cys,
- 2) N-связанное гликозилирование,
- 3) дезамидирование Asn,
- 4) изомеризацию Asp,
- 5) усечение SYE,
- 6) окисление Met,
- 7) окисление Trp,
- 8) N-концевой глутамат,
- 9) связывание интегрина,
- 10) связывание CD11c/CD18 или
- 11) фрагментацию.

Такие мотивы можно устранить путем изменения синтетического гена для кДНК, кодирующей рекомбинантные антитела.

Усилия по конструированию белков в области разработки терапевтических антител ясно показывают, что определенные последовательности или остатки ассоциированы с различиями в растворимости (Fernandez-Escamilla *et al.*, *Nature Biotech.*, 22 (10), 1302-1306, 2004; Chennamsetty *et al.*, *PNAS*, 106 (29), 11937-11942, 2009; Voynov *et al.*, *Biocon. Chem.*, 21 (2), 385-392, 2010). Имеющиеся в литературе данные о мутациях, изменяющих растворимость, указывают на то, что некоторые гидрофильные остатки, такие как аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и серин, значительно более благоприятно влияют на растворимость белка, чем другие гидрофильные остатки, такие как аспарагин, глутамин, треонин, лизин и аргинин.

Стабильность. Антитела могут быть сконструированы для улучшения биофизических свойств. Можно использовать повышенную температуру для разворачивания антител, чтобы определить относительную стабильность, используя средние кажущиеся температуры плавления. При дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) измеряют теплоемкость C_p молекулы (количество тепла, необходимое для ее нагревания на градус) в зависимости от температуры. Можно использовать DSC для изучения термостабильности антител. Данные DSC для mAb особенно интересны, поскольку они иногда позволяют анализировать разворачивание отдельных доменов в пределах структуры mAb, создавая до трех пиков на термограмме (из-за разворачивания доменов Fab, C_H2 и C_H3). Обычно разворачивание домена Fab дает самый сильный пик. Профили DSC и относительная стабильность Fc-части демонстрируют характерные различия подклассов

IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄ человека (Garber and Demarest, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 751-757, 2007). Также можно определить среднюю кажущуюся температуру плавления с использованием метода кругового дихроизма (CD), выполняемого с помощью CD-спектрометра. Для антител CD-спектры в дальнем УФ-диапазоне будут измеряться в диапазоне от 200 до 260 нм с шагом 0,5 нм. Окончательные спектры можно определить как средние значения из 20 сборов. Значения остаточной эллиптичности можно рассчитать после вычитания фона. Термическое разворачивание антител (0,1 мг/мл) можно отслеживать при 235 нм в диапазоне 25-95°C и скорости нагревания 1°C/мин. Для оценки склонности к агрегации можно использовать динамическое рассеяние света (DLS). DLS используется для характеристики размера различных частиц, включая белки. Если система не является дисперсной по размеру, можно определить средний эффективный диаметр частиц. Это измерение зависит от размера ядра частицы, размера поверхностных структур и концентрации частиц. Поскольку DLS по существу измеряет колебания интенсивности рассеянного света, вызванные частицами, можно определить коэффициент диффузии частиц. Программное обеспечение для DLS в коммерческих приборах DLA показывает популяцию частиц при разных диаметрах. Исследования стабильности удобно проводить с использованием DLS. Измерения DLS образца могут показать, агрегируют ли частицы с течением времени или с изменением температуры путем определения того, увеличивается ли гидродинамический радиус частицы. Если частицы агрегируют, можно увидеть большую популяцию частиц с большим радиусом. Стабильность в зависимости от температуры можно проанализировать, контролируя температуру *in situ*. Методики капиллярного электрофореза (CE) включают апробированные методы для определения особенностей стабильности антитела. Можно использовать подход iCE для анализа вариантов заряда белка антитела, обусловленных дезамидированием, добавлением C-концевых лизинов, сиаилированием, окислением, гликозилированием и любыми другими изменениями в белке, которые могут привести к изменению pI белка. Каждый из экспрессированных белков антитела можно оценить с помощью высокопроизводительного изоэлектрического фокусирования в свободном растворе (IEF) в капиллярной колонке (cIEF) с использованием прибора Protein Simple Maurice. Обнаружение УФ-поглощения во всей колонке может выполняться каждые 30 секунд для мониторинга в реальном времени молекул, фокусирующихся в изоэлектрических точках (pI). Этот подход сочетает в себе высокое разрешение традиционного геля-IEF с преимуществами количественного анализа и автоматизации, характерными для колоночного разделения, при этом устраняя необходимость в стадии мобилизации. Эта методика обеспечивает воспроизводимый количественный анализ профилей идентичности, чистоты и гетерогенности для

экспрессированных антител. Результаты определяют неоднородность заряда и определение молекулярного размера антител в режимах обнаружения как по поглощению, так и по нативной флуоресценции, а также при чувствительности обнаружения до 0,7 мкг/мл.

Растворимость. Можно определить показатель собственной растворимости последовательностей антитела. Показатели собственной растворимости можно рассчитать с помощью CamSol Intrinsic (Sormanni *et al.*, *J Mol Biol* 427, 478-490, 2015). Аминокислотные последовательности для остатков 95-102 (нумерация согласно Kabat) в HCDR3 каждого фрагмента антитела, такого как scFv, можно оценить с помощью онлайн-программы для расчета показателей растворимости. Растворимость также можно определить с помощью лабораторных методик. Существуют различные методики, включая добавление лиофилизированного белка к раствору до тех пор, пока раствор не станет насыщенным и не будет достигнут предел растворимости, или концентрирование путем ультрафильтрации в микроконцентраторе с подходящим отсечением по молекулярной массе. Наиболее простым методом является индукция аморфного осаждения, при которой растворимость белка измеряют с использованием способа, включающего осаждение белка с использованием сульфата аммония (Trevino *et al.*, *J Mol Biol*, 366: 449-460, 2007). Осаждение сульфатом аммония дает быструю и точную информацию о значениях относительной растворимости. При осаждении сульфатом аммония получают растворы с осадком, содержащие четко определенные водную и твердую фазы, и требуются относительно небольшие количества белка. Измерения растворимости, выполняемые с использованием индукции аморфного осаждения сульфатом аммония, также можно легко провести при различных значениях pH. Растворимость белка сильно зависит от pH, и pH считается наиболее важным внешним фактором, влияющим на растворимость.

Аутореактивность. Обычно считается, что аутореактивные клоны должны элиминироваться в онтогенезе путем отрицательного отбора, однако стало ясно, что многие встречающиеся в природе человеческие антитела с аутореактивными свойствами сохраняются во взрослых зрелых репертуарах, и аутореактивность может усиливать противовирусную функцию многих антител в отношении патогенов. Было отмечено, что петли HCDR3 в антителах во время раннего развития В-клеток часто обогащены положительным зарядом и проявляют паттерны аутореактивности (Wardemann *et al.*, *Science* 301, 1374-1377, 2003). Можно протестировать данное антитело на аутореактивность путем оценки уровня связывания с клетками человеческого происхождения с помощью микроскопии (с использованием прикрепленных эпителиальных клеток HeLa или HEp-2) и окрашивании клеточной поверхности методом проточной цитометрии (с использованием суспензии Т-клеток Jurkat и эмбриональных клеток почки человека 293S).

Аутореактивность также можно исследовать с использованием оценки связывания с тканями в тканевых монослоях.

Предпочтительные остатки ("сходство с человеком"). Глубокое секвенирование репертуара В-клеток в отношении В-клеток человека от доноров крови проводится в широком масштабе во многих недавних исследованиях. Информация о последовательностях значительной части репертуара человеческих антител облегчает статистическую оценку особенностей последовательностей антител, свойственных здоровым людям. Имея сведения об особенностях последовательности антител в базе данных эталонных генов переменных доменов рекомбинированных человеческих антител, можно оценить специфичную для положения степень "сходства с человеком" (HL) в последовательности антитела. Было показано, что определение HL полезно для разработки антител для клинического применения, таких как терапевтические антитела или антитела в качестве вакцин. Цель состоит в увеличении сходства антител с человеческими, чтобы уменьшить потенциальные неблагоприятные эффекты и иммунные ответы на антитела, которые приведут к значительному снижению эффективности лекарственного средства на основе антител или могут вызвать серьезные последствия для здоровья. Можно оценить характеристики антител из комбинированного репертуара антител трех здоровых людей-доноров крови, содержащего в общей сложности приблизительно 400 миллионов последовательностей, и создать новый балльный показатель "относительного сходства с человеком" (rHL), который уделяет особое внимание гипервариабельной области антитела. Балл rHL позволяет легко различать человеческие (положительный балл) и не являющиеся человеческими последовательности (отрицательный балл). Антитела могут быть сконструированы для устранения остатков, которые не характерны для человеческого репертуара.

D. Одноцепочечные антитела

Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) представляет собой слитую молекулу из переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, связанных между собой коротким (обычно сериновым, глициновым) линкером. Эта химерная молекула сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкерного пептида. Данная модификация обычно оставляет специфичность без изменений. Вначале эти молекулы создавали для облегчения фагового дисплея, при котором очень удобно экспрессировать антигенсвязывающий домен в виде одного пептида. В качестве альтернативы scFv можно создавать непосредственно из субклонированных тяжелых и легких цепей, полученных из гибридомы или В-клетки. У одноцепочечных переменных фрагментов отсутствует константная область Fc,

присутствующая в полных молекулах антитела, и, следовательно, обычные сайты связывания (например, для белка A/G), используемые для очистки антител. Эти фрагменты часто можно очистить/иммобилизовать с использованием белка L, поскольку белок L взаимодействует с вариабельной областью легких каппа-цепей.

Гибкие линкеры обычно состоят из аминокислотных остатков, способствующих образованию спирали и поворота, таких как аланин, серин и глицин. Однако данную функцию могут выполнять и другие остатки. Tang *et al.* (1996) использовали фаговый дисплей как средство для быстрого отбора адаптированных линкеров для одноцепочечных антител (scFv) из библиотек белковых линкеров. Сконструировали библиотеку случайных линкеров, в которой гены вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей были связаны сегментом, кодирующим 18-аминокислотный полипептид переменного состава. Дисплей репертуара scFv (примерно 5×10^6 различных представителей) проводили на нитчатом фаге, и их подвергали отбору в отношении аффинности с гаптенем. Популяция отобранных вариантов показала значительное увеличение связывающей активности, но сохранила значительное разнообразие последовательностей. После скрининга 1054 индивидуальных вариантов получили каталитически активный scFv, который эффективно продуцировался в растворимой форме. Анализ последовательности выявил консервативный пролин в линкере через два остатка после С-конца V_H и обилие аргининов и пролинов в других положениях в качестве единственных общих особенностей отобранных связок.

Рекомбинантные антитела по настоящему изобретению могут также включать последовательности или фрагменты, обеспечивающие димеризацию или мультимеризацию рецепторов. Такие последовательности включают последовательности, полученные из IgA, которые обеспечивают возможность образования мультимеров в сочетании с J-цепью. Другим доменом мультимеризации является домен димеризации Gal4. В других вариантах осуществления цепи могут быть модифицированы с помощью таких средств, как биотин/авидин, что обеспечивает возможность объединения двух антител.

В отдельном варианте осуществления одноцепочечное антитело можно создать путем соединения легкой и тяжелой цепей рецептора с использованием непептидного линкера или химической структурной единицы. Обычно легкую и тяжелую цепи будут получать в отдельных клетках, очищать и впоследствии связывать друг с другом соответствующим образом (т. е. N-конец тяжелой цепи будет присоединен к С-концу легкой цепи с помощью соответствующего химического мостика).

Сшивающие реагенты используют для образования молекулярных мостиков, связывающих функциональные группы двух разных молекул, например, стабилизирующего и коагулирующего средства. Однако предполагается, что могут быть

созданы димеры или мультимеры из одного и того же аналога или гетеромерные комплексы, состоящие из разных аналогов. Чтобы связать два разных соединения поэтапно, можно использовать гетеробифункциональные сшивающие средства, которые исключают нежелательное образование гомополимера.

Иллюстративное гетеробифункциональное сшивающее средство содержит две реакционноспособные группы: одну, вступающую в реакцию с первичной аминогруппой (например, N-гидроксисукцинимид), и другую, вступающую в реакцию с тиольной группой (например, пиридилдисульфид, малеимиды, галогены и т. д.). Через группу, реакционноспособную в отношении первичного амина, сшивающее средство может вступать в реакцию с остатком(-ами) лизина одного белка (например, выбранного антитела или фрагмента), а через группу, реакционноспособную в отношении тиола, сшивающее средство, уже связанное с первым белком, вступает в реакцию с остатком цистеина (свободной сульфгидрильной группой) другого белка (например, селективного средства).

Предпочтительно использовать сшивающее средство, характеризующееся приемлемой стабильностью в крови. Известны многочисленные типы линкеров, содержащих дисульфидную связь, которые можно успешно использовать для конъюгации нацеливающих и терапевтических/профилактических средств. Линкеры, которые содержат пространственно затрудненную дисульфидную связь, могут обеспечивать большую стабильность *in vivo*, предотвращая высвобождение нацеливающего пептида до того, как он достигнет места действия. Таким образом, эти линкеры представляют собой одну группу связывающих средств.

Другим сшивающим реагентом является SMPT, который представляет собой бифункциональное сшивающее средство, содержащее дисульфидную связь, которая "стерически затруднена" соседним бензольным кольцом и метильными группами. Полагают, что стерическое затруднение дисульфидной связи выполняет функцию защиты связи от воздействия тиолат-анионов, таких как глутатион, которые могут присутствовать в тканях и крови, и тем самым помогают предотвратить разъединение конъюгата до доставки присоединенного средства в сайт-мишень.

Сшивающий реагент SMPT, как и многие другие известные сшивающие реагенты, дает возможность сшивать функциональные группы, такие как SH цистеина или первичные амины (например, эpsilon-аминогруппа лизина). К другому возможному типу сшивающего средства относятся гетеробифункциональные фотореактивные фенилазиды, содержащие расщепляемую дисульфидную связь, такие как сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3'-дитиопропионат. N-гидроксисукцинимидильная группа

вступает в реакцию с первичными аминогруппами, а фенилазид (после фотолиза) вступает в неселективную реакцию с любым аминокислотным остатком.

В дополнение к затрудненным сшивающим средствам в соответствии с данным документом также могут использоваться незатрудненные линкеры. К другим полезным сшивающим средствам, которые не считаются содержащими или образующими защищенный дисульфид, относятся SATA, SPDP и 2-иминотиолан (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). Применение таких сшивающих средств хорошо известно в данной области. Другой вариант осуществления включает применение гибких линкеров.

В патенте США № 4680338 описаны бифункциональные линкеры, применимые для получения конъюгатов лигандов с аминокислотными полимерами и/или белками, особенно для образования конъюгатов антител с хелаторами, лекарственными средствами, ферментами, детектируемыми метками и т. п. В патентах США № 5141648 и № 5563250 раскрыты расщепляемые конъюгаты, содержащие лабильную связь, которая расщепляется при различных мягких условиях. Этот линкер особенно полезен тем, что представляющее интерес средство может быть связано непосредственно с линкером, при этом расщепление приводит к высвобождению активного средства. Конкретные пути применения включают добавление свободной аминогруппы или свободной сульфгидрильной группы к белку, такому как антитело, или лекарственному средству.

В патенте США № 5856456 предусмотрены пептидные линкеры для применения в соединении полипептидных компонентов с получением слитых белков, например, одноцепочечных антител. Длина линкера составляет до приблизительно 50 аминокислот, в нем присутствует по меньшей мере одна заряженная аминокислота (предпочтительно аргинин или лизин), за которой следует пролин, и он характеризуется большей стабильностью и сниженной агрегацией. В патенте США № 5880270 раскрыты аминокислосодержащие линкеры, применимые в различных методиках иммунодиагностики и разделения.

Е. Мультиспецифические антитела

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению являются биспецифическими или мультиспецифическими. Биспецифические антитела представляют собой антитела, характеризующиеся специфичностью связывания с по меньшей мере двумя разными эпитопами. Иллюстративные биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами одного антигена. В других таких антителах можно объединить первый антигенсвязывающий сайт с вторым антигенсвязывающим сайтом. В качестве альтернативы плечо, связывающееся с патогеном, можно объединить с плечом, которое связывается с запускающей молекулой на лейкоците, такой как молекула

Т-клеточного рецептора (например, CD3), или Fc-рецепторами для IgG (FcγR), такими как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и Fc-гамма-RIII (CD16), чтобы сфокусировать и локализовать механизмы клеточной защиты в инфицированной клетке. Биспецифические антитела также можно применять для локализации цитотоксических средств в инфицированных клетках. Эти антитела обладают плечом, связывающим патоген, и плечом, которое связывает цитотоксическое средство (например, сапорин, антитело к интерферону-α, алкалоид барвинка, А-цепь рицина, метотрексат или гаптен с радиоактивным изотопом). Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические антитела на основе F(ab')₂). В WO 96/16673 описано биспецифическое антитело к ErbB2/Fc-гамма-RIII, а в патенте США № 5837234 раскрыто биспецифическое антитело к ErbB2/Fc-гамма-RI. Биспецифическое антитело к ErbB2/Fc-альфа показано в WO 98/02463. В патенте США № 5821337 описано биспецифическое антитело к ErbB2/CD3.

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, где две цепи характеризуются различной специфичностью. (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)). Вследствие случайного подбора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь из десяти различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно проводят с помощью аффинной хроматографии, довольно обременительна, а выход продукта низок. Подобные процедуры раскрыты в WO 93/08829 и в Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим подходом переменные области антител с требуемой специфичностью связывания (сайты связывания антитело-антиген) сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Предпочтительно получают слитую молекулу с константным доменом тяжелой цепи Ig, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, областей C_{H2} и C_{H3}. Предпочтительно, чтобы в по меньшей мере в одной из слитых молекул присутствовала первая константная область тяжелой цепи (C_{H1}), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи. ДНК, кодирующие слитые молекулы тяжелых цепей иммуноглобулина и, при необходимости, легкую цепь иммуноглобулина, встраивают в отдельные векторы экспрессии и совместно трансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает большую гибкость в регулировании взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в вариантах осуществления, в которых неравные соотношения трех полипептидных цепей,

используемых в конструкции, обеспечивают оптимальный выход требуемого биспецифического антитела. Однако возможно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам или когда соотношения не оказывают существенного действия на выход требуемой комбинации цепей.

В конкретном варианте осуществления этого подхода биспецифические антитела состоят из тяжелой цепи гибридной иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и пары тяжелая цепь-легкая цепь гибридного иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другом плече. Было обнаружено, что эта асимметричная структура облегчает отделение требуемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения. Этот подход раскрыт в WO 94/04690. Дополнительную информацию о получении биспецифических антител см., например, в Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в патенте США № 5731168, поверхность контакта между парой молекул антитела может быть сконструирована таким образом, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, выделяемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность контакта включает по меньшей мере часть домена C_{H3}. В этом способе одну или несколько небольших боковых цепей аминокислот на поверхности контакта первой молекулы антитела заменяют на более крупные боковые цепи (например, заменяют на тирозин или триптофан). Компенсационные "полости" идентичного или сходного размера для большой(-их) боковой(-ых) цепи(-ей) создают на поверхности контакта у второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, заменяют на аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают сшитые или "гетероконъюгированные" антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое – с биотином. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Гетероконъюгированные антитела можно получить с использованием любых удобных способов сшивания. Подходящие сшивающие

средства хорошо известны в данной области и раскрыты в патенте США № 4676980 вместе с целым рядом методик сшивания.

В литературе также были описаны методы получения биспецифических антител из фрагментов антител. Например, биспецифические антитела можно получить с использованием химической связи. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) описывают процедуру, при которой интактные антитела протеолитически расщепляют с образованием F(ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии дитиолового комплексообразующего средства, арсенита натрия, для стабилизации вицинальных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). Затем одно из TNB-производных Fab' снова превращают в Fab'-тиол путем восстановления с помощью меркаптоэтиламина и смешивают с эквимольным количеством другого TNB-производного Fab' с образованием биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела можно использовать в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

Существуют методики, которые облегчают прямое выделение Fab'-SH-фрагментов из *E. coli*, которые можно химически связать с образованием биспецифических антител. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) описывают получение молекулы гуманизированного биспецифического антитела на основе F(ab')₂. Каждый Fab'-фрагмент секретируется отдельно из *E. coli*, и их подвергали направленному химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Образованное таким образом биспецифическое антитело могло связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB2, и нормальными Т-клетками человека, а также запускать литическую активность цитотоксических лимфоцитов человека против мишеней, представляющих собой опухоли молочной железы человека.

Также были описаны различные методики получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток (Merchant *et al.*, Nat. Biotechnol. **16**, 677–681 (1998). doi:10.1038/nbt0798-677pmid:9661204). Например, биспецифические антитела получали с использованием лейциновых застежек (Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5):1547-1553, 1992). Пептиды лейциновой застежки из белков Fos и Jun связывали с Fab'-частями двух разных антител посредством слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной области с образованием мономеров, а затем повторно окисляли с образованием гетеродимеров антител. Этот способ также можно использовать для получения гомодимеров антител. Технология "диатела", описанная в Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), представила альтернативный

механизм получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат V_H , соединенный с V_L с помощью линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными доменами V_L и V_H другого фрагмента, за счет чего образуются два антигенсвязывающих сайта. Также сообщалось о другой стратегии получения биспецифических фрагментов антител с применением димеров одноцепочечных Fv (sFv). См. Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

В конкретном варианте осуществления биспецифическое или мультиспецифическое антитело может быть образовано в виде комплекса DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) (см., например, патенты США №№ 7521056; 7527787; 7534866; 7550143 и 7666400, раздел "Примеры" каждого из которых включен в данный документ посредством ссылки). Как правило, в этой методике используются преимущества специфических и высокоаффинных взаимодействий связывания, которые происходят между последовательностью домена димеризации и докинга (DDD) регуляторных (R) субъединиц cAMP-зависимой протеинкиназы (PKA) и последовательностью якорного домена (AD), полученной из любого из ряда белков AKAP (Baillie *et al.*, *FEBS Letters*. 2005; 579: 3264; Wong and Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 959). Пептиды DDD и AD можно присоединить к любому белку, пептиду или другой молекуле. Поскольку последовательности DDD самопроизвольно димеризуются и связываются с последовательностью AD, этот методика обеспечивает возможность образования комплексов между любыми выбранными молекулами, которые можно присоединить к последовательностям DDD или AD.

Предусмотрены антитела с более чем двумя валентностями. Например, можно получить триспецифические антитела (Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60, 1991; Xu *et al.*, *Science*, 358(6359):85-90, 2017). Поливалентное антитело может интернализироваться (и/или катаболизироваться) быстрее, чем двухвалентное антитело, клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела. Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой поливалентные антитела с тремя или более антигенсвязывающими сайтами (например, четырехвалентные антитела), которые можно легко получить путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или более антигенсвязывающих сайта. Предпочтительный домен димеризации содержит (или состоит из) Fc-область или шарнирную область. В этом сценарии антитело будет содержать Fc-область и три или более антигенсвязывающих сайта, расположенных с amino-конца от Fc-области. Предпочтительное поливалентное антитело в данном документе содержит (или

состоит из) от трех до приблизительно восьми, но предпочтительно четыре антигенсвязывающих сайта. Поливалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (и предпочтительно две полипептидные цепи), где полипептидная(-ые) цепь(-и) содержит(-ат) две или более переменных областей. Например, полипептидная(-ые) цепь(-и) может(-гут) содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где $VD1$ представляет собой первую переменную область, $VD2$ представляет собой вторую переменную область, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc -области, $X1$ и $X2$ представляют аминокислоту или полипептид, а n составляет 0 или 1. Например, полипептидная(-ые) цепь(-и) может(-гут) содержать: цепь $VH-CH1$ -гибкий линкер- $VH-CH1-Fc$ -область или цепь $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ -область. Поливалентное антитело в данном документе предпочтительно дополнительно содержит по меньшей мере два (и предпочтительно четыре) полипептида переменной области легкой цепи. Например, поливалентное антитело в данном документе может содержать от приблизительно двух до приблизительно восьми полипептидов переменной области легкой цепи. Предусмотренные в данном документе полипептиды переменной области легкой цепи содержат переменную область легкой цепи и, необязательно, дополнительно содержат домен C_L .

Модификации заряда особенно полезны в контексте мультиспецифического антитела, где аминокислотные замены в молекулах Fab приводят к уменьшению неправильного спаривания легких цепей с несоответствующими тяжелыми цепями (побочные продукты типа Бенс-Джонса), которое может происходить при получении би-/мультиспецифических антигенсвязывающих молекул на основе Fab с обменом VH/VL в одном из (или более, в случае молекул, содержащих более двух антигенсвязывающих молекул Fab) их связывающих плеч (см. также публикацию согласно РСТ № WO 2015/150447, в частности, приведенные в ней примеры, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Соответственно, в конкретных вариантах осуществления антитела, содержащееся в терапевтическом средстве, содержит:

- (a) первую молекулу Fab , которая специфически связывается с первым антигеном,
 - (b) вторую молекулу Fab , которая специфически связывается со вторым антигеном, и где переменные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab заменены друг на друга,
- где первый антиген представляет собой активирующий Т-клеточный антиген, а второй антиген представляет собой антиген клетки-мишени, или первый антиген представляет

собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой активирующий Т-клеточный антиген; и

где

i) в константном домене CL первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 124 заменена положительно заряженной аминокислотой (нумерация согласно Kabat), и где в константном домене CH1 первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена отрицательно заряженной аминокислотой (нумерация согласно индексу EU по Kabat); или

ii) в константном домене CL второй молекулы Fab согласно б) аминокислота в положении 124 заменена положительно заряженной аминокислотой (нумерация согласно Kabat), и где в константном домене CH1 второй молекулы Fab согласно б) аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена отрицательно заряженной аминокислотой (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

Антитело может не содержать обе модификации, упомянутые в пунктах i) и ii). Константные домены CL и CH1 второй молекулы Fab не заменяются друг другом (т. е. остаются без обмена).

В другом варианте осуществления антитела в константном домене CL первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 124 заменена независимо лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Kabat) (в одном предпочтительном варианте осуществления – независимо лизином (K) или аргинином (R)), и в константном домене CH1 первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В дополнительном варианте осуществления в константном домене CL первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 124 заменена независимо лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Kabat), и в константном домене CH1 первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 147 заменена независимо глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В конкретном варианте осуществления в константном домене CL первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 124 заменена независимо лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Kabat) (в одном предпочтительном варианте осуществления – независимо лизином (K) или аргинином (R)) и аминокислота в положении 123 заменена независимо лизином (K), аргинином (R) или гистидином (H) (нумерация согласно Kabat) (в одном предпочтительном варианте осуществления – независимо

лизином (K) или аргинином (R)), и в константном домене CH1 первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 147 заменена независимо глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно индексу EU по Kabat), и аминокислота в положении 213 заменена независимо глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D) (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В более конкретном варианте осуществления в константном домене CL первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 124 заменена лизином (K) (нумерация согласно Kabat), а аминокислота в положении 123 заменена лизином (K) или аргинин (R) (нумерация согласно Kabat), а в константном домене CH1 первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 147 заменена глутаминовой кислотой (E) (нумерация согласно индексу EU по Kabat), и аминокислота в положении 213 заменена глутаминовой кислотой (E) (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

В еще более конкретном варианте осуществления в константном домене CL первой молекулы Fab согласно а) аминокислота в положении 124 заменена лизином (K) (нумерация согласно Kabat), а аминокислота в положении 123 заменена аргинином (R) (нумерация согласно Kabat), а в константном домене CH1 первой молекулы Fab под а) аминокислота в положении 147 заменена глутаминовой кислотой (E) (нумерация согласно индексу EU по Kabat), и аминокислота в положении 213 заменена глутаминовой кислотой (E) (нумерация согласно индексу EU по Kabat).

Г. Химерные антигенные рецепторы

Искусственные Т-клеточные рецепторы (также известные как химерные Т-клеточные рецепторы, химерные иммунорецепторы, химерные антигенные рецепторы (CAR)) представляют собой сконструированные рецепторы, которые прививают произвольную специфичность иммунной эффекторной клетке. Как правило, эти рецепторы используют для прививки Т-клетке специфичности моноклонального антитела, при этом перенос их кодирующей последовательности осуществляется с помощью ретровирусных векторов. Таким образом, можно получить большое количество Т-клеток, специфических в отношении мишени, для адоптивного переноса клеток. Клинические исследования фазы I данного подхода показывают его эффективность.

Наиболее распространенной формой этих молекул являются слитые молекулы из одноцепочечных варибельных фрагментов (scFv), полученных из моноклональных антител, слитых с трансмембранным CD3-дзета и эндодоменом. Такие молекулы приводят к передаче дзета-сигнала в ответ на распознавание scFv его мишени. Примером такой конструкции является 14g2a-дзета, представляющая собой гибрид scFv, полученного из гибридомы 14g2a (который распознает дисиалоганглиозид GD2). Когда Т-клетки

экспрессируют эту молекулу (обычно это достигается путем трансдукции онкоретровирусного вектора), они распознают и убивают клетки-мишени, экспрессирующие GD2 (например, клетки нейробластомы). Чтобы нацеливаться на злокачественные В-клетки, исследователи перенаправили специфичность Т-клеток с использованием химерного иммунорецептора, специфического в отношении молекулы линии дифференцировки В-клеток, CD19.

Вариабельные части тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина сливаются посредством гибкого линкера с образованием scFv. Этому scFv предшествует сигнальный пептид для направления формирующегося белка в эндоплазматический ретикулум и последующей экспрессии на поверхности (он отщепляется). Гибкий спейсер позволяет scFv ориентироваться в разных направлениях для обеспечения связывания антигена. Трансмембранный домен представляет собой типичную гидрофобную альфа-спираль, обычно полученную из исходной молекулы сигнального эндодомена, которая выступает внутрь клетки и передает требуемый сигнал.

Белки типа I фактически представляют собой два белковых домена, связанных между собой трансмембранной альфа-спиралью. Липидный бислой клеточной мембраны, через который проходит трансмембранный домен, изолирует внутреннюю часть (эндодомен) от внешней части (эктодомена). Неудивительно, что присоединение эктодомена от одного белка к эндодому другого белка приводит к молекуле, которая сочетает распознавание первого с сигналом последнего.

Эктодомен. Сигнальный пептид направляет образующийся белок в эндоплазматический ретикулум. Это важно, если рецептор должен быть гликозилирован и закреплен в клеточной мембране. В целом подходит последовательность любого эукариотического сигнального пептида. Обычно используется сигнальный пептид, в нативном состоянии присоединенный к наиболее аминоконцевому компоненту (например, в scFv с ориентацией легкая цепь - линкер - тяжелая цепь используется нативный сигнал легкой цепи).

Антигенраспознающий домен обычно представляет собой scFv. Однако имеется множество альтернатив. Был описан антигенраспознающий домен из одиночных альфа- и бета-цепей нативного Т-клеточного рецептора (TCR), имеющий как простые эктодомены (например, эктодомен CD4 для распознавания ВИЧ-инфицированных клеток), так и более экзотические компоненты распознавания, такие как связанный цитокин (который приводит к распознаванию клеток, несущих цитокиновый рецептор). Фактически почти все, что связывается с данной мишенью с высокой аффинностью, может использоваться в качестве антигенраспознающей области.

Спейсерная область связывает антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом. Она должна быть достаточно гибкой, чтобы позволить антигенсвязывающему домену ориентироваться в разных направлениях для облегчения распознавания антигена. Простейшей формой является шарнирная область IgG1. Альтернативы включают область CH_2CH_3 иммуноглобулина и части CD3. Для большинства конструкций на основе scFv достаточно шарнира IgG1. Однако наилучший спейсер зачастую приходится определять эмпирическим путем.

Трансмембранный домен. Трансмембранный домен представляет собой гидрофобную альфа-спираль, пронизывающую мембрану. Обычно используется трансмембранный домен из самого близкого к мембране компонента эндодомена. Интересно, что использование трансмембранного домена CD3-дзета может привести к включению искусственного TCR в нативный TCR, эта особенность зависит от присутствия заряженного остатка аспарагиновой кислоты нативного трансмембранного CD3-дзета. Различные трансмембранные домены приводят к разной стабильности рецептора. Трансмембранный домен CD28 приводит к быстро экспрессируемому стабильному рецептору.

Эндодомен. Это "рабочая часть" рецептора. После распознавания антигена рецепторы кластеризуются, и сигнал передается в клетку. Наиболее часто используемым эндодоменным компонентом является CD3-дзета, который содержит 3 ITAM. Он передает сигнал активации в Т-клетку после связывания антигена. CD3-дзета может не обеспечивать полностью компетентный сигнал активации, и необходима дополнительная костимулирующая передача сигналов.

CAR "первого поколения", как правило, имели внутриклеточный домен из ξ -цепи CD3, который является первичным передатчиком сигналов от эндогенных TCR. В CAR "второго поколения" к цитоплазматическому хвосту CAR добавлены внутриклеточные сигнальные домены от различных костимулирующих белковых рецепторов (например, CD28, 41BB, ICOS) для обеспечения дополнительных сигналов в Т-клетку. Доклинические исследования показали, что конструкции CAR второго поколения улучшают противоопухолевую активность Т-клеток. Более поздние CAR "третьего поколения" объединяют несколько сигнальных доменов, таких как CD3 ζ -CD28-41BB или CD3 ζ -CD28-OX40, для дополнительного повышения эффективности.

G. ADC

Конъюгаты антитела и лекарственного средства или ADC представляют собой новый класс высокоактивных биофармацевтических лекарственных средств, разработанных в качестве таргетной терапии для лечения людей с инфекционным заболеванием. ADC представляют собой сложные молекулы, состоящие из антитела (полного mAb или

фрагмента антитела, такого как одноцепочечный вариабельный фрагмент или scFv), соединенного посредством стабильного химического линкера с лабильными связями с биологически активной цитотоксической/противовирусной полезной нагрузкой или лекарственным средством. Конъюгаты антитела и лекарственного средства являются примерами биоконъюгатов и иммуноконъюгатов.

Сочетая уникальные возможности моноклональных антител по нацеливанию с противораковой способностью цитотоксических лекарственных средств, конъюгаты антитела и лекарственного средства обеспечивают возможность точно различать здоровые и больные ткани. Это означает, что, в отличие от традиционных системных подходов, конъюгаты антитела и лекарственного средства нацеливаются на инфицированную клетку и атакуют ее, так что здоровые клетки поражаются менее серьезно.

При разработке видов противоопухолевой терапии на основе ADC противораковое лекарственное средство (например, клеточный токсин или цитотоксин) связывают с антителом, которое специфически нацеливается на определенный клеточный маркер (например, белок, который в идеальном случае находится только в инфицированных клетках или на них). Антитела отслеживают эти белки в организме и прикрепляются к поверхности раковых клеток. Биохимическая реакция между антителом и белком-мишенью (антигеном) запускает сигнал в опухолевой клетке, которая затем поглощает или интернализует антитело вместе с цитотоксином. После интернализации ADC цитотоксическое лекарственное средство высвобождается и убивает клетку или нарушает репликацию вируса. Вследствие такого нацеливания в идеальном случае лекарственное средство характеризуется меньшим числом побочных эффектов и дает более широкое терапевтическое окно, чем другие средства.

Стабильная связь между антителом и цитотоксическим/противовирусным средством является критически важным аспектом ADC. Линкеры основаны на химических мотивах, включающих дисульфиды, гидразоны или пептиды (расщепляемые) или тиоэфиры (нерасщепляемые), и контролируют распределение и доставку цитотоксического средства в клетку-мишень. Безопасность линкеров расщепляемого и нерасщепляемого типа была доказана в ходе доклинических и клинических испытаний. Brentuximab vedotin содержит чувствительный к ферментам расщепляемый линкер, который доставляет активное и высокотоксичное средство-ингибитор образования микротрубочек монометилауристатин Е или MMAE, синтетическое противоопухолевое средство, к специфическим CD30-положительным злокачественным клеткам человека. Из-за своей высокой токсичности MMAE, который ингибирует деление клеток путем блокирования полимеризации тубулина, не может использоваться в виде монотерапевтического химиотерапевтического

лекарственного средства. Однако комбинация ММАЕ, связанного с моноклональным антителом к CD30 (сAC10, белок клеточной мембраны из фактора некроза опухоли или рецептора TNF), оказалась стабильной во внеклеточной жидкости, расщепляемой катепсином и безопасной для проведения терапии. Трастузумаб эмтансин, другой одобренный ADC, представляет собой комбинацию ингибитора образования микротрубочек мертанзина (DM-1), производного майтанзина, и антитела трастузумаба (Herceptin®/Genentech/Roche), соединенных стабильным нерасщепляемым линкером.

Доступность лучших и более стабильных линкеров изменила функцию химической связи. Тип линкера, расщепляемый или нерасщепляемый, придает специфические свойства цитотоксическому (противораковому) лекарственному средству. Например, нерасщепляемый линкер удерживает лекарственное средство внутри клетки. В результате все антитело, линкер и цитотоксическое средство попадают в раковую клетку, на которую нацеливаются, где антитело распадается до уровня аминокислоты. Полученный комплекс – аминокислота, линкер и цитотоксическое средство – теперь становится активным лекарственным средством. В отличие от этого, расщепляемые линкеры катализируются ферментами в клетке-хозяине, где они высвобождают цитотоксическое средство.

Другой тип расщепляемого линкера, разрабатываемый в настоящее время, добавляет дополнительную молекулу между цитотоксическим/противовирусным лекарственным средством и сайтом расщепления. Технология на основе данного линкера позволяет исследователям создавать ADC, обладающие большей гибкостью, не беспокоясь об изменении кинетики расщепления. Исследователи также разрабатывают новый способ расщепления пептидов, основанный на расщеплении по Эдману, способе секвенирования аминокислот в пептиде. Будущие направления в разработке ADC также включают разработку сайт-специфической конъюгации (TDC) для дальнейшего улучшения стабильности и терапевтического индекса, а также α -излучающих иммуноконъюгатов и наночастиц, конъюгированных с антителами.

Н. BiTE

Биспецифические рекрутеры Т-клеток (BiTE) представляют собой класс искусственных биспецифических моноклональных антител, которые исследуются для применения в качестве противораковых лекарственных средств. Они направляют иммунную систему хозяина, более конкретно, цитотоксическую активность Т-клеток, против инфицированных клеток. *BiTE* является зарегистрированной торговой маркой Micromet AG.

BiTE представляют собой слитые белки, состоящие из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) разных антител или аминокислотных последовательностей четырех разных генов на одной пептидной цепи длиной

приблизительно 55 килodalтон. Один из scFv связывается с Т-клетками через рецептор CD3, а другой – с инфицированной клеткой через специфическую молекулу.

Подобно другим биспецифическим антителам и в отличие от обычных моноклональных антител, ViTE образуют связь между Т-клетками и клетками-мишенями. Это заставляет Т-клетки проявлять цитотоксическую/противовирусную активность в отношении инфицированных клеток, продуцируя белки, такие как перфорин и гранзимы, независимо от присутствия МНС I или костимулирующих молекул. Эти белки проникают в инфицированные клетки и инициируют апоптоз клетки. Это действие имитирует физиологические процессы, наблюдаемые во время атаки Т-клетки на инфицированные клетки.

I. Интрателя

В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой рекомбинантное антитело, которое подходит для действия внутри клетки – такие антитела известны как "интрателя". Эти антитела могут нарушать целевую функцию с помощью различных механизмов, таких как изменение внутриклеточного направленного переноса белков, вмешательство в ферментативную функцию и блокирование взаимодействий белок-белок или белок-ДНК. Во многих отношениях их структуры имитируют или аналогичны структурам одноцепочечных и однодоменных антител, обсуждавшихся выше. Действительно, один транскрипт/одна цепь является важной особенностью, которая обеспечивает внутриклеточную экспрессию в клетке-мишени, а также делает более допустимым транспорт белка через клеточные мембраны. Однако требуются дополнительные особенности.

Двумя основными проблемами, влияющими на внедрение терапевтических средств на основе интрателя, являются доставка, включая нацеливание на клетки/ткани, и стабильность. Что касается доставки, использовались различные подходы, такие как направленная на ткани доставка, применение специфичных для типа клеток промоторов, доставка на основе вирусов и применение пептидов для содействия клеточной проницаемости/транслокации через мембрану. Что касается стабильности, подход обычно заключается либо в скрининге методом грубой силы, включая способы, которые предусматривают фаговый дисплей и могут включать созревание последовательности или разработку консенсусных последовательностей, либо в более направленных модификациях, таких как последовательности, стабилизирующие вставку (например, Fc-области, последовательности белков-шаперонов, лейциновые застёжки), и замена/модификация дисульфидов.

Дополнительной особенностью, которая может потребоваться интрателам, является сигнал для внутриклеточного нацеливания. Были разработаны и коммерчески доступны векторы, которые могут нацеливать интратела (или другие белки) на внутриклеточные области, такие как цитоплазма, ядро, митохондрии и ER (Invitrogen Corp.; Persic *et al.*, 1997).

Благодаря своей способности проникать в клетки, интратела имеют дополнительные пути применения, которых могут не достичь антитела других типов. В случае антител по настоящему изобретению способность взаимодействовать с цитоплазматическим доменом MUC1 в живой клетке может мешать функциям, связанным с CD MUC1, таким как функции передачи сигнала (связывание с другими молекулами) или образование олигомеров. В частности, предполагается, что такие антитела можно использовать для ингибирования образования димера MUC1.

Ж. Очистка

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть очищенными. Предполагается, что используемый в данном документе термин "очищенный" относится к композиции, которую можно выделить от других компонентов, где белок является очищенным в любой степени по сравнению с его состоянием, которое можно получить в естественных условиях. Таким образом, очищенный белок также относится к белку, свободному от окружения, в котором он может встречаться в естественных условиях. Если используется термин "по существу очищенный", это обозначение будет относиться к композиции, в которой белок или пептид образует основной компонент композиции, например, составляет приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более от белков в композиции.

Методики очистки белков хорошо известны специалистам в данной области. Эти методики включают, на одном уровне, грубое фракционирование клеточной среды на полипептидные и неполипептидные фракции. После отделения данного полипептида от других белков представляющий интерес полипептид можно дополнительно очистить с использованием хроматографических и электрофоретических методик для достижения частичной или полной очистки (или очистки до гомогенности). Аналитические способы, особенно подходящие для получения чистого пептида, включают ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию; электрофорез в полиакриламидном геле; изоэлектрическое фокусирование. Другие способы очистки белка включают осаждение сульфатом аммония, PEG, антителами и т. п. или денатурацию нагреванием с последующим центрифугированием; гель-фильтрацию, обращенно-фазовую, гидроксиапатитную и аффинную хроматографию и комбинации таких и других методик.

При очистке антитела по настоящему изобретению может быть желательно экспрессировать полипептид в прокариотической или эукариотической системе экспрессии и экстрагировать белок с использованием денатурирующих условий. Полипептид можно очистить от других клеточных компонентов с использованием аффинной колонки, которая связывается с меченой частью полипептида. Как широко известно в данной области, полагают, что порядок проведения различных стадий очистки может быть изменен или что определенные стадии могут быть исключены, но все равно будет обеспечен подходящий способ получения по существу очищенного белка или пептида.

В большинстве случаев полные антитела фракционируют с использованием средств (т. е. белка А), которые связывают Fc-фрагмент антитела. В качестве альтернативы для одновременной очистки и отбора подходящих антител можно использовать антигены. В таких способах часто используют средство для отбора, связанное с подложкой, такой как колонка, фильтр или гранула. Антитела связывают с подложкой, загрязняющие примеси удаляют (например, вымывают) и антитела высвобождают путем применения условий (соль, тепло и т. д.).

Различные способы количественного определения степени очистки белка или пептида будут известны специалистам в данной области в свете настоящего изобретения. Они включают, например, определение специфической активности активной фракции или оценку количества полипептидов в пределах фракции с помощью анализа на основе SDS/PAGE. Другим способом оценки чистоты фракции является вычисление удельной активности фракции, сравнение ее с удельной активностью исходного экстракта и, таким образом, расчет степени чистоты. Фактические единицы, используемые для представления количества активности, будут, конечно, зависеть от конкретной методики анализа, выбранного для последующей очистки, и от того, проявляет ли экспрессируемый белок или пептид обнаруживаемую активность.

Известно, что миграция полипептида может изменяться, иногда значительно, при различных условиях SDS/PAGE (Capaldi *et al.*, 1977). Поэтому следует понимать, что при различных условиях электрофореза кажущаяся молекулярная масса очищенных или частично очищенных продуктов экспрессии могут различаться.

III. Активная/пассивная иммунизация и лечение/профилактика инфекции SARS-CoV-2

A. Состав и введение

В настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антитела к вирусу SARS-CoV-2 и антигены для их получения. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество антитела или его

фрагмента, или пептидного иммуногена, и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, вспомогательному веществу или среде-носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Вода является особым носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности для инъекционных растворов. Другие подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п.

При необходимости, композиция также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих средств или рН-буферных средств. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пиллюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т. п. Пероральные составы могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т. д. Примеры подходящих фармацевтических средств описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences". Такие композиции будут содержать профилактически или терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения, который может быть пероральным, внутривенным, внутриартериальным, интрабуккальным, интраназальным, через небулайзер, бронхиальной ингаляцией, интаректальным, вагинальным, местным или доставленным посредством искусственной вентиляции легких.

Также предусмотрены активные вакцины, в которых антитела, подобные раскрытым, вырабатываются *in vivo* у субъекта с риском инфицирования SARS-CoV-2. Такие вакцины могут быть составлены для парентерального введения, например, составлены для инъекции с помощью внутрикожного, внутривенного, внутримышечного, подкожного или даже внутрибрюшинного путей. Предусматривается введение с помощью внутрикожного и

внутримышечного путей. В качестве альтернативы вакцину можно вводить местным путем, непосредственно на слизистую оболочку, например, в виде назальных капель, ингаляции, с помощью небулайзера или с помощью, интравектальной или вагинальной доставки. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотные соли и те, которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т. п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т. п.

Пассивная передача антител, известная как искусственно приобретенный пассивный иммунитет, обычно будет включать применение внутривенных или внутримышечных инъекций. Формами антитела могут быть плазма или сыворотка крови человека или животных, как и объединенный человеческий иммуноглобулин для внутривенного (IVIG) или внутримышечного (IG) применения, как и человеческий IVIG или IG с высоким титром от иммунизированных доноров или доноров, выздоравливающих от заболевания, а также моноклональных антител (MAb). Такой иммунитет обычно длится в течение лишь короткого периода времени, и также существует потенциальный риск реакций гиперчувствительности и сывороточной болезни, особенно от гамма-глобулина, полученного не от человека. Однако пассивный иммунитет обеспечивает немедленную защиту. Антитела будут составлены в носителе, подходящем для инъекций, т. е. стерильном и пригодном для введения шприцем.

Обычно ингредиенты композиций по настоящему изобретению поставляют либо по отдельности, либо смешанными друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или пакет-саше, с указанием количества действующего вещества. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, она может быть помещена в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической степени чистоты или физиологический раствор. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

Композиции по настоящему изобретению можно составить в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как полученные из хлористоводородной, фосфорной, уксусной,

щавелевой, винной кислот и т. д., и соли, образованные с катионами, такими как полученные из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т. д.

2. ADCC

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) представляет собой иммунный механизм, приводящий к лизису клеток-мишеней, покрытых антителами, под действием иммунных эффекторных клеток. Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми специфически связываются антитела или их фрагменты, содержащие Fc-область, обычно через часть белка, которая является N-концевой по отношению к Fc-области. Под "антителом, характеризующимся повышенной/сниженной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC)" понимают антитело, характеризующееся повышенной/сниженной ADCC, определяемой любым подходящим способом, известным специалистам в данной области.

Используемый в данном документе термин "повышенная/сниженная ADCC" определяется как или повышение/снижение числа клеток-мишеней, которые лизируются за данное время при данной концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, за счет механизма ADCC, определенного выше, и/или снижение/повышение концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, необходимое для достижения лизиса данного числа клеток-мишеней за данное время за счет механизма ADCC. Повышение/снижение ADCC определено относительно ADCC, опосредованной таким же антителом, полученным в том же типе клеток-хозяев, с использованием тех же стандартных способов получения, очистки, составления и хранения (известных специалистам в данной области), но которые не были сконструированы. Например, повышение ADCC, опосредованной антителом, полученным в клетках-хозяевах, сконструированными так, чтобы иметь измененный паттерн гликозилирования (например, для экспрессии гликозилтрансферазы, GnTIII или других гликозилтрансфераз), с помощью способов, описанных в данном документе, определено относительно ADCC, опосредованной таким же антителом, полученным в том же типе не сконструированных клеток-хозяев.

3. CDC

Комплементзависимая цитотоксичность (CDC) зависит от системы комплемента. Она представляет собой процессы в иммунной системе, которые убивают патогенов, повреждая их мембраны без участия антител или клеток иммунной системы. Существует три основных процесса. Все три приводят к встраиванию в патоген одного или нескольких мембраноатакующих комплексов (MAC), которые вызывают летальное коллоидно-

осмотическое набухание, т. е. CDC. Это один из механизмов, посредством которого антитела или фрагменты антител оказывают противовирусное действие.

IV. Конъюгаты антител

Антитела по настоящему изобретению могут быть связаны с по меньшей мере одним средством с образованием конъюгата антитела. Чтобы повысить эффективность молекул антител в качестве диагностических или терапевтических средств, их обычно соединяют или ковалентно связывают или объединяют в комплексы с по меньшей мере одной требуемой молекулой или фрагментом. Такой молекулой или фрагментом может быть без ограничения по меньшей мере одна эффекторная или репортерная молекула. Эффекторные молекулы включают молекулы, характеризующиеся требуемой активностью, например, цитотоксической активностью. Неограничивающие примеры эффекторных молекул, которые были присоединены к антителам, включают токсины, противоопухолевые средства, терапевтические ферменты, радионуклиды, противовирусные средства, хелатирующие средства, цитокины, факторы роста и олиго- или полинуклеотиды. В отличие от этого, репортерная молекула определяется как любой фрагмент, который можно обнаружить с использованием анализа. Неограничивающие примеры репортерных молекул, которые были конъюгированы с антителами, включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, фотоаффинные молекулы, окрашенные частицы или лиганды, такие как биотин.

Конъюгаты антител обычно предпочтительны для применения в качестве диагностических средств. Диагностические средства на основе антител обычно относятся к двум классам: те, которые применяются в диагностике *in vitro*, например, в различных иммуноанализах, и те, которые применяются в диагностических протоколах *in vivo*, в целом известных как "антитело-направленная визуализация". В данной области известно множество подходящих средств для визуализации, а также способов их присоединения к антителам (см., например, патенты США №№ 5021236, 4938948 и 4472509). Используемые фрагменты для визуализации могут представлять собой парамагнитные ионы, радиоактивные изотопы, флуорохромы, вещества, обнаруживаемые с помощью ЯМР, и средства для рентгеновской визуализации.

В случае парамагнитных ионов можно упомянуть в качестве примера такие ионы, как хром (III), марганец (II), железо (III), железо (II), кобальт (II), никель (II), медь (II), неодим (III), самарий (III), иттербий (III), гадолиний (III), ванадий (II), тербий (III), диспрозий (III), гольмий (III) и/или эрбий (III), причем особенно предпочтительным является гадолиний.

Ионы, пригодные в других контекстах, таких как рентгеновская визуализация, включают без ограничения лантан (III), золото (III), свинец (II) и особенно висмут (III).

В случае радиоактивных изотопов для терапевтического и/или диагностического применения можно упомянуть аstat²¹¹, ¹⁴углерод, ⁵¹хром, ³⁶хлор, ⁵⁷кобальт, ⁵⁸кобальт, ⁶⁷медь, ¹⁵²Eu, галлий⁶⁷, ³водород, йод¹²³, йод¹²⁵, йод¹³¹, индий¹¹¹, ⁵⁹железо, ³²фосфор, рений¹⁸⁶, рений¹⁸⁸, ⁷⁵селен, ³⁵серу, технеций^{99m} и/или иттрий⁹⁰. ¹²⁵I часто предпочтительнее для применения в определенных вариантах осуществления, а технеций^{99m} и/или индий¹¹¹ также часто предпочтительнее из-за их низкой энергии и пригодности для дальнего обнаружения. Радиоактивно меченные моноклональные антитела по настоящему изобретению можно получить в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. Например, моноклональные антитела можно йодировать путем приведения в контакт с йодидом натрия и/или калия и химическим окислителем, таким как гипохлорит натрия, или ферментативным окислителем, таким как лактопероксидаза. Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению можно пометить технецием^{99m} с помощью процесса обмена лигандами, например, путем восстановления пертехната раствором двухвалентного олова, хелатирования восстановленного технеция на колонке с сефадексом и нанесения антитела на эту колонку. В качестве альтернативы можно использовать методики прямого мечения, например, путем инкубации пертехната, восстановителя, такого как SnCl_2 , буферного раствора, такого как раствор фталата натрия-калия, и антитела. Промежуточные функциональные группы, которые часто используются для связывания с антителом радиоизотопов, существующих в виде ионов металлов, представляют собой диэтиленetriаминпентауксусную кислоту (DTPA) или этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA).

Среди флуоресцентных меток, которые предусмотрены для применения в качестве конъюгатов, можно назвать Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, изотиоцианат флуоресцеина, HEX, 6-JOE, орегонский зеленый 488, орегонский зеленый 500, орегонский зеленый 514, Pacific Blue, REG, родаминовый зеленый, родаминовый красный, ренографин, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамин и/или тexasский красный.

Дополнительные типы антител, предусмотренных в настоящем изобретении, предназначены в первую очередь для применения *in vitro*, где антитело связано со вторичным связывающим лигандом и/или с ферментом (ферментной меткой), который образует окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Примеры подходящих ферментов включают уреазу, щелочную фосфатазу, гидропероксидазу (хрена)

или глюкозооксидазу. Предпочтительными вторичными связывающими лигандами являются соединения биотина, и авидина, и стрептавидина. Применение таких меток хорошо известно специалистам в данной области и описано, например, в патентах США №№ 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 и 4366241.

Еще один известный способ сайт-специфического присоединения молекул к антителам включает реакцию антител с аффинными метками на основе гаптена. По существу, аффинные метки на основе гаптена вступают в реакцию с аминокислотами в антигенсвязывающем сайте, тем самым разрушая этот сайт и блокируя реакцию со специфическим антигеном. Однако это может быть неудобно, поскольку приводит к потере связывания антигена конъюгатом антитела.

Молекулы, содержащие азидогруппы, также можно использовать для образования ковалентных связей с белками через реакционноспособные нитреновые промежуточные соединения, которые генерируются под действием ультрафиолетового света низкой интенсивности (Potter and Haley, 1983). В частности, 2- и 8-азидоаналоги пуриновых нуклеотидов использовались в качестве сайт-направленных фотозондов для идентификации нуклеотид-связывающих белков в неочищенных клеточных экстрактах (Owens & Haley, 1987; Atherton *et al.*, 1985). 2- и 8-азидонуклеотиды также использовались для картирования нуклеотид-связывающих доменов очищенных белков (Khatoon *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; Dholakia *et al.*, 1989) и могут использоваться в качестве средств, связывающих антитела.

В данной области известно несколько способов присоединения или конъюгации антитела с фрагментом его конъюгата. Некоторые способы присоединения включают применение металлохелатного комплекса с использованием, например, органического хелатирующего средства, такого как ангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА); этилентриаминтетрауксусная кислота; N-хлор-п-толуолсульфонамид и/или тетрахлор-3 α -6 α -дифенилгликоурил-3, присоединенный к антителу (патенты США №№ 4472509 и 4938948). Моноклональные антитела также могут вступать в реакцию с ферментом в присутствии связующего средства, такого как глутаровый альдегид или периодат. Конъюгаты с флуоресцеиновыми маркерами получают в присутствии этих связующих средств или с помощью реакции с изотиоцианатом. В патенте США № 4938948 визуализация опухолей молочной железы достигается с использованием моноклональных антител, а обнаруживаемые фрагменты для визуализации связывают с антителом с использованием линкеров, таких как метил-п-гидроксibenзимидат или N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропионат.

В других вариантах осуществления предусмотрена дериватизация иммуноглобулинов путем селективного введения сульфгидрильных групп в Fc-область иммуноглобулина с использованием условий реакции, которые не изменяют паратоп. Описано, что конъюгаты антител, полученные в соответствии с этим методом, демонстрируют повышенную долговечность, специфичность и чувствительность (патент США № 5196066, включенный в данный документ посредством ссылки). Сайт-специфическое присоединение эффекторных или репортерных молекул, при котором репортерную или эффекторную молекулу конъюгируют с углеводным остатком в Fc-области, также было раскрыто в литературе (O'Shannessy *et al.*, 1987). Сообщалось, что этот подход дает диагностически и терапевтически перспективные антитела, которые в настоящее время проходят клиническую оценку.

V. Способы иммунологического обнаружения

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение касается способов иммунологического обнаружения для связывания, очистки, удаления, количественного определения и иного общего обнаружения SARS-CoV-2 и ассоциированных с ним антигенов. Хотя такие способы могут применяться в традиционном смысле, другое применение будет заключаться в контроле качества и мониторинге вакцин и других партий вирусов, при этом антитела в соответствии с настоящим изобретением могут использоваться для оценки количества или целостности (т. е. долгосрочной стабильности) антигенов в вирусах. В качестве альтернативы способы можно использовать для скрининга различных антител в отношении соответствующих/требуемых профилей реактивности.

Другие способы иммунологического обнаружения включают специфические анализы для определения наличия SARS-CoV-2 у субъекта. Предусмотрен широкий спектр форматов анализа, но особенно те, которые будут использоваться для обнаружения SARS-CoV-2 в жидкости, полученной от субъекта, такой как слюна, кровь, плазма крови, мокрота, сперма или моча. В частности, было продемонстрировано, что сперма представляет собой пригодный образец для обнаружения SARS-CoV-2 (Purpura *et al.*, 2016; Mansuy *et al.*, 2016; Barzon *et al.*, 2016; Gornet *et al.*, 2016; Duffy *et al.*, 2009; CDC, 2016; Halfon *et al.*, 2010; Elder *et al.* 2005). Анализы могут быть предпочтительно составлены в формате для применения вне медицинских учреждений (домашнего), включая иммунохроматографические анализы (см. ниже), аналогичные домашним тестам на беременность. Эти анализы могут быть упакованы в виде набора с соответствующими реагентами и инструкциями, позволяющими их применением субъектом или членом семьи.

Некоторые способы иммунологического обнаружения включают, в качестве нескольких примеров, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA),

иммунорадиометрический анализ, флюороиммуноанализ, хемилюминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ и вестерн-блоттинг. В частности, также предусмотрен конкурентный анализ для обнаружения и количественного определения антител к SARS-CoV-2, направленных на специфические эпитопы паразита в образцах. Стадии различных полезных способов иммунологического обнаружения были описаны в научной литературе, например, Doolittle and Ben-Zeev (1999), Gulbis and Galand (1993), De Jager *et al.* (1993) и Nakamura *et al.* (1987). Как правило, способы иммунологического связывания включают получение образца, предположительно содержащего SARS-CoV-2, и приведение образца в контакт с первым антителом в соответствии с настоящим изобретением, в зависимости от обстоятельств в условиях, эффективных для обеспечения образования иммунокомплексов.

Эти способы включают способы очистки SARS-CoV-2 или родственных антигенов из образца. Предпочтительно, антитело будут связывать с твердой подложкой, например, в виде матрицы колонки, и образец, предположительно содержащий SARS-CoV-2 или антигенный компонент, будут наносить на иммобилизованное антитело. Нежелательные компоненты будут вымывать из колонки, оставляя антиген SARS-CoV-2 в виде иммунокомплекса с иммобилизованным антителом, который затем соберут путем удаления микроорганизма или антигена из колонки.

Способы иммунологического связывания также включают способы обнаружения и количественного определения количества SARS-CoV-2 или родственных компонентов в образце, а также обнаружения и количественного определения любых иммунных комплексов, образующихся во время связывания. В данном документе можно получить образец, предположительно содержащий SARS-CoV-2 или его антигены, и привести образец в контакт с антителом, которое связывает SARS-CoV-2 или его компоненты, с последующим обнаружением и количественным определением количества иммунных комплексов, образованных в конкретных условиях. С точки зрения обнаружения антигена анализируемым биологическим образцом может быть любой образец, предположительно содержащий SARS-CoV-2 или антиген SARS-CoV-2, такой как срез или образец ткани, гомогенизированный экстракт ткани, биологическая жидкость, включая кровь и сыворотку крови, или выделения, такие как фекалии или моча.

Контакт выбранного биологического образца с антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования иммунных комплексов (первичных иммунных комплексов), обычно заключается в простом добавлении композиции на основе антитела к образцу и инкубации смеси в течение периода времени, достаточно долгого, чтобы антитела образовали иммунные комплексы, т. е. связались с SARS-CoV-2 или присутствующими антигенами. По истечении этого времени

композицию образец-антитело, такую как срез ткани, планшет для ELISA, дот-блот или вестерн-блот, обычно будут промывать для удаления любых неспецифически связанных разновидностей антител, оставляя только те антитела, которые специфически связаны в первичных иммунных комплексах, подлежащих обнаружению.

В целом, обнаружение образования иммуннокомплексов хорошо известно в данной области и может достигаться при применении многочисленных подходов. Эти способы обычно основаны на обнаружении метки или маркера, такого как любая из этих радиоактивных, флуоресцентных, биологических или ферментативных меток. Патенты, касающиеся применения таких меток, включают патенты США №№ 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 и 4366241. Конечно, можно найти дополнительные преимущества за счет применения вторичного связывающего лиганда, такого как второе антитело и/или средства для связывания лигандов на основе биотина/авидина, известные в данной области.

Антитело, используемое при обнаружении, само по себе может быть связано с детектируемой меткой, где можно просто обнаружить эту метку, тем самым обеспечить возможность определения количества первичных иммунных комплексов в композиции. В качестве альтернативы первое антитело, которое связывается в первичных иммунных комплексах, можно обнаружить с помощью второго связывающего лиганда, обладающего аффинностью связывания с антителом. В этих случаях второй связывающий лиганд может быть связан с детектируемой меткой. Второй связывающий лиганд сам по себе зачастую представляет собой антитело, которое, таким образом, можно назвать "вторичным" антителом. Первичные иммунные комплексы приводят в контакт с меченым вторичным связывающим лигандом или антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования вторичных иммунных комплексов. Затем вторичные иммунные комплексы обычно промывают для удаления любых неспецифически связанных меченых вторичных антител или лигандов, а затем обнаруживают оставшуюся метку во вторичных иммунных комплексах.

Дополнительные способы включают обнаружение первичных иммунных комплексов с помощью двухстадийного подхода. Второй связывающий лиганд, такой как антитело, которое характеризуется аффинностью связывания с данным антителом, используют для образования вторичных иммунных комплексов, как описано выше. После промывки вторичные иммунные комплексы приводят в контакт с третьим связывающим лигандом или антителом, которое характеризуется аффинностью связывания с вторым антителом, снова в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для обеспечения образования иммунных комплексов (третичных иммунных комплексов). Третий лиганд или

антитело связаны с детектируемой меткой, что обеспечивает возможность обнаружения третичных иммунных комплексов, образованных таким образом. При необходимости, эта система может предусматривать амплификацию сигнала.

В одном способе иммунологического обнаружения применяют два разных антитела. Первое биотинилированное антитело используют для обнаружения антигена-мишени, а затем используют второе антитело для обнаружения биотина, присоединенного к образующему комплекс биотину. В этом способе подлежащий тестированию образец сначала инкубируют в растворе, содержащем антитело первой стадии. Если антиген-мишень присутствует, некоторые антитела связываются с антигеном с образованием комплекса биотинилированное антитело/антиген. Затем комплекс антитело/антиген амплифицируют путем инкубации в последовательных растворах стрептавидина (или авидина), биотинилированной ДНК и/или комплементарной биотинилированной ДНК, при этом на каждой стадии в комплекс антитело/антиген добавляются дополнительные сайты биотина. Стадии амплификации повторяют до тех пор, пока не будет достигнут подходящий уровень амплификации, после чего образец инкубируют в растворе, содержащем антитело второй стадии против биотина. Это антитело второй стадии является меченым, например, ферментом, который можно использовать для обнаружения присутствия комплекса антитело/антиген с помощью гистоэнзимологии с использованием хромогенного субстрата. При соответствующей амплификации можно получить конъюгат, видимый макроскопически.

В другом известном способе иммунологического обнаружения используют преимущества метода иммуно-ПЦР (полимеразной цепной реакции). Способ ПЦР аналогичен способу Кантора вплоть до инкубации с биотинилированной ДНК, однако вместо использования нескольких раундов инкубации стрептавидина и биотинилированной ДНК комплекс ДНК/биотин/стрептавидин/антитело вымывают с помощью буфера с низким рН или высоким содержанием солей, который высвобождает антитело. Затем полученный промывочный раствор используют для проведения реакции ПЦР с подходящими праймерами и соответствующими контролями. По меньшей мере теоретически, огромные возможности амплификации и специфичность ПЦР могут использоваться для обнаружения одной молекулы антигена.

A. ELISA

Иммунологические анализы, в их самом простом и прямом понимании, представляют собой анализы связывания. Определенные предпочтительные иммунологические анализы представляют собой различные типы твердофазных иммуоферментных анализов (ELISA) и радиоиммуноанализов (RIA), известных в данной области. Иммуногистохимическое

обнаружение с использованием срезов тканей также особенно пригодно. Однако легко понять, что обнаружение не ограничивается такими методиками, и также можно использовать вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, FACS-анализы и т. п.

В одном иллюстративном ELISA антитела по настоящему изобретению иммобилизуют на выбранной поверхности, проявляющей аффинность к белку, такой как лунка в полистироловом планшете для микротитрования. Затем в лунки добавляют тестируемую композицию, предположительно содержащую SARS-CoV-2 или антиген SARS-CoV-2. После связывания и промывки для удаления неспецифически связанных иммунных комплексов можно обнаружить связанный антиген. Обнаружения можно достичь путем добавления другого антитела к SARS-CoV-2, которое связано с детектируемой меткой. Этот тип ELISA представляет собой простой "сэндвич-ELISA". Обнаружения также можно достичь путем добавления второго антитела к SARS-CoV-2 с последующим добавлением третьего антитела, которое характеризуется аффинностью связывания с вторым антителом, при этом третье антитело связано с детектируемой меткой.

В другом иллюстративном ELISA образцы, предположительно содержащие SARS-CoV-2 или антиген SARS-CoV-2, иммобилизуют на поверхности лунки, а затем приводят в контакт с антителами к SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. После связывания и промывки для удаления неспецифически связанных иммунных комплексов обнаруживают связанные антитела к SARS-CoV-2. Если исходные антитела к SARS-CoV-2 связаны с детектируемой меткой, иммунные комплексы можно обнаруживать напрямую. Опять же, иммунные комплексы можно обнаружить с использованием второго антитела, которое характеризуется аффинностью связывания с первым антителом к SARS-CoV-2, при этом второе антитело связано с детектируемой меткой.

Независимо от используемого формата ELISA характеризуются определенными общими особенностями, такими как покрытие, инкубация и связывание, промывка для удаления неспецифически связанных разновидностей и обнаружение связанных иммунных комплексов. Они описаны ниже.

При покрытии планшета либо антигеном, либо антителом лунки планшета обычно инкубируют с раствором антигена или антитела либо на протяжении ночи, либо в течение определенного периода времени. Затем лунки планшета промывают для удаления не полностью адсорбированного материала. Затем любые оставшиеся доступные поверхности лунок "покрывают" неспецифическим белком, который является антигенно нейтральным с точки зрения тестируемой антисыворотки. Они включают бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин или растворы сухого молока. Покрытие позволяет блокировать сайты

неспецифической адсорбции на иммобилизующей поверхности и, таким образом, снижает фон, вызванный неспецифическим связыванием антисыворотки с поверхностью.

В ELISA, вероятно, более традиционно применять средства вторичного или третичного обнаружения, а не прямую процедуру. Таким образом, после связывания белка или антитела с лункой, покрытия нереакционноспособным материалом для снижения фона и промывки для удаления несвязанного материала иммобилизующую поверхность приводят в контакт с подлежащим тестированию биологическим образцом в условиях, эффективных для обеспечения образования иммунного комплекса (антиген/антитело). Затем для обнаружения иммунного комплекса требуется меченый вторичный связывающий лиганд или антитело и вторичный связывающий лиганд или антитело в сочетании с меченым третичным антителом или третьим связывающим лигандом.

"В условиях, эффективных для обеспечения образования иммунного комплекса (антиген/антитело)" означает, что условия предпочтительно включают разведение антигенов и/или антител растворами, такими как BSA, бычий гамма-глобулин (BGG) или фосфатно-солевой буфер (PBS)/Tween. Эти добавленные средства также способствуют снижению неспецифического фона.

"Подходящие" условия также означают, что инкубация проводится при температуре или в течение периода времени, достаточных для обеспечения эффективного связывания. Стадии инкубации, как правило, длятся от приблизительно 1 до 2-4 часов или около того при температуре предпочтительно порядка от 25°C до 27°C или могут длиться на протяжении ночи при температуре приблизительно 4°C или около того.

После всех стадий инкубации в ELISA поверхность контакта промывают, чтобы удалить не образовавший комплекса материал. Предпочтительная процедура промывки включает промывку таким раствором, как PBS/Tween или боратный буфер. После образования специфических иммунных комплексов между тестируемым образцом и первоначально связанным материалом и последующей промывки можно определить наличие даже незначительных количеств иммунных комплексов.

Чтобы обеспечить средства обнаружения, второе или третье антитело будет иметь ассоциированную метку, обеспечивающую возможность обнаружения. Предпочтительно, чтобы это был фермент, вызывающий развитие окраски при инкубации с подходящим хромогенным субстратом. Так, например, желательно приводить в контакт или инкубировать первый и второй иммунные комплексы с антителом, конъюгированным с уреазой, глюкозооксидазой, щелочной фосфатазой или водород-пероксидазой, в течение периода времени и в условиях, которые благоприятствуют дальнейшему развитию

образования иммунных комплексов (например, инкубация в течение 2 часов при комнатной температуре в растворе, содержащем PBS, таком как PBS-Tween).

После инкубации с меченым антителом и последующей промывки для удаления несвязанного материала количество метки определяют количественно, например, путем инкубации с хромогенным субстратом, таким как мочевиная, или бромкрезоловый пурпурный, или 2,2'-азино-ди-(3-этил-бензтиазолин-6-сульфоновая кислота (ABTS), или H_2O_2 в случае использования пероксидазы в качестве ферментной метки. Затем проводят количественное определение путем измерения степени образуемого окрашивания, например, с использованием спектрофотометра видимого спектра.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено применение форматов с конкуренцией. Это особенно применимо при обнаружении антител к SARS-CoV-2 в образце. В конкурентных анализах неизвестное количество аналита или антитела определяют по его способности вытеснять известное количество меченого антитела или аналита. Таким образом, поддающаяся количественному определению потеря сигнала является показателем количества неизвестного антитела или аналита в образце.

В данном документе авторы настоящего изобретения предлагают применять меченые моноклональные антитела к SARS-CoV-2 для определения количества антител к SARS-CoV-2 в образце. Основной формат будет включать приведение известного количества моноклонального антитела к SARS-CoV-2 (связанного с детектируемой меткой) в контакт с антигеном или частицей SARS-CoV-2. Антиген или организм SARS-CoV-2 предпочтительно присоединяют к подложке. После связывания меченого моноклонального антитела с подложкой образец добавляют и инкубируют в условиях, позволяющих любому немеченому антителу в образце конкурировать с меченым моноклональным антителом и, следовательно, вытеснять его. Путем измерения либо утерянной метки, либо оставшейся метки (и вычитая его из исходного количества связанной метки), можно определить, сколько немеченого антитела связалось с подложкой и, таким образом, сколько антител присутствует в образце.

В. Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг (в качестве альтернативы белковый иммуоблот) представляет собой аналитическую методику, используемую для обнаружения специфических белков в данном образце гомогената или экстракта ткани. В нем используют гель-электрофорез для разделения нативных или денатурированных белков по длине полипептида (денатурирующие условия) или по 3D-структуре белка (нативные/неденатурирующие условия). Затем белки переносят на мембрану (обычно из нитроцеллюлозы или PVDF), где

их исследуют (обнаруживают) с использованием антител, специфических в отношении белка-мишени.

Образцы могут быть взяты из цельной ткани или из культуры клеток. В большинстве случаев твердые ткани сначала разрушают механически с использованием блендера (для больших объемов образца), с использованием гомогенизатора (меньшие объемы) или с помощью воздействия ультразвука. Одним из вышеперечисленных механических способов также можно разрушать клетки. Однако следует отметить, что источником белка могут быть бактерии, вирусы или образцы из окружающей среды, поэтому вестерн-блоттинг не ограничивается только исследованиями клеток. Различные детергенты, соли и буферы можно использовать для стимулирования лизиса клеток и растворения белков. Чтобы предотвратить расщепление образца его собственными ферментами, часто добавляют ингибиторы протеазы и фосфатазы. Подготовку тканей часто проводят при низких температурах, чтобы избежать денатурации белка.

Белки образца разделяют с использованием гель-электрофореза. Разделение белков можно осуществлять по изоэлектрической точке (pI), молекулярной массе, электрическому заряду или комбинации этих факторов. Природа разделения зависит от обработки образца и природы геля. Это очень удобный способ определения белка. Также можно применять двумерный (2D) гель, который распределяет белки из одного образца в двух измерениях. Белки разделяются в соответствии с изоэлектрической точкой (pI, при которой они имеют нейтральный суммарный заряд) в первом измерении и в соответствии с их молекулярной массой во втором измерении.

Чтобы сделать белки доступными для обнаружения с помощью антител, их перемещают из геля на мембрану, изготовленную из нитроцеллюлозы или поливинилидендифторида (PVDF). Мембрану помещают поверх геля, а поверх нее помещают стопку фильтровальной бумаги. Всю стопку помещают в буферный раствор, который под действием капиллярных сил движется вверх по бумаге, увлекая за собой белки. Другой способ переноса белков называется электроблоттингом, и в нем используют электрический ток для перемещения белков из геля на мембрану из PVDF или нитроцеллюлозы. Белки перемещаются из геля на мембрану, сохраняя при этом организацию, которую они имели внутри геля. В результате этого процесса блоттинга белки располагаются на тонком поверхностном слое для обнаружения (см. ниже). Обе разновидности мембраны выбраны из-за их свойств неспецифического связывания белков (т. е. они одинаково хорошо связывают все белки). Связывание с белком основано на гидрофобных взаимодействиях, а также на заряженных взаимодействиях между мембраной и белком. Мембраны из нитроцеллюлозы дешевле, чем из PVDF, но гораздо более хрупкие и плохо выдерживают повторные исследования.

Однородность и общую эффективность переноса белка из геля на мембрану можно проверить путем окрашивания мембраны красителями кумасси бриллиантовый синий или пунцовый S. После переноса белки обнаруживают с использованием меченых первичных антител или немеченых первичных антител с последующим непрямым обнаружением с использованием меченого белка А или вторичных меченых антител, связывающихся с Fc-областью первичных антител.

С. Иммунохроматографические анализы

Иммунохроматографические анализы, также известные как иммунохроматографические анализы на тест-полосках, представляют собой простые устройства, предназначенные для обнаружения присутствия (или отсутствия) аналита-мишени в образце (матрице), не требующие специализированного и дорогостоящего оборудования, хотя существует множество типов применения в лаборатории, которые снабжены считывающим оборудованием. Как правило, эти тесты используются в качестве малозатратной медицинской диагностики либо для тестирования в домашних условиях, либо для тестирования в месте оказания медицинской помощи, либо для лабораторного применения. Широко распространенным и хорошо известным применением является домашний тест на беременность.

Технология основана на серии капиллярных слоев, таких как кусочки пористой бумаги или спеченного полимера. Каждый из этих элементов характеризуется способностью спонтанно транспортировать жидкость (например, мочу). Первый элемент (подушка для образца) действует как губка и удерживает избыток жидкости образца. После пропитывания жидкость мигрирует ко второму элементу (подушка с конъюгатом), в котором производитель поместил так называемый конъюгат, высушенный формат биоактивных частиц (см. ниже) в соляно-сахарной матрице, который содержит все, чтобы гарантировать оптимизированную химическую реакцию между молекулой-мишенью (например, антигеном) и ее химическим партнером (например, антителом), которое было иммобилизовано на поверхности частицы. В то время как жидкость образца растворяет соляно-сахарную матрицу, она также растворяет частицы, и в одном комбинированном процессе транспорта образец и конъюгат смешиваются при протекании через пористую структуру. Таким образом, аналит связывается с частицами, мигрируя далее через третий капиллярный слой. Этот материал имеет одну или несколько областей (часто называемых полосками), где производитель иммобилизовал третью молекулу. К тому времени, когда смесь образца и конъюгата достигает этих полосок, аналит уже связался с частицей, и комплекс связывается с третьей молекулой 'захвата'. Через некоторое время, когда через полоски прошло все больше и больше жидкости, частицы накапливаются, и область

полоски меняет цвет. Как правило, имеется по меньшей мере две полоски: одна (контрольная), которая захватывает любую частицу и тем самым показывает, что условия реакции и технология работают правильно, вторая содержит специфическую молекулу захвата и захватывает только те частицы, на которых была иммобилизована молекула аналита. После прохождения этих реакционных зон жидкость попадает в конечный пористый материал – фитиль, который действует просто как контейнер для отходов. Иммунохроматографические тесты могут работать либо как конкурентные, либо как сэндвич-анализы. Иммунохроматографические анализы раскрыты в патенте США № 6485982.

D. Иммуногистохимия

Антитела по настоящему изобретению также можно использовать в сочетании со свежемороженными и/или фиксированными в формалине залитыми в парафин тканевыми блоками, подготовленными для исследования с помощью иммуногистохимии (ИНС). Способ подготовки тканевых блоков из этих препаратов твердых частиц был успешно использован в предыдущих исследованиях посредством ИНС различных прогностических факторов и хорошо известен специалистам в данной области (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

Вкратце, замороженные срезы можно приготовить путем регидратации 50 нг замороженной "измельченной" ткани при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере (PBS) в небольших пластиковых капсулах; осаждения частиц центрифугированием; ресуспендирования их в вязкой среде для заливки (ОСТ); переворачивания капсулы и/или повторного осаждения центрифугированием; мгновенного замораживания в изопентане при температуре -70°C ; разрезания пластиковой капсулы и/или извлечения замороженного тканевого цилиндра; закрепления тканевого цилиндра на держателе микротом-криостата и/или нарезание 25-50 серийных срезов из капсулы. В качестве альтернативы, образцы цельной замороженной ткани можно использовать для нарезания серийных срезов.

Постоянные срезы можно приготовить аналогичным способом, включающим регидратацию 50 мг образца в пластиковой микроцентрифужной пробирке; осаждение; ресуспендирование в 10% формалине с фиксацией в течение 4 часов; промывку/осаждение; ресуспендирование в теплом 2,5% агаре; осаждение; охлаждение в ледяной воде для затвердевания агара; извлечение блока ткани/агара из пробирки; пропитку и/или заливку блока парафином и/или нарезку вплоть до 50 серийных фиксированных срезов. Опять же, их можно заменить образцами цельной ткани.

E. Наборы для иммунологического обнаружения

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам для иммунологического обнаружения, предназначенных для применения со способами иммунологического обнаружения, описанными выше. Поскольку антитела можно использовать для обнаружения SARS-CoV-2 или антигенов SARS-CoV-2, антитела могут быть включены в набор. Таким образом, наборы для иммунологического обнаружения будут содержать в подходящих контейнерных средствах первое антитело, которое связывается с SARS-CoV-2 или антигеном SARS-CoV-2, и, необязательно, реагент для иммунологического обнаружения.

В определенных вариантах осуществления антитело к SARS-CoV-2 может быть предварительно связано с твердой подложкой, такой как матрица колонки и/или лунка планшета для микротитрования. Реагенты для иммунологического обнаружения из набора могут принимать любую из множества форм, включая те детектируемые метки, которые ассоциированы с данным антителом или связаны с ним. Также предусматриваются детектируемые метки, которые ассоциированы с вторичным связывающим лигандом или прикреплены к нему. Иллюстративными вторичными лигандами являются такие вторичные антитела, которые характеризуются аффинностью связывания с первым антителом.

Дополнительные реагенты для иммунологического обнаружения, подходящие для применения в наборах по настоящему изобретению, включают двухкомпонентный реагент, который содержит вторичное антитело, которое характеризуется аффинностью связывания с первым антителом, наряду с третьим антителом, которое характеризуется аффинностью связывания со вторым антителом, при этом третье антитело связано с детектируемой меткой. Как отмечалось выше, в данной области известен целый ряд иллюстративных меток, и все такие метки можно использовать в сочетании с настоящим изобретением.

Наборы могут дополнительно содержать удобным образом разделенную на аликвоты композицию на основе SARS-CoV-2 или антигенов SARS-CoV-2, как меченых, так и немеченых, которую можно использовать для построения стандартной кривой для анализа обнаружения. Наборы могут содержать конъюгаты антитела и метки либо в полностью конъюгированной форме, либо в форме промежуточных соединений, либо в виде отдельных фрагментов, которые должен конъюгировать пользователь набора. Компоненты наборов могут быть упакованы как в водной среде, так и в лиофилизированной форме.

Контейнерные средства наборов обычно будут включать по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другие контейнерные устройства, в которые антитело можно поместить или, что предпочтительнее, подходящим образом разделить на аликвоты. Наборы по настоящему изобретению также, как правило, включают средства для помещения контейнеров с антителом, антигеном и любым другим реагентом в

ограниченном пространстве для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать пластиковые контейнеры, изготовленные методом литья под давлением или выдувным формованием, в которых хранятся требуемые флаконы.

Г. Анализы контроля качества вакцин и антигенов

В настоящем изобретении также предусмотрено применение антител и фрагментов антител, описанных в данном документе, для применения при оценке антигенной целостности вирусного антигена в образце. Биологические лекарственные препараты, такие как вакцины, отличаются от химических лекарственных средств тем, что обычно их нельзя охарактеризовать на молекулярном уровне; антитела представляют собой крупные молекулы значительной сложности, и им свойственны существенные отличия от препарата к препарату. Их также вводят здоровым людям, в том числе детям в начале жизни, и, таким образом, необходимо уделять особое внимание их качеству, чтобы в максимально возможной степени обеспечить их эффективность в предупреждении или лечении опасных для жизни заболеваний без причинения вреда.

Растущая глобализация производства и распространения вакцин открыла новые возможности для более эффективного решения проблем общественного здравоохранения, но также подняла вопросы об эквивалентности и взаимозаменяемости вакцин, закупаемых из различных источников. Таким образом, международная стандартизация исходных материалов, производства и контроля качества, а также установка высоких ожиданий регулирующего надзора за способами производства и применения этих продуктов стали краеугольным камнем для дальнейшего успеха. Но это остается областью постоянных изменений, и непрерывный технический прогресс в данной области дает надежду на разработку нового мощного оружия против самых старых угроз общественному здоровью, а также против новых угроз — малярии, пандемического гриппа и ВИЧ, и это лишь некоторые из них, но также оказывает сильное давление на производителей, регулирующие органы и более широкое медицинское сообщество, чтобы гарантировать, что продукты продолжают соответствовать самым высоким достижимым стандартам качества.

Таким образом, антиген или вакцину можно получать из любого источника или на любом этапе во время производственного процесса. Следовательно, процессы контроля качества могут начинаться с подготовки образца для иммунологического анализа, который идентифицирует связывание раскрытого в данном документе антитела или фрагмента с вирусным антигеном. Такие иммунологические анализы раскрыты в другом разделе в этом документе, и любой из них можно использовать для оценки структурной/антигенной целостности антигена. Регулирующими органами могут быть установлены стандарты для

определения того, что образец содержит приемлемые количества антигенно правильного и интактного антигена.

Еще одним важным вариантом осуществления, в котором оценивают целостность антигена, является определение срока годности и стабильности при хранении. Большинство лекарств, включая вакцины, со временем могут испортиться. Следовательно, критически важно определить степень, в которой антиген, такой как в вакцине, со временем деградирует или дестабилизируется, так что он перестает быть антигенным и/или способным генерировать иммунный ответ при введении субъекту. Опять же, регулирующими органами могут быть установлены стандарты для определения того, что образец содержит приемлемые количества антигенно интактного антигена.

В некоторых вариантах осуществления вирусные антигены могут содержать более одного защитного эпитопа. В этих случаях может оказаться полезным использовать анализы, которые проверяют связывание более чем одного антитела, например, 2, 3, 4, 5 или даже большего количества антител. Эти антитела связываются с близкородственными эпитопами, так что они находятся рядом или даже перекрывают друг друга. С другой стороны, они могут представлять собой отдельные эпитопы из разных частей антигена. Исследуя целостность нескольких эпитопов, можно определить более полную картину общей целостности антигена и, следовательно, способности генерировать защитный иммунный ответ.

Антитела и их фрагменты, описанные в настоящем изобретении, также можно использовать в наборе для мониторинга эффективности процедур вакцинации путем обнаружения присутствия защитных антител к SARS-CoV-2. Антитела, фрагменты антител или их варианты и производные, описанные в настоящем изобретении, также можно использовать в наборе для мониторинга производства вакцины с требуемой иммуногенностью.

Г. Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления. Специалистам в данной области должно быть понятно, что методики, раскрытые в следующих примерах, представляют собой методики, обнаруженные авторами настоящего изобретения, которые хорошо работают при реализации вариантов осуществления на практике, и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы его реализации на практике. Тем не менее, специалисты в данной области, в свете настоящего изобретения, должны понимать, что многие изменения можно сделать в конкретных раскрытых вариантах осуществления и все же получить

подобный или аналогичный результат без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

Пример 1 – Синергизм антител

Синергизм определяется в данном документе как более высокая нейтрализующая активность, опосредованная смесью из двух mAb, по сравнению с активностью, опосредованной отдельными mAb при той же общей концентрации (*in vitro*) или дозе (*in vivo*) антител. Чтобы оценить, проявляют ли два mAb в смеси синергизм в отношении нейтрализации SARS-CoV-2, авторы настоящего изобретения использовали ранее описанный подход для количественного определения синергизма (Ianevski A, He L, Aittokallio T, Tang J. *Bioinformatics*. 33, 2413-2415, 2017). Чтобы оценить значимость положительного эффекта от комбинирования mAb, наблюдаемые ответы на комбинации (матрица доза-ответ) сравнивали с ожидаемыми ответами, рассчитанными с помощью моделей оценки синергизма (Ianevski A, He L, Aittokallio T, Tang J. *Bioinformatics*. 33, 2413-2415, 2017). Нейтрализацию вируса измеряли в традиционном анализе реакции нейтрализации с подавлением фокусообразования (FRNT) с использованием SARS-CoV-2 дикого типа и монослоев культуры клеток Vero-E2. Отдельные mAb COV2-2196 и COV2-2130 смешивали в разных концентрациях для оценки нейтрализующей активности различных соотношений mAb в смеси. В частности, каждое из семикратных разведений mAb COV2-2130 (начиная с 500 нг/мл) смешивали с каждым из девяти разведений mAb COV2-2196 (начиная с 500 нг/мл) в общем объеме 50 мкл на каждое условие, а затем инкубировали с 50 мкл живого SARS-CoV-2 в среде для культивирования клеток (среда RPMI-1640 с добавлением 2% FBS) перед нанесением на конфлюэнтные клетки Vero-E2, выращенные в 96-луночных планшетах. Контрольные значения включали значения зависимости доза-ответ для нейтрализующей активности, измеренной на индивидуальной основе для отдельных mAb COV2-2196 и COV2-2130, которые оценивали при тех же дозах, что и в смеси (см. ФИГ. 1-3). Каждое измерение проводили в двух повторах. Затем авторы настоящего изобретения рассчитали процент нейтрализации вируса для каждого условия, а затем рассчитали значение показателя синергизма, которое определило взаимодействие между этими двумя mAb в смеси как синергическое (показатель синергизма = 17,4). Следует отметить, что показатель синергизма, составляющий менее -10, указывает на антагонизм, показатель от -10 до 10 указывает на аддитивный эффект, а показатель выше 10 указывает на синергический эффект. Пример на ФИГ. 1-3 показывает матрицу доза-ответ и демонстрирует, что комбинированная доза mAb, составляющая 79 нг/мл в смеси (16 нг/мл COV2-2196 и 63 нг/мл COV2-2130), обладала такой же активностью, что и 250 нг/мл

каждого отдельного mAb. Эти результаты показывают, что в смеси допускается снижение дозы в более чем 3 раза для достижения той же эффективности нейтрализации вируса.

Для оценки терапевтической эффективности обработки авторы настоящего изобретения сначала протестировали mAb COV2-2196 или COV2-2130 или их комбинацию 1:1 с использованием модели контрольного заражения MA-SARS-CoV-2. Все виды обработки снижали количество инфекционного вируса в легких, измеренного посредством титра бляшкообразования в ткани легких через 2 дня после инокуляции вируса. Обработка смесью, доставляемой в дозе 400 мкг/мышь (~20 мг/кг), была наиболее эффективной, поскольку она значительно снижала нагрузку в легких вплоть до 3×10^4 раз; при этом у 4 из 5 животных из этой группы обработки больше не наблюдали инфекционного вируса в легких (ФИГ. 4А). Аналогичным образом, обработка мышей, которым в легкие транслировали рекомбинантный аденовирус для экспрессии связывающего SARS-CoV-2 человеческого рецептора ACE2 (AdV-hACE2), с помощью смеси mAb из расчета 400 мкг/мышь через 12 часов после контрольного заражения аутентичным вирусом SARS-CoV-2 выявила полную нейтрализацию инфекционного вируса в легких *in vivo* (ФИГ. 4В). Экспрессия генов цитокинов и хемокинов INF- γ , IL-6, CXCL10 и CCL2, которые являются индикаторами воспаления, также была снижена в легких мышей, обработанных смесью mAb, по сравнению с легкими мышей, обработанных изотипическим контролем (ФИГ. 4С). В совокупности эти результаты свидетельствуют об эффективности постконтактной обработки, опосредованной смесью COV2-2196 + COV2-2130, в моделях контрольного заражения SARS-CoV-2 на мышах.

Пример 2 – Исследования контрольного заражения на приматах, отличных от человека

Получение и очистка mAb. Последовательности mAb, которые были синтезированы (Twist Bioscience) и клонированы в моноцистронный вектор экспрессии IgG1 (обозначенный как pTwist-mCis_G1), использовали для секреции mAb в культуре клеток млекопитающих. Этот вектор содержит улучшенную последовательность 2A и линкер GSG, что обеспечивает одновременную экспрессию генов тяжелой и легкой цепей mAb из одной конструкции после трансфекции¹. Авторы настоящего изобретения ранее описали экспрессию mAb в микромасштабе в 1 мл культур ExpiCHO в 96-луночных планшетах². Для более крупномасштабной экспрессии mAb авторы настоящего изобретения выполнили трансфекцию (от 1 до 300 мл на антитело) культур клеток CHO с использованием системы экспрессии Gibco™ ExpiCHO™ и протокола для мини-биореакторных пробирок объемом 50 мл (Corning), описанного поставщиком. Супернатанты культур очищали с использованием HiTrap MabSelect SuRe (Cytiva, ранее GE Healthcare Life Sciences) на 24-

колоночной системе параллельной хроматографии белков (Protein BioSolutions). В очищенных mAb проводили замену буфера на PBS, концентрировали с использованием блоков центрифужных фильтров Amicon® Ultra-4 50 кДа (Millipore Sigma) и хранили при температуре 4°C до применения. Очищенные mAb регулярно тестировали на уровне эндотоксина, которые оказались <1 ЕЭ/мг IgG для исследований на NHP. Тестирование на эндотоксин проводили с использованием картриджа PTS201F (Charles River) с диапазоном чувствительности от 10 до 0,1 ЕЭ/мл и прибора Endosafe Nexgen-MCS (Charles River).

Авторы настоящего изобретения протестировали защитную эффективность mAb с использованием недавно описанной модели контрольного заражения SARS-CoV-2 приматов, не являющихся человеком (NHP)^{3,4}. Для этой модели авторы настоящего изобретения тестировали в качестве монотерапии нейтрализующее mAb COV2-2196, кодируемое теми же сегментами переменных генов, что и COV2-2196, но с использованием ряда заметных аминокислотных различий в HCDR3 и LCDR3. Животным вводили одну дозу 50 мг/кг mAb COV2-2196 или mAb изотипического контроля внутривенно в день -3, а затем проводили контрольное заражение интраназально и интратрахеально в день 0 с помощью дозы, составляющей $1,1 \times 10^4$ БОЕ SARS-CoV-2. После контрольного заражения авторы настоящего изобретения оценили вирусную РНК с помощью RT-qPCR в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) и мазках из носа. Высокие уровни субгеномной вирусной РНК наблюдали у NHP, обработанных изотипическим контрольным mAb, с медианным пиком, составляющим 7,53 (диапазон от 5,37 до 8,23) $\log_{10}$ копий РНК/мазок в мазке из носа и медианным пиком 4,97 (диапазон от 3,81 до 5,24) $\log_{10}$ копий РНК/мл в BAL. Субгеномная вирусная РНК не обнаружена в образцах из группы обработки mAb (LOD = 50 [1,7 $\log_{10}$] копий РНК/мазок или на мл), что показывает защитный эффект. Анализ фармакокинетики выявил стабильные концентрации циркулирующих человеческих mAb у NHP.

Исследование с контрольным заражением NHP. Исследования с NHP проводили в соответствии с принципами, изложенными в восьмом издании Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных. Учреждение, в котором проводилось это исследование (Bioqual Inc., Роквилл, Мэриленд, США), полностью аккредитовано Международной ассоциацией оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC) и имеет сертифицированное Управление по качеству жизни лабораторных животных. Исследования с NHP проводили в соответствии со всеми применимыми местными, государственными и федеральными нормами, и они были одобрены соответствующим Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Исследовали восемь здоровых взрослых макак-резусов (*Macaca mulatta*) индийского происхождения (масса тела от 5 до 15 кг). Животных случайным образом распределили в группу обработки mAb к SARS-CoV-2 (n = 4 на группу) и одну контрольную (обработанную изотипом) группу (n = 4 на группу). Животные получали одну дозу 50 мг/кг mAb COV2-2196 или mAb изотипического контроля внутривенно в день -3, а затем через три дня им проводили контрольное заражение с помощью $1,1 \times 10^4$ БОЕ SARS-CoV-2, введенного в виде 1 мл i.n. путем и 1 мл интратрахеальным путем. После контрольного заражения вирусную РНК оценивали с помощью RT-qPCR в бронхоальвеолярном лаваже и мазках из носа в несколько моментов времени, как описано^{5,6}. Всем животным проводили физикальный осмотр. Кроме того, ежедневно проводили мониторинг всех животных согласно протоколу внутренней оценки, одобренного Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных. Эти исследования не были слепыми.

Обнаружение циркулирующих человеческих mAb в сыворотке крови NHP. Планшеты для ELISA покрывали на протяжении ночи при температуре 4°C с помощью 1 мкг/мл вторичного козьего антитела к IgG (H+L) человека (с предварительной адсорбцией на обезьяньих антителах) (Novus Biological) и затем блокировали в течение 2 часов. Образцы сыворотки крови анализировали при 3-кратном разведении, начиная с разведения 1:3 в разбавителе Blocker Casein в PBS (ThermoFisher). Образцы инкубировали в течение 1 часа при температуре окружающей среды, а затем удаляли и промывали планшеты. Затем лунки инкубировали в течение 1 часа с конъюгированным с HRP козьим антителом к IgG человека (с предварительной адсорбцией на обезьяньих антителах) (Southern Biotech) в разведении 1:4000. Лунки промывали, а затем инкубировали с микролуночным субстратом для пероксидазы SureBlue Reserve TMB (Seracare) (100 мкл/лунка) в течение 3 мин, а затем со стоп-раствором TMB (Seracare) для остановки реакции (100 мкл/лунка). Микропланшеты считывали при 450 нм. Концентрации человеческих mAb интерполировали на основании линейного диапазона стандартных кривых очищенного IgG человека (Sigma) с использованием программного обеспечения Prism, версия 8.0 (GraphPad).

Пример 3 – Материалы и методы для примера 4.

Экспрессия и очистка рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2. Сегменты ДНК, соответствующие RBD S-белка (остатки 319-528), подвергали оптимизации последовательности для экспрессии, синтезировали и клонировали в ДНК-плазмиду экспрессии pTwist-CMV ниже сигнального пептида IL-2 (MYRMQLLSICIALSLALVTNS) (Twist Bioscience). Линкер из трех аминокислот (GSG) и His-метку включили на C-конце конструкций экспрессии для облегчения очистки белка. Клетки Expi293F подвергали временной трансфекции

плазмидой, кодирующей RBD, и супернатанты культур собрали через 5 дней. RBD очищали из супернатантов с помощью аффинной хроматографии с никелем на колонках HisTrap Excel (GE Healthcare Life Sciences). Для получения белка, используемого в испытаниях по кристаллизации, в среду для культивирования включали 5 мкМ кифуненина, чтобы получить RBD с высоким содержанием маннозных гликанов. Гликопротеины с высоким содержанием маннозы впоследствии обрабатывали эндогликозидазой F1 (Millipore) для получения гомогенно дегликозилированного RBD.

Экспрессия и очистка рекомбинантных Fab COV2-2196 и COV2-2130. Фрагменты ДНК, соответствующие вариабельным доменам тяжелой цепи с доменом CH1 IgG1 человека и вариабельным доменам легкой цепи с константным доменом каппа-цепи человека COV2-2196 и COV2-2130, синтезировали и клонировали в вектор pTwist (Twist Bioscience). Этот вектор включает тяжелую цепь каждого Fab, за которой следует линкер GGGGS, сайт расщепления фурином, сайт рибосомного расщепления T2A и легкая цепь каждого Fab. Экспрессией тяжелой и легкой цепи управляет один и тот же промотор CMV. Fab COV2-2196 и COV2-2130 экспрессировали в клетках ExpiCHO с помощью временной трансфекции плазмиды экспрессии. Рекомбинантный Fab очищали из культурального супернатанта с использованием колонки CaptureSelect к CH1 (Thermo Fisher Scientific). Для экспрессии комплекса RBD/COV2-2196 использовали последовательность COV2-2196 *wt*. Для комплекса RBD/COV2-2196/COV2-2130 использовали модифицированную версию Fab COV2-2196, в которой первые две аминокислоты вариабельной области мутировали с QM на EV.

Кристаллизация и определение структуры комплексов антитело-антиген. Очищенный Fab COV2-2196 смешивали с дегликозилированным RBD при молярном соотношении 1:1,5, и далее смесь дополнительно очищали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex-200 Increase (GE Healthcare Life Sciences) с получением комплекса антитело-антиген. Для получения тройного комплекса RBD/COV2-2196/COV2-2130 очищенный и дегликозилированный RBD смешивали с Fab COV2-2196 и COV2-2130 при молярном соотношении 1:1,5:1,5, и тройной комплекс очищали с помощью колонки Superdex-200 Increase. Комплексы концентрировали до приблизительно 10 мг/мл и подвергали испытаниям по кристаллизации. Комплекс RBD/COV2-2196 кристаллизовали в 16% - 18% PEG 3350, 0,2 Tris-HCl, pH 8,0–8,5, а комплекс RBD/COV2-2196/COV2-2130 кристаллизовали в 5% (вес/об.) PEG 1000, 100 мМ смеси двухосновный фосфат натрия/лимонная кислота, pH 4,2, 40% (об./об.) реагентного спирта. Раствор для криопротекции готовили путем смешивания раствора для кристаллизации со 100% глицерином при объемном соотношении 20:7 для кристаллов обоих комплексов. Кристаллы

белка подвергали мгновенной заморозке в жидком азоте после быстрого замачивания в растворе для криопротекции. Данные дифракции собирали в пучке синхротронного излучения 21-ID-F для комплекса RBD/COV2-2196 и 21-ID-G для комплекса RBD/COV2-2196/COV2-2130 в усовершенствованном источнике фотонов. Данные дифракции обрабатывали с помощью пакета программ XDS⁵⁸ и CCP4⁵⁹. Кристаллические структуры определяли с помощью молекулярной замены с использованием структуры RBD в комплексе с Fab CC12.1 (PDB ID 6XC2) и структуры Fab из MR78 (PDB ID 5JRP) с помощью программы Phaser⁶⁰. Структуры уточнили и перестроили вручную с помощью Phenix⁶¹ или Coot⁶² соответственно. Модели поместили в Базу данных структуры белков. Программное обеспечение PyMOL⁶³ использовали для создания всех фигур со структурой.

Эксперименты по водородно-дейтериевой масс-спектрометрии (HDX-MS).

Эксперименты по HDX-MS проводили с использованием автоматизированного робота для обработки образцов (LEAP technologies, Форт-Лодердейл, Флорида, США), соединенного с системой для LC M-Class Acquity и HDX Manager (Waters Ltd., Уилмслоу, Великобритания). 7,6 мкл 4,3 мкМ тримера шиповидного белка S2P SARS-CoV-2 либо отдельно, либо при молярном соотношении 1:1,12 с AZD1061 или AZD8895 добавляли к 52,4 мкл буфера для метки (50 мМ фосфата калия, рD 6,2) и инкубировали в течение 1 мин при 20°C. После инкубации 50 мкл этого образца добавляли к 50 мкл гасящего раствора (50 мМ фосфата калия, 200 мМ TCEP, 2 М Gdn-HCl, рН 2,3) при 1°C. 50 мкл подвернутого гашению образца пропускали через колонку с иммобилизованным пепсином ВЕН (Waters Ltd., Уилмслоу, Великобритания) при 20°C со скоростью 100 мкл мин⁻¹ (~4000 psi) в течение 4 мин перед тем, как полученные пептиды захватывались с использованием предколонки VanGuard Acquity UPLC ВЕН C18 (1,7 мкм, 2,1 мм x 5 мм, Waters Ltd., Уилмслоу, Великобритания). После переключения колонок с помощью крана пептиды разделяли при 1°C с градиентным элюированием от 0 до 35% MeCN (0,2% об./об. муравьиной кислоты) в H₂O (0,2% об./об. муравьиной кислоты) на протяжении 6 минут при 40 мкл мин⁻¹ с использованием аналитической колонки Acquity UPLC ВЕН C18 (1,7 мкм, 1 мм x 100 мм). Пептиды анализировали с использованием масс-спектрометра Orbitrap Fusion (Thermo Fisher, Бремен, Германия), работающего либо в режиме обнаружения с орбитальной ионной ловушкой с разрешением 120K (дейтерированные образцы), либо в режиме DDA с орбитальной ионной ловушкой и ионной ловушкой (t=0 образцов). Данные MS/MS пептидов, используемые для идентификации пептидов, анализировали с помощью BioPharma Finder версии 3.0 (Thermo Fisher, Бремен, Германия), а поглощение дейтерия определяли количественно с помощью HDExaminer версии 2.0 (Sierra Analytics). Результаты пептидного пула и сводную таблицу поглощения, экспортированные из

HDExaminer в формате CSV, переформатировали с использованием собственного скрипта на языке R: для создания фигур с графиками поглощения и структурных тепловых карт с использованием PAVED (Университет Лидса)⁶⁴.

Связывание в ELISA мутантов COV2-2196. Лунки 384-луночных планшетов для микротитрования покрывали очищенным рекомбинантным S-белком 6P SARS-CoV-2 при 4°C на протяжении ночи. Планшеты блокировали 2% обезжиренным сухим молоком и 2% нормальной козьей сывороткой крови в DPBS, содержащем 0,05% Tween-20 (DPBS-T), в течение 1 часа. Антитела разводили до 10 мкг/мл, титровали с двукратным разведением в DPBS-T 23 раза и вносили в лунки с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Связанные антитела обнаруживали с использованием козьего антитела к IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (Southern Biotech), и субстрата TMB (Thermo Fischer Scientific). Реакции гасили с помощью 1 н хлористоводородной кислоты и измеряли поглощение при 450 нм с использованием спектрофотометра (Biotek).

Картирование всех мутаций, которые ускользают от связывания антителом. Все мутации, которые ускользают от связывания антителом, картировали с помощью подхода на основе DMS⁴¹. Авторы настоящего изобретения использовали ранее описанные библиотеки мутантных RBD на основе дрожжевого дисплея^{41,42}. Вкратце, сконструировали дублированные библиотеки мутантов в рецептор-связывающем домене (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2 (изолят Wuhan-Hu-1, номер доступа в Genbank MN908947, остатки N331-T531), которые содержат 3804 из 3819 возможных аминокислотных мутаций, при этом >95% присутствуют в виде одиночных мутантов. Каждый вариант RBD связали с уникальной последовательностью штрих-кода из 16 нуклеотидов для облегчения последующего секвенирования. Как описано ранее, библиотеки сортировали по экспрессии RBD и связыванию ACE2, чтобы исключить варианты RBD, которые полностью неправильно свернуты или не функциональны (т. е. у них отсутствует умеренная аффинность связывания ACE2⁴¹).

Эксперименты по картированию ускользания от антитела проводили в двух биологических повторах с использованием двух независимых библиотек мутантных RBD, как описано ранее⁴¹ с небольшими модификациями. Вкратце, дрожжевые библиотеки мутантов, индуцированные для экспрессии RBD, промывали и инкубировали с антителом в концентрации 400 нг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании. После инкубации с антителом библиотеки вторично метили с помощью конъюгированного с FITC антитела к MYC (Immunology Consultants Lab, CYMC-45F) в разведении 1:100 для выявления экспрессии RBD и конъюгированного с PE козьего антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch 109-115-098) в разведении 1:200 для

выявления связанного антитела. Сортировку методом проточной цитометрии использовали для обогащения клеток, экспрессирующих варианты RBD с пониженным связыванием антителом, посредством гейтирования с отбором, проводимым для захвата клеток с немутированным SARS-CoV-2, меченных при 1% концентрации антитела, из образцов библиотеки. Для каждого образца на цитометре обрабатывали приблизительно 10 миллионов RBD+ клеток. Клетки с ускользанием от антител, выращивали на протяжении ночи в SD-CAA (6,7 г/л базовая среда с азотом для дрожжей, 5,0 г/л казаминовых кислот, 1,065 г/л MES-кислоты и 2% вес/об. декстрозы) для размножения клеток перед экстракцией плазмиды.

Образцы плазмид готовили из предварительно отобранных и культивированных на протяжении ночи культур клеток с ускользанием от антител (ZymoPrep Yeast Plasmid Miniprep II), как описано ранее⁴¹. Последовательности штрих-кода из 16 нуклеотидов, идентифицирующие каждый вариант RBD, амплифицировали с помощью ПЦР и секвенировали на Illumina HiSeq 2500 с получением ридов из 50 п.н. с одного конца, как описано^{41,42}.

Фракции ускользания рассчитывали, как описано⁴¹, с небольшими модификациями, отмеченными ниже. Авторы настоящего изобретения использовали пакет `dms_variants` (jbloomlab.github.io/dms_variants/, версия 0.8.2) для преобразования последовательностей Illumina в число ридов каждого штрих-кодированного варианта RBD в каждой предварительно отсортированной популяции с ускользанием от антител с использованием ранее описанной таблицы преобразования штрих-код/RBD⁶⁵.

Для каждого отбора антител авторы настоящего изобретения рассчитали "фракцию ускользания" для каждого штрих-кодированного варианта с использованием числа ридов на основе глубокого секвенирования для каждого варианта в исходной популяции и популяции с ускользанием от антитела, и общую фракцию библиотеки, которая ускользнула от связывания антителом с помощью ранее описанной формулы⁴¹. Эти фракции ускользания представляют предполагаемую фракцию клеток, экспрессирующих этот конкретный вариант, который попадает в категорию ускользания от антитела, так что значение 0 означает, что вариант всегда связывается сывороткой крови, а значение 1 означает, что он всегда ускользает от связывания антителом. Затем авторы настоящего изобретения применили вычислительный фильтр для удаления вариантов с низким числом ридов секвенирования или очень вредными мутациями, которые могут вызвать ускользание от антитела просто из-за недостаточной экспрессии правильно свернутого RBD на поверхности дрожжевой клетки^{41,42}. В частности, они удалили варианты, которые характеризовались (или содержали мутации с) показателями связывания ACE2 < -2,35 или

показателями экспрессии <-1 , с использованием показателей глубокого мутационного сканирования на уровне варианта и мутации, как описано ранее⁴². Следует отметить, что эти критерии фильтрации немного более строгие, чем те, которые ранее использовались для картирования панели человеческих антител⁴¹, но идентичны тем, которые использовались в недавних исследованиях, определяющих остатки RBD, влияющие на связывание mAb⁶⁵ и поликлональной сыворотки⁵⁴.

Затем авторы настоящего изобретения преобразовали показатели ускользания на уровне варианта в оценки фракции ускользания для одиночных мутаций с использованием универсальных моделей эпистаза⁶⁶, реализованные в пакете `dms_variants`, как подробно описано по адресу (jbloomlab.github.io/dms_variants/dms_variants.globalepistasis.html) и описано в литературе⁴¹. Представленные по всей работе фракции ускользания представляют собой средние значения по библиотекам (корреляции показаны на ФИГ. 18А-В); эти показатели также представлены в таблице В. Сайты сильного ускользания от каждого антитела для выделения на графиках в виде логотипа последовательностей определяли эвристически как сайты, у которых суммарные показатели мутационного ускользания в по меньшей мере 10 раз превышали медианную сумму отбора по сайтам и находились в пределах 10-кратной суммы по сайтам от наиболее строго отобранного сайта. Полная документация по вычислительному анализу находится по адресу github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs. Эти результаты также доступны в интерактивной форме по адресу https://jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/.

Эксперименты по отбору ускользания от антител с VSV-SARS-CoV-2. Для экспериментов по отбору ускользания с помощью COV2-2196 и COV2-2130 авторы настоящего изобретения использовали способный к репликации рекомбинантный вирус VSV, кодирующий шиповидный белок из SARS-CoV-2 с делецией 21 аминокислоты на С-конце⁴³. Вирус VSV, экспрессирующий шиповидный белок, размножали в клетках MA104 (африканская зеленая мартышка, ATCC CRL-2378.1), как описано ранее⁴³, и исходный вирусный материал титровали в культурах монослоя клеток Vero E6. Бляшки визуализировали с использованием окрашивания нейтральным красным. Для скрининга в отношении мутаций ускользания, отобранных в присутствии COV2-2196, COV2-2130 или смеси, состоящей из смеси COV2-2196 и COV2-2130 при соотношении 1:1, авторы настоящего изобретения использовали клеточный анализ в реальном времени (RTCA) и анализатор xCELLigence RTCA MP (ACEA Biosciences Inc.), а также ранее описанную схему отбора ускользания⁴¹. Вкратце, 50 мкл среды для культивирования клеток (DMEM с добавлением 2% FBS) добавляли в каждую лунку 96-луночного Е-планшета для получения

фоновое значение. В каждую лунку высевали восемнадцать тысяч (18000) клеток Vero E6 в 50 мкл среды для культивирования клеток и планшеты помещали в анализатор. Измерения проводили автоматически через каждые 15 мин, и сенсограммы визуализировали с использованием программного обеспечения RTCA версии 2.1.0 (ACEA Biosciences Inc). Вирус VSV-SARS-CoV-2 (5×10^3 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на лунку, $\sim 0,3$ MOI) смешивали с насыщающей нейтрализующей концентрацией антител COV2-2196, COV2-2130 или смеси антитела COV2-2196 и COV2-2130 в соотношении 1:1 (общая концентрация антител 5 мкг/мл) в общем объеме 100 мкл и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Через 16-20 ч после посева клеток к монослоям клеток добавляли смеси вирус-антитела. Лунки, содержащие только вирус в отсутствие антител, и лунки, содержащие только клетки Vero E6 в среде, включали в каждый планшет в качестве контролей. Планшеты измеряли непрерывно (через каждые 15 мин) в течение 72 часов. Мутации ускользания идентифицировали путем мониторинга клеточного индекса на предмет снижения жизнеспособности клеток. Чтобы подтвердить ускользание от отбора с антителами, лунки, в которых наблюдали цитопатический эффект в присутствии COV2-2130, оценивали в последующем эксперименте с RTCA в присутствии 10 мкг/мл COV2-2130 или COV2-2196. После подтверждения устойчивости отобранных вирусов к нейтрализации под действием COV2-2130 вирусные изоляты размножали на клетках Vero E6 в присутствии 10 мкг/мл COV2-2130. Вирусную РНК выделяли с использованием набора для выделения вирусной РНК QiAmp (QIAGEN) в соответствии с протоколом производителя, а ген шиповидного белка SARS-CoV-2 подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с помощью набора SuperScript IV One-Step RT-PCR (ThermoFisher Scientific) с использованием праймеров, фланкирующих ген S-белка. Амплифицированный ПЦР-продукт очищали с использованием магнитных гранул SPRI (Beckman Coulter) при соотношении 1:1 и секвенировали методом Сэнгера с использованием праймеров, обеспечивающих прямые и обратные риды RBD.

Серийное пассирование и тестирование SARS-CoV-2 для отбора мутаций, устойчивых к mAb. Штамм SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 серийно пассировали в культурах монослоя клеток Vero с AZD8895, AZD1061 или AZD7442 при концентрациях, начинающихся с их соответствующих значений IC_{50} , и постепенно увеличивающихся до их значения IC_{90} при каждом пассаже. В качестве контроля вирус пассировали в отсутствие антитела. После последнего пассажа вирусы оценивали в отношении чувствительности к реципрокному антителу при конечной концентрации, которая в 10 раз превышала концентрацию IC_{90} , с помощью анализа бляшкообразования. Бляшки ($n=6$) отбирали

случайным образом для культур с AZD1061 и секвенировали их ген, кодирующий шиповидный белок вируса.

Выделение или создание аутентичных вирусов SARS-CoV-2, включая вирусы с вариантными остатками. Изолят UK B.1.1.7-OXF получили из мазка из носоглотки от инфицированного человека в Кенте, Англия. Клинические исследования для получения образцов после письменного информированного согласия были одобрены больницей Джона Рэдклиффа в Оксфорде, Великобритания. Образец разводили в DMEM с 2% FBS и пропускали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм перед добавлением к монослоям клеток Vero-hACE2-TMPRSS2 (безвозмездно предоставлены А. Creanga и В. Graham). Два дня спустя собирали супернатант для формирования исходного материала нулевого пассажа (p0). Изолят SARS-CoV-2 2019n-CoV/USA_WA1/2019 получили из Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) и пассировали на клетках Vero E6. Индивидуальные точечные мутации в гене шиповидного белка (D614G и E484K/D614G) вводили в инфекционный кДНК-клон штамма 2019n-CoV/USA_WA1/2019, как описано ранее⁶⁷. Нуклеотидные замены вводили в субклон puc57-CoV-2-F6, содержащий ген шиповидного белка инфекционного клона SARS-CoV-2 дикого типа⁶⁸. Полноразмерные инфекционные кДНК-клоны вариантов вируса SARS-CoV-2 собирали путем лигирования *in vitro* из семи смежных фрагментов кДНК, следуя ранее описанному протоколу⁶⁸. Затем проводили транскрипцию *in vitro* для синтеза полноразмерной геномной РНК. Для получения мутантных вирусов РНК-транскрипты электропорировали в клетки Vero E6. Вирусы из супернатанта клеток собирали спустя 40 ч и они служили в качестве исходных материалов p0. Все исходные материалы вируса подтверждали секвенированием.

Реакция нейтрализации с подавлением фокусообразования. Серийные разведения mAb или сыворотки крови инкубировали с 10^2 бляшкообразующих единиц (БОЕ) различных штаммов или вариантов SARS-CoV-2 в течение 1 ч при 37°C. Комплексы антитело-вирус добавляли к культурам монослоя клеток Vero-hACE2-TMPRSS2 в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем клетки перекрывали с помощью 1% (вес/об.) метилцеллюлозы в MEM с добавлением 2% FBS. Планшеты собирали спустя 20 ч, удаляя перекрытие, и фиксировали с помощью 4% PFA в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре. Планшеты промывали и последовательно инкубировали с олигоклональным пулом mAb к S-белку и конъюгированным с HRP козьим антителом к IgG человека в PBS с добавлением 0,1% сапона и 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Фокусы инфицированных SARS-CoV-2 клеток визуализировали с использованием субстрата для пероксидазы TrueBlue (KPL) и определяли количественно на микроанализаторе ImmunoSpot (Cellular Technologies).

Множественное выравнивание последовательностей. Авторы настоящего изобретения провели поиск последовательностей генов переменных доменов антител, исходно имеющих те же особенности, что и последовательности, кодирующие COV2-2196, и извлекали совпадающие последовательности из репертуаров каждого обследованного человека. Они провели поиск подобных последовательностей в общедоступных крупномасштабных репертуарах последовательностей антител для трех здоровых людей и репертуарах пуповинной крови (депонировано под SRP174305). Параметрами поиска для тяжелой цепи были последовательности с *IGHV1-58* и *IGHJ3* с остатками P99, D108 и F110. Кроме того, параметрами поиска для легкой цепи были последовательности с остатками Y92 и W98. Последовательности из совпадающего клонотипа, которые принадлежали каждому индивидууму, выравнивали либо с помощью ClustalO (тяжелые цепи), либо с помощью MUSCLE (легкие цепи). Затем с помощью WebLogo создали LOGO-графики выровненных последовательностей.

Доступность данных и материалов. Кристаллические структуры, о которых сообщается в этой работе, были депонированы в Базе данных структуры белков под номерами доступа 7L7D, 7L7E. Депонирование архива ридов последовательностей для набора данных репертуара выровненных генов человеческих антител размещено в NCBI: PRJNA511481. Все остальные данные доступны в основном тексте или дополнительных материалах.

Доступность программного обеспечения. Вычислительный процесс для анализа мутаций ускользания от антител с помощью глубокого мутационного сканирования доступен на GitHub: github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs. Файлы в формате FASTQ доступны в Архиве ридов последовательностей NCBI под BioSample SAMN17532001, как часть BioProject PRJNA639956. Фракции ускользания для каждой мутации доступны на GitHub (github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/blob/main/results/supp_data/AZ_cocktail_raw_data.csv) и в таблице B.

Пример 4 – Результат и обсуждение

Антитело на основе COV2-2196 исследуется в отношении профилактики или терапии в комбинации с антителом на основе неконкурирующего RBD-специфического антитела COV2-2130. Чтобы понять молекулярные детали распознавания RBD под действием COV2-2196 и COV2-2130, а также возможные структурные механизмы, лежащие в основе синергизма, показанного при профилактической защите двух неконкурирующих mAb на животных моделях¹, авторы настоящего изобретения определили кристаллические структуры RBD S-белка в комплексе с COV2-2196 при 2,50 Å (ФИГ. 8А-Е, таблица В) и в комплексе с COV2-2196 и COV2-2130 одновременно при 3,00 Å (ФИГ. 9А-Ф, таблица В).

Более тонкая структура RBD-COV2-2196 в комплексе RBD-COV2-2196-2130 накладывается на структуру комплекса RBD-COV2-2196 (ФИГ. 12). Площадь скрытой поверхности на поверхности контакта между COV2-2196 и RBD составляет приблизительно $650 \text{ \AA}^2$ в обеих кристаллических структурах, а площадь скрытой поверхности на поверхности контакта между COV2-2130 и RBD составляет приблизительно $740 \text{ \AA}^2$. COV2-2196 связывается с рецептор-связывающим гребнем RBD, а COV2-2130 связывается с одной стороной края RBD вокруг остатка K444 и седловинной областью рецептор-связывающего мотива (RBM), перекрывая сайт связывания ACE2 (ФИГ. 8А-В, ФИГ. 9А-В). Эти особенности объясняют конкуренцию между антителами и ACE2 за связывание RBD из нашего предыдущего исследования, например, как COV2-2196, так и COV2-2130 нейтрализуют вирус путем блокирования доступа RBD к рецептору ACE2 человека¹. Ароматические остатки из тяжелой и легкой цепей COV2-2196 образуют гидрофобный карман, который окружает остаток F486 в RBD, а также соседние остатки (G485, N487) (ФИГ. 8А, 8D и 8Е; ФИГ. 13А-С). Этот способ взаимодействия Ab-Ag необычен тем, что образование кармана антителом вызвано широким пространственным разделением HCDR3 и LCDR3. Кроме того, хотя антигенный сайт, распознаваемый COV2-2196, не скрыт на поверхности контакта между протомерами тримера S-белка сам по себе, COV2-2196 не способно связывать RBD в конформации "вниз" из-за стерического конфликта с RBD в прилегающем протомере S-белка. Следовательно, COV2-2196 связывается с RBD только в конформации "вверх" (ФИГ. 8С). Наложения тонкой структуры RBD в комплексе с COV2-2130 (ФИГ. 9С) и структуры RBD в комплексе с COV2-2196 и COV2-2130 одновременно (ФИГ. 9D) указывают на то, что COV2-2130 способно связывать RBD как в конформации тримера S-белка "вверх", так и в конформации "вниз". Эти структурные характеристики согласуются с нашими предыдущими результатами для комплекса, полученными с более низким разрешением с использованием электронной микроскопии с негативным окрашиванием¹.

Структурный анализ COV2-2196 в комплексе с RBD выявляет, как COV2-2196 распознает рецептор-связывающий гребень на RBD. Один из основных контактных остатков, F486, располагается в центре сайта связывания, при этом активно взаимодействует с гидрофобным карманом (остаток P99 тяжелой цепи и "ароматическая клетка", образованная 5 ароматическими боковыми цепями) между тяжелой/легкой цепями COV2-2196 за счет гидрофобного эффекта и ван-дер-ваальсовых взаимодействий (ФИГ. 8D-E, ФИГ. 13А-В). Сеть водородных связей (Н-связей), состоящая из 4 непосредственных Н-связей Ab-Ag и 16 опосредованных водой Н-связей, окружает остаток F486 и усиливает взаимодействие Ab-Ag (ФИГ. 13С). Важно отметить, что все остатки,

кроме одного (остаток P99 тяжелой цепи), которые активно взаимодействуют с эпитопом, кодируются последовательностями зародышевой линии (*IGHV1-58*01* и *IGHJ3*02* для тяжелой цепи, *IGKV3-20*01* и *IGKJ1*01* для легкой цепи) (ФИГ. 10A), или во взаимодействия Ab-Ag вовлечены только их атомы основной цепи, такие как N107 и G99 тяжелой цепи и S94 легкой цепи. Авторы настоящего изобретения обнаружили в литературе другое антитело, S2E12, которое кодируется теми же рекомбинациями *IGHV/IGHJ* и *IGKV/IGKJ*, с похожими, но, скорее всего, другими генами *IGHD*, чем у COV2-2196 (*IGHD2-15* в сравнении с *IGHD2-2*)³⁸. Сравнение полученной с помощью криоэлектронной микроскопии структуры S2E12 в комплексе с S-белком (PDB 7K4N) позволяет предположить, что mAb S2E12, вероятно, использует почти такие же взаимодействия Ab-Ag, что и COV2-2196, хотя можно видеть различия в конформациях боковых цепей остатков поверхности контакта (ФИГ. 13D). Например, как установлено, для остатка Y92 легкой цепи фенильное кольцо в кристаллической структуре перпендикулярно этому кольцу в структуре, полученной с помощью электронной микроскопии.

Авторы настоящего изобретения провели поиск в генетических базах данных, чтобы определить, присутствуют ли эти структурные особенности в дополнительных mAb к SARS-CoV-2, выделенных другими исследователями, и обнаружили дополнительных представителей данного клонотипа (ФИГ. 10A). В двух других исследованиях сообщалось о таком же или подобном клонотипе антител, выделенных от нескольких выздоравливающих пациентов с COVID-19^{4,38}, а в одном исследовании обнаружили три антитела с такими же парами *IGHV1-58* и *IGKV3-20* без предоставления информации об использовании генов D или J³⁹. Сообщается, что все эти антитела сильно связывают RBD SARS-CoV-2 и нейтрализуют вирус с высокой эффективностью^{1,4,38,39}. На данный момент доступны только две структуры антител с атомным разрешением, кодируемых этими рекомбинациями V_H(D_H)J_H и V_K-J_K: структура для COV2-2196, представленная в данном документе, и структура для S2E12³⁸. Авторы настоящего изобретения выполнили моделирование гомологии для двух дополнительных антител этого клонотипа из нашей собственной панели антител к SARS-CoV-2, обозначенных COV2-2072 и COV2-2381. Как и ожидалось, учитывая, что эти антитела являются представителями общего генетического клонотипа, смоделированные структуры комплексов COV2-2072/RBD и COV2-2381/RBD практически совпадают при наложении со структурами COV2-2196/RBD и S2E12/RBD на поверхностях контакта Ab-Ag (ФИГ. 14A-E). Кроме того, COV2-2072 кодирует сиквон N-связанного гликозилирования в HCDR3 (ФИГ. 14D), что является необычной особенностью для антител, учитывая, что гликозилирование CDR могло бы неблагоприятно влиять на распознавание антигена. Однако структура COV2-2196 показывает, что сшитый

дисульфидом HCDR3 в этом клонотипе располагается под углом относительно сайта связывания, что объясняет, как это необычное гликозилирование HCDR3 в COV2-2072 может переноситься без ущерба для связывания (ФИГ. 14E).

Затем авторы настоящего изобретения определили, могут ли они идентифицировать потенциальных предшественников этого публичного клонотипа в репертуарах генов переменных доменов антител циркулирующих В-клеток от лиц, ранее не инфицированных SARS-CoV-2. Авторы настоящего изобретения провели поиск генов V(D)J и VJ в ранее описанных обширных наборах данных репертуаров, берущих начало от 3 здоровых доноров-людей, не имевших в анамнезе инфекции SARS-CoV-2, а также в наборах данных из пуповинной крови, собранной до пандемии COVID-19⁴⁰. Всего в репертуаре каждого донора или пуповинной крови обнаружили 386, 193, 47 или 7 последовательностей тяжелых цепей соответственно для этого публичного клонотипа, реактивного в отношении SARS-CoV-2 (ФИГ. 15A). Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили 516738 последовательностей человеческих антител с такой же рекомбинацией легкой цепи V-J (*IGKV3-20-IGKJ1*01*). В общей сложности 103534, 191039 или 222165 последовательностей легкой цепи для этого публичного клонотипа обнаружили у каждого донора соответственно. Из-за большого числа последовательностей выравнивали по пять самых распространенных последовательностей от каждого донора. Для последовательностей каждого донора получали множественное выравнивание последовательностей с использованием ClustalOmega, а также построили графики в виде логотипа последовательностей. 5 самых распространенных последовательностей с одним и тем же событием рекомбинации у каждого донора были идентичными, что приводило к одинаковым графикам в виде логотипа последовательностей (ФИГ. 15A-B).

Авторы настоящего изобретения отметили, что 8 из 9 общих остатков, важных для связывания в антителе, кодировались последовательностями генов зародышевой линии, и все они присутствовали у всех 14 представителей публичного клонотипа, перечисленных в данном документе, от четырех разных команд по исследованию антител (ФИГ. 10A). Для валидации важности этих особенностей они экспрессировали варианты антитела с точечными мутациями в паратопе, чтобы определить эффект изменчивости консервативных остатков (ФИГ. 10B). Изменение остатка D108 на A, N или E оказывало небольшое действие, но удаление дисульфидной связи в HCDR3, которая укрепляет эту петлю, уменьшало связывание. Остаток P99, который ориентирует петлю HCDR3 в сторону от сайта взаимодействия с антигеном, также был важен, поскольку мутант P99G демонстрировал сниженное связывание, а форма COV2-2196, являющаяся ревертантом

зародышевой линии с P99, связывалась с антигеном, тогда как форма с P99G на фоне ревертанта зародышевой линии не связывалась (ФИГ. 10B).

Антитело на основе вариабельной области COV2-2196 проходит тестирование в комбинации с антителом на основе вариабельной области COV2-2130 в клинических испытаниях. HCDR3 COV2-2130 с 22 аминокислотными остатками является относительно длинным для человеческих антител и в значительной степени мутирован от предполагаемого гена *IGHD3* зародышевой линии. HCDR3, образующая длинную упорядоченную петлю, состоящую из небольших петель, стабилизируется за счет водородных связей ближнего порядка и гидрофобных взаимодействий/ароматических стэкинг-взаимодействий в пределах HCDR3 и дополнительно усиливается за счет своих взаимодействий (водородные связи и ароматические стэкинг-взаимодействия) с остатками легкой цепи (ФИГ. 16A-B). Тяжелая и легкая цепи COV2-2130 кодируются генами зародышевой линии *IGHV3-15* и *IGKV4-1* соответственно, и эти два гена кодируют самые длинные петли HCDR2 (10 аминокислот) и LCDR1 (12 аминокислот), кодируемые зародышевой линией, которые используются в COV2-2130. Рекомбинация V(D)J тяжелой цепи, мутации HCDR3 и спаривание тяжелой и легкой цепей приводят к связывающей щели между тяжелой и легкой цепями, совпадающей по форме с областью RBD, центрированной в петле S443–Y449 (ФИГ. 9A, ФИГ. 16C). В тесной связи с этими структурными особенностями только HCDR3, LCDR1, HCDR2 и LCDR2 участвуют в образовании паратопа (ФИГ. 9E-F, ФИГ. 13E-F). Изучение поверхности контакта Ab-Ag выявляет область, которая, вероятно, управляет большей частью энергии взаимодействия. Боковая цепь остатка K444 в RBD окружена подпетлей Y104–V109 петли HCDR3, и положительный заряд на атоме NZ боковой цепи нейтрализуется боковой цепью остатка D107 в HCDR3, тремя атомами кислорода карбонильной группы основной цепи из Y105, D107 и V109 и богатой электронами стороной фенильного кольца Y104 (катион-π-взаимодействие) (ФИГ. 13E). Поскольку взаимодействующие атомы полностью защищены от растворителя, высококонцентрированные взаимодействия в пределах такого ограниченного пространства являются энергетически выгодными. Кроме того, эта "горячая точка" поверхности контакта Ab-Ag окружена растворителем или защищена от него за счет взаимодействий Ab-Ag с меньшим приростом свободной энергии, включая солевой мостик между остатком R346 в RBD и D56 в HCDR2, электростатическое взаимодействие между R346 в RBD и кислородом основной цепи из Y106 в HCDR3, водородную связь между N450 в RBD и кислородом основной цепи из Y105 в HCDR3, водородную связь между кислородом основной цепи из V445 в RBD и боковой цепью Y104 в HCDR3, гидрофобное взаимодействие между боковой цепью V445 и боковыми цепями L113 и F118 в HCDR3 (ФИГ. 13E). Также в экранировании

"горячей точки" от растворителя участвует ароматическое стэкинг-взаимодействие между остатком Y105 в HCDR3 и остатком W56 в LCDR2 (ФИГ. 13E). Кроме того, LCDR1 и LCDR2 легкой цепи COV2-2130 вступают в активные контакты с RBD. Среди них боковая цепь S32 в LCDR1, кислород основной цепи из S33, боковая цепь N34 и боковая цепь Y55 в LCDR2 образуют водородные связи с боковой цепью E484 в RBD, азотом основной цепи из S494, кислородом основной цепи из Y449 и азотом основной цепи из G446 (ФИГ. 13F). Остатки K36, Y38 в LCDR1 и W56 в LCDR2 взаимодействуют с Y449 в RBD через ароматические стэкинг-взаимодействия и катион-π-взаимодействия, образуя "кластер взаимодействий" (ФИГ. 13F), хотя эти взаимодействия, вероятно, не столь сильны с энергетической точки зрения, как в случае K444 в RBD.

В кристаллической структуре RBD в комплексе с COV2-2196 и COV2-2130 одновременно авторы настоящего изобретения отметили взаимодействие между близко расположенными Fab COV2-2196 и COV2-2130 (ФИГ. 17). Возможно, что взаимодействия между двумя Fab в RBD-связанном состоянии могут вносить вклад в синергическую нейтрализацию SARS-CoV-2, наблюдаемую ранее¹. Однако неясно, какая часть синергического эффекта могла быть связана с этим взаимодействием Fab-Fab.

Для лучшего понимания сайтов RBD, критически важных для связывания COV2-2196 и COV2-2130, авторы настоящего изобретения использовали подход глубокого мутационного сканирования (DMS) для картирования всех мутаций в RBD, которые ускользают от связывания антителом⁴¹; (ФИГ. 18). Для обоих антител они идентифицировали несколько ключевых сайтов, все в структурной зоне влияния антитела, где мутации в RBD сильно нарушали связывание (ФИГ. 11A-D). Авторы настоящего изобретения привлекли нашу предыдущую работу, в которой количественно определяли эффект мутаций в RBD на связывание с ACE2⁴², чтобы перекрыть эффект в отношении связывания ACE2 для мутаций, которые препятствуют связыванию антитела с RBD (ФИГ. 11A-B). Для COV2-2196, многие мутации в F486 и N487 характеризовались фракциями ускользания, приближающимися к 1 (т.е. эти варианты RBD полностью ускользали от связывания антителом в протестированных условиях), что усиливает важность вкладов этих двух остатков в связывание антителом. Подобным образом, для COV2-2130, мутация в сайте K444 в любую из прочих 19 аминокислот препятствует связыванию антителом, что указывает на то, что лизин в данном положении является критически важным для взаимодействия Ab-Ag.

Тем не менее, не все контактные остатки для антитела идентифицировали как сайты, в которых мутации значительно снижали связывание. Возможно несколько объяснений: 1) некоторые остатки сайта связывания не быть критически важными для связывания, 2)

некоторые остатки могут использовать свои атомы основной цепи для взаимодействия со своей боковой цепью, направленной в сторону от поверхности контакта связывания или 3) мутации в некоторых сайтах могут не допускаться⁴². Например, остатки L455, F456 и Q493 являются частью структурно-определенного сайта связывания для COV2-2196 (ФИГ. 8D), но мутации в этих сайтах не влияли обнаруживаемым образом на связывание антителом (ФИГ. 11A и 11C), что свидетельствует о том, что эти остатки не вносят критически важный вклад в связывание. Наложение структуры COV2-2196/RBD на структуру S2E12/RBD явно демонстрирует гибкую шарнирную область между гребнем RBD и остальной частью RBD, которая сохраняется при связывании антителом (ФИГ. 13D). Эти результаты указывают на то, что мутации в этих трех положениях могли легко допускаться при связывании Ab-Ag и поддерживает мысль об отсутствии первостепенной важности этих конкретных остатков для связывания COV2-2196 или S2E12.

Важно отметить, что COV2-2196 и COV2-2130 не конкурируют за связывание с RBD¹, что свидетельствует о том, что они могли бы составить устойчивую к ускользанию смесь для профилактического или терапевтического применения. Действительно, карты структурных сайтов связывания и вариантов ускользания для этих двух антител не перекрываются. Чтобы протестировать, имелись ли одиночные мутации, которые могли ускользать от связывания обоими антителами, авторы настоящего изобретения выполнили эксперименты по картированию вариантов ускользания со смесью антител COV2-2196 и COV2-2130 в соотношении 1:1, но они не обнаружили каких-либо мутаций, которые характеризовались фракцией ускользания, превышающей 0,2, при этом у мутаций с самыми большими эффектами для каждого из отдельных антител она составляла примерно 1 (ФИГ. 18D).

Хотя в этих экспериментах картировали все мутации, которые определяют ускользание при связывании антитела с RBD, авторы настоящего изобретения также пытались определить, какие мутации могут возникать во время выращивания вируса. Чтобы разобраться с этим вопросом, они сначала попытались отобрать мутации ускользания с использованием рекомбинантного VSV, экспрессирующего S-гликопротеин SARS-CoV-2 (VSV-SARS-CoV-2)⁴³; (ФИГ. 11E). Авторы настоящего изобретения ожидали, что единственными аминокислотными мутациями, которые будут отбираться во время выращивания вируса, будут: 1) возникающие при изменении одного нуклеотида в РНК, 2) вызывающие минимальное вредное воздействие на связывание ACE2 и экспрессию, и 3) значительно влияющие на связывание антителом^{41,42}. В действительности, авторы настоящего изобретения не обнаружили каких-либо индуцированных COV2-2196 мутаций, которые были бы как достижимы при замене одного нуклеотида, так и относительно

хорошо переносились с точки зрения воздействия на связывание ACE2 (ФИГ. 11B), что может объяснить, почему мутанты с ускользанием не отбирались ни в одном из 88 независимых повторов выращивания рекомбинантного VSV в присутствии антитела (ФИГ. 11E, ФИГ. 18G). Для COV2-2130 мутации в сайте K444, сайте который относительно хорошо переносит мутацию⁴², продемонстрировано, наиболее частое ускользание от связывания антителом в высокопроизводительном отборе ускользания от антитела с химерным вирусом VSV. В 40% экспериментах отбора с помощью антитела, две из однонуклеотидных мутаций с наибольшими эффектами в отношении связывания с антителом, K444R (выбрана в 6 из 20 повторов) и K444E (выбрана в 2 из 20 повторов) появились во время выращивания вируса (ФИГ. 11E, ФИГ. 18G).

Для изучения устойчивости к аутентичному инфекционному вирусу штамм USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 серийно пассировали в культурах монослоя клеток Vero с клиническими антителами на основе COV2-2196 (AZD8895), COV2-2130 (AZD1061) или их комбинации в соотношении 1:1 (AZD7442) при концентрациях, начинающихся с их соответствующих значений IC₅₀ и постепенно увеличивающихся до их значения IC₉₀ при каждом пассаже (ФИГ. 19). В качестве контроля вирус пассировали в отсутствие антитела. После последнего пассажа вирусы оценивали в отношении чувствительности к реципрокному антителу при конечной концентрации, которая в 10 раз превышала концентрацию IC₉₀, с помощью анализа бляшкообразования. Авторы настоящего изобретения не обнаружили каких-либо бляшек, устойчивых к нейтрализации с помощью AZD8895 (на основе COV2-2196) или смеси AZD7442. Вирус, который серийно пассировали в AZD1061, образовывал бляшки с титром $1,2 \times 10^7$ БОЕ/мл в присутствии концентрации, в 10 раз превышающей значение IC₉₀ для AZD1061, но бляшки не образовывались с AZD7442. Бляшки (n = 6) отбирали случайным образом и секвенировали их вирусный ген, кодирующий шиповидный белок, что выявило изменения одних и тех же 3 аминокислот во всех 6 независимо отобранных и секвенированных бляшках: N74K, R346I и S686G (ФИГ. 11F). Ранее сообщалось, что изменение S686G ассоциировано с серийным пассированием SARS-CoV-2 в клетках Vero⁴⁴, выделено при исследованиях контрольного заражения на хорьках⁴⁵ или NHP⁴⁶ и, согласно прогнозам, снижает активность фурина⁴⁴. Остаток N74K расположен в N-концевом домене за пределами сайта связывания AZD1061 и приводит к потере гликана⁴⁷. Остаток R346I расположен в сайте связывания AZD1061 и может быть ассоциирован с устойчивостью к AZD1061. Влияние изменения R346I на связывание AZD1061 (COV2-2130) с S-белком показано на ФИГ. 11G. Замены K444R и K444E, отобранные в системе VSV-SARS-CoV-2, и замена R346I, отобранная при пассировании с аутентичным SARS-CoV-2, происходят за счет однонуклеотидной замены

и сохраняют активность связывания ACE2 (ФИГ. 11G), что указывает на то, что наш DMS-анализ предсказал мутации, отобранные в присутствии антитела COV2-2130. Взяты вместе, эти результаты в полном объеме картируют эффекты всех аминокислотных замен на связывание COV2-2196 и COV2-2130 и идентифицируют сайты, которые могут вызывать беспокойство в отношении эволюции вируса. И все же варианты, содержащие мутации в остатках K444 и R346, являются редкими среди всех секвенированных вирусов, представленных в базах данных GISAID (все $\leq 0,01\%$ на дату обращения 23.12.20 г.).

Недавно в клинических изолятах были зарегистрированы вирусные варианты с повышенной трансмиссивностью и потенциальными антигенными мутациями⁴⁸⁻⁵¹. Авторы настоящего изобретения протестировали, будут ли некоторые из вариантных остатков в этих быстро возникающих штаммах аннулировать активность данных сильных нейтрализующих антител. Они протестировали вирусный изолят в образце из носа, полученном в Оксфорде в Соединенном Королевстве (вирус B.1.1.7, обозначенный UK B.1.1.7-OXF), который содержит линию B.1.1.7, определяющую изменения в гене шиповидного белка, включая делеции 69-70 и 144-145 в NTD и замены N501Y, A570D, D614G и P681H⁴⁹. Авторы настоящего изобретения также протестировали изогенные варианты D614G и E484K на фоне штамма WA-1 (2019n-CoV/USA_WA1/2019, [WA-1]), все они получены как аутентичные вирусы SARS-CoV-2 и используются в реакциях нейтрализации с подавлением фокусообразования⁴³. Мутация E484K представляла особый интерес, поскольку этот остаток находится в пределах 4,5 Å от каждого из mAb в комплексе Fab и RBD, хотя и на самой периферии зон влияния Fab, но присутствует в новых линиях B.1.351 (501Y.V2)⁵⁰ и P.1 (501Y.V3)⁵¹, и было показано, что он изменяет связывание некоторых моноклональных антител^{52,53}, а также поликлональных сывороточных человеческих антител⁵⁴. Также было показано, что варианты, содержащие E484K, менее эффективно нейтрализуются реконвалесцентной сывороткой и плазмой крови от выживших после SARS-CoV-2^{55,56}. Для COV2-2196, COV2-2130 и COV2-2050 (третье нейтрализующее антитело, которое авторы настоящего изобретения включили для сравнения, поскольку оно взаимодействует с остатком E484) они практически не обнаружили влияния мутации D614G или набора мутаций, присутствующих в штамме UK B.1.1.7-OXF; во всяком случае, авторы настоящего изобретения наблюдали тенденцию к небольшому улучшению (снижение значений IC₅₀ в 2-3 раза) в отношении последнего циркулирующего вируса (ФИГ. 11H). Однако они наблюдали эффектов в отношении нейтрализации вируса D614G/E484K. COV2-2050 полностью утратило нейтрализующую активность, что согласуется с нашим предыдущим исследованием, определяющим E484K как мутацию, отменяющую связывание COV2-2050⁴¹. Напротив, COV2-2196, COV2-2130 и

COV2-2196 + COV2-2130 показали лишь немного меньшую ингибирующую способность (2-5-кратное увеличение значений IC₅₀).

Обсуждение. Эти структурные анализы определяют молекулярную основу для частого отбора публичного клонотипа человеческих антител, имеющих общие рекомбинации V-D-J тяжелой цепи и V-J легкой цепи, которые нацелены на одну и ту же область RBD S-белка SARS-CoV-2. Остатки, кодируемые генами антитела зародышевой линии в тяжелой и легкой цепях, играют жизненно важную роль в распознавании антигена, что свидетельствует о том, что для созревания антител этого клонотипа требуется небольшое количество соматических мутаций. Дисульфидная связь, кодируемая геном *IGHD2*, обеспечивает дополнительное ограничение подвижности для того, чтобы HCDR3 принял конформацию с формой и химической комплементарностью антигенному сайту на RBD. По-видимому, три разных гена *IGHD2* (*IGHD2-2*, *IGHD2-8* и *IGHD2-15*) кодируют части HCDR3, которые могут функционировать в контексте этого клонотипа. Авторы настоящего изобретения предполагают, что это появление антител, кодируемых общими генами зародышевой линии, с предварительно сконфигурированными структурными особенностями, обеспечивающими высокую специфичность и сильную нейтрализующую активность, является непредвиденной и полезной особенностью первичного иммунного ответа человека на SARS-CoV-2. Отбор В-клеток из этого публичного клонотипа позволил быстро выделить сверхактивные нейтрализующие антитела, которые устойчивы к ускользанию, и, возможно, частично объясняет замечательную эффективность вакцин на основе S-белка, наблюдаемую в клинике. Можно представить себе возможность обеспечения образования титров сывороточных нейтрализующих антител с еще более высокой эффективностью нейтрализации при использовании конструкций вакцин на основе доменов или мотивов для этого антигенного сайта, чтобы инициировать иммунные реакции человека для образования данного клонотипа.

Представленный в данном документе структурный анализ комплексов RBD-COV2-2196 и RBD-COV2-2130 свидетельствует о том, что два антитела связываются с антигеном RBD, образуя "заклепкоподобные" взаимодействия с высокой плотностью энергии на единицу площади поверхности контакта, и этот результат объясняет, как такие активные антитела могут иметь такие относительно небольшие ($<750 \text{ \AA}^2$) площади скрытой поверхности на поверхностях контакта Ab-Ag. Картирование мутаций ускользания для двух антител, изученных в данном документе, указало на то, что локусы мутаций ускользания согласуются с сайтом связывания, определенным по нашим кристаллическими структурами Ab-Ag, что дополнительно подтверждает точность метода DMS. Авторы настоящего изобретения предполагают, что данные о фракциях ускользания можно будет

использовать в будущем в качестве ограничений для вычислительного докинга антител на антигенах или, в более общем плане, белков на белках, поскольку, например, остатки K444 или F486 с самыми высокими фракциями ускользания для COV2-2130 или COV2 -2196 соответственно показывают наиболее интенсивное взаимодействие с антителами в структуре комплекса антиген-антитело.

Недавнее появление вариантных вирусных линий с повышенной трансмиссивностью и измененными последовательностями во многих известных сайтах нейтрализации вызывает обеспокоенность по поводу способности SARS-CoV-2 обходить текущее противодействие антител при их разработке и тестировании. Авторы настоящего изобретения тестировали активность антител и их смеси и обнаружили устойчивую активность против нескольких важных вариантов, включая вирус, содержащий мутацию E484K, и вирус B.1.1.7 с множественными вариациями гена S-белка. Генетическая и структурная основа этой широкой активности раскрывается в кристаллических структурах и исследованиях DMS, представленных в данном документе авторами настоящего изобретения. Центральное распознавание относительно инвариантного остатка F486 доменом "ароматической клетки" в COV2-2196 является благоприятным, поскольку изменчивость этого остатка ассоциирована со сниженной приспособленностью вируса. Нацеливание на этот сайт связывания оказывается особенно эффективным в условиях синергической нейтрализации в комбинации с mAb COV2-2130, которое распознает как "открытые", так и "закрытые" тримеры S-белка. Таким образом, эта комбинация, по-видимому, предлагает широкий и мощный механизм ингибирования, который препятствует ускользанию.

Таблица 1 с расширенными данными. Сбор данных и статистика уточнения для кристаллов комплексов RBD-COV2-2196 и RBD-COV2-2196-2130

Сбор данных	RBD-COV2-2196	RBD-COV2-2196-2130
Кристалл		
ID PBD	7L7D	7L7E
Длина волны (Å)	0,97872	0,97857
Пространственная группа	P2 ₁	P2 ₁
Параметры элементарной ячейки		
a, b, c (Å)	44,1, 81,6, 101,2	97,2, 152, 2, 199,2
α , β , γ	90,0, 96,6, 90,0	90,0, 94,7, 90,0
Разрешение (Å)	43,98 – 2,50	35,21 – 3,00
Уникальные отражения	24896 (13417)	115751 (16908)
Избыточность	3,7 (3,7)	7,7 (7,7)
Полнота (%)	99,9 (99,6)	99,9 (100)
R _{слияние} (%)	4,6 (24,5)	23,1 (81,0)
1/ σ (I)	19,2 (4,8)	6,4 (2,3)

Статистика уточнения		
R _{фактор} (%)	18,5	21,5
R _{свободное} (%)	23,1	27,3
R.m.s.d. (связь) (Å)	0,0030	0,0023
R.m.s.d. (угол) (градус)	0,563	0,598
Карта Рамачандрана		
Благоприятные (%)	95,82	95,34
Разрешенные (%)	4,18	4,37
Выбросы (%)	0,00	0,09

$R_{\text{слияние}} = \sum \sum |I_{hkl} - I_{hkl(j)}| / \sum I_{hkl}$, где $I_{hkl(j)}$ представляет собой наблюдаемую интенсивность, а I_{hkl} представляет собой конечную среднюю интенсивность. $R_{\text{рабочее}} = \sum ||F_{\text{набл}}| - |F_{\text{расч}}|| / \sum |F_{\text{набл}}|$ и $R_{\text{свободное}} = \sum ||F_{\text{набл}}| - |F_{\text{расч}}|| / \sum |F_{\text{набл}}|$, где $R_{\text{свободное}}$ и $R_{\text{рабочее}}$ рассчитывают с использованием случайно выбранного тестового набора 5% данных и все отражения, исключая 5% тестовый набор, соответственно. Числа в скобках приведены для самой высокой оболочки разрешения.

* * * * *

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ ДЛЯ ПРИМЕРОВ 1 И 2

1. ter Meulen, J., *et al.* Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet* **363**, 2139-2141 (2004).
2. Zhou, P., *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270-273 (2020).
3. Robbiani, D.F., *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 infection in convalescent individuals. *bioRxiv*, 2020.2005.2013.092619 (2020).
4. Brouwer, P.J.M., *et al.* Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *bioRxiv*, 2020.2005.2012.088716 (2020).
5. Niu, P., *et al.* Ultrapotent human neutralizing antibody repertoires against Middle East Respiratory Syndrome coronavirus from a recovered patient. *J Infect Dis* **218**, 1249-1260 (2018).
6. Wang, L., *et al.* Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape. *J Virol* **92**, e02002-17 (2018).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ ДЛЯ ПРИМЕРОВ 3 И 4

1. Zost, S. J. *et al.* Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature* **584**, 443-449, doi:10.1038/s41586-020-2548-6 (2020).
2. Yuan, M. *et al.* Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. *Science* **369**, 1119-1123, doi:10.1126/science.abd2321 (2020).

- 3 Nielsen, S. C. A. *et al.* Human B Cell Clonal Expansion and Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* **28**, 516-525 e515, doi:10.1016/j.chom.2020.09.002 (2020).
- 4 Robbiani, D. F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* **584**, 437-442, doi:10.1038/s41586-020-2456-9 (2020).
- 5 Brouwer, P. J. M. *et al.* Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science* **369**, 643-650, doi:10.1126/science.abc5902 (2020).
- 6 Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7 (2020).
- 7 Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**, 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017 (2020).
- 8 Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280 e278, doi:10.1016/j.cell.2020.02.052 (2020).
- 9 Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* **5**, 562-569, doi:10.1038/s41564-020-0688-y (2020).
- 10 Wahba, L. *et al.* An Extensive Meta-Metagenomic Search Identifies SARS-CoV-2-Homologous Sequences in Pangolin Lung Viromes. *mSphere* **5**, doi:10.1128/mSphere.00160-20 (2020).
- 11 Walls, A. C. *et al.* Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 11157-11162, doi:10.1073/pnas.1708727114 (2017).
- 12 Algaissi, A. *et al.* SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients. *Sci Rep* **10**, 16561, doi:10.1038/s41598-020-73491-5 (2020).
- 13 Long, Q. X. *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* **26**, 845-848, doi:10.1038/s41591-020-0897-1 (2020).
- 14 Piccoli, L. *et al.* Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2020.09.037 (2020).
- 15 Cao, Y. *et al.* Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. *Cell* **182**, 73-84 e16, doi:10.1016/j.cell.2020.05.025 (2020).

- 16 Hansen, J. *et al.* Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science* **369**, 1010-1014, doi:10.1126/science.abd0827 (2020).
- 17 Ju, B. *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* **584**, 115-119, doi:10.1038/s41586-020-2380-z (2020).
- 18 Liu, L. *et al.* Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* **584**, 450-456, doi:10.1038/s41586-020-2571-7 (2020).
- 19 Rogers, T. F. *et al.* Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science* **369**, 956-963, doi:10.1126/science.abc7520 (2020).
- 20 Shi, R. *et al.* A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature* **584**, 120-124, doi:10.1038/s41586-020-2381-y (2020).
- 21 Weitkamp, J. H. *et al.* Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires. *J Immunol* **171**, 4680-4688, doi:10.4049/jimmunol.171.9.4680 (2003).
- 22 Benton, D. J. *et al.* Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2772-0 (2020).
- 23 Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **367**, 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).
- 24 Wrobel, A. G. *et al.* SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nat Struct Mol Biol* **27**, 763-767, doi:10.1038/s41594-020-0468-7 (2020).
- 25 Zost, S. J. *et al.* Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Med* **26**, 1422-1427, doi:10.1038/s41591-020-0998-x (2020).
- 26 Tian, C. *et al.* Immunodominance of the VH1-46 antibody gene segment in the primary repertoire of human rotavirus-specific B cells is reduced in the memory compartment through somatic mutation of nondominant clones. *J Immunol* **180**, 3279-3288, doi:10.4049/jimmunol.180.5.3279 (2008).
- 27 Wu, X. *et al.* Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* **333**, 1593-1602, doi:10.1126/science.1207532 (2011).
- 28 Zhou, T. *et al.* Structural Repertoire of HIV-1-Neutralizing Antibodies Targeting the CD4 Supersite in 14 Donors. *Cell* **161**, 1280-1292, doi:10.1016/j.cell.2015.05.007 (2015).
- 29 Huang, C. C. *et al.* Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1 coreceptor-binding site on gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2706-2711, doi:10.1073/pnas.0308527100 (2004).

- 30 Williams, W. B. *et al.* HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science* **349**, aab1253, doi:10.1126/science.aab1253 (2015).
- 31 Joyce, M. G. *et al.* Vaccine-Induced Antibodies that Neutralize Group 1 and Group 2 Influenza A Viruses. *Cell* **166**, 609-623, doi:10.1016/j.cell.2016.06.043 (2016).
- 32 Pappas, L. *et al.* Rapid development of broadly influenza neutralizing antibodies through redundant mutations. *Nature* **516**, 418-422, doi:10.1038/nature13764 (2014).
- 33 Sui, J. *et al.* Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 265-273, doi:10.1038/nsmb.1566 (2009).
- 34 Wheatley, A. K. *et al.* H5N1 Vaccine-Elicited Memory B Cells Are Genetically Constrained by the IGHV Locus in the Recognition of a Neutralizing Epitope in the Hemagglutinin Stem. *J Immunol* **195**, 602-610, doi:10.4049/jimmunol.1402835 (2015).
- 35 Bailey, J. R. *et al.* Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *JCI Insight* **2**, doi:10.1172/jci.insight.92872 (2017).
- 36 Giang, E. *et al.* Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6205-6210, doi:10.1073/pnas.1114927109 (2012).
- 37 Rappuoli, R., Bottomley, M. J., D'Oro, U., Finco, O. & De Gregorio, E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med* **213**, 469-481, doi:10.1084/jem.20151960 (2016).
- 38 Tortorici, M. A. *et al.* Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms. *Science*, doi:10.1126/science.abe3354 (2020).
- 39 Kreer, C. *et al.* Longitudinal Isolation of Potent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients. *Cell* **182**, 843-854 e812, doi:10.1016/j.cell.2020.06.044 (2020).
- 40 Soto, C. *et al.* High frequency of shared clonotypes in human B cell receptor repertoires. *Nature* **566**, 398-402, doi:10.1038/s41586-019-0934-8 (2019).
- 41 Greaney, A. J. *et al.* Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain that escape antibody recognition. *Cell Host Microbe*, doi:10.1016/j.chom.2020.11.007 (2020).
- 42 Starr, T. N. *et al.* Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell* **182**, 1295-1310 e1220, doi:10.1016/j.cell.2020.08.012 (2020).

- 43 Case, J. B. *et al.* Neutralizing antibody and soluble ACE2 inhibition of a replication-competent VSV-SARS-CoV-2 and a clinical isolate of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* **28**, 475-485 e475, doi:10.1016/j.chom.2020.06.021 (2020).
- 44 Klimstra, W. B. *et al.* SARS-CoV-2 growth, furin-cleavage-site adaptation and neutralization using serum from acutely infected hospitalized COVID-19 patients. *J Gen Virol* **101**, 1156-1169, doi:10.1099/jgv.0.001481 (2020).
- 45 Sawatzki, K. *et al.* Ferrets not infected by SARS-CoV-2 in a high-exposure domestic setting. *bioRxiv*, 2020.2008.2021.254995, doi:10.1101/2020.08.21.254995 (2020).
- 46 Baum, A. *et al.* REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science* **370**, 1110-1115, doi:10.1126/science.abe2402 (2020).
- 47 Li, Q. *et al.* The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell* **182**, 1284-1294 e1289, doi:10.1016/j.cell.2020.07.012 (2020).
- 48 Galloway, S. E. *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **70**, 95-99, doi:10.15585/mmwr.mm7003e2 (2021).
- 49 Leung, K., Shum, M. H., Leung, G. M., Lam, T. T. & Wu, J. T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill* **26**, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106 (2021).
- 50 Tegally, H. *et al.* Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *medRxiv*, 2020.2012.2021.20248640, doi:10.1101/2020.12.21.20248640 (2020).
- 51 Voloch, C. M. *et al.* Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *medRxiv*, 2020.2012.2023.20248598, doi:10.1101/2020.12.23.20248598 (2020).
- 52 Liu, Z. *et al.* Landscape analysis of escape variants identifies SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *bioRxiv*, 2020.2011.2006.372037, doi:10.1101/2020.11.06.372037 (2021).
- 53 Weisblum, Y. *et al.* Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife* **9**, doi:10.7554/eLife.61312 (2020).
- 54 Greaney, A. J. *et al.* Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies. *bioRxiv*, 2020.2012.2031.425021, doi:10.1101/2020.12.31.425021 (2021).

- 55 Wibmer, C. K. *et al.* SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *bioRxiv*, 2021.2001.2018.427166, doi:10.1101/2021.01.18.427166 (2021).
- 56 Andreano, E. *et al.* SARS-CoV-2 escape *in vitro* from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *bioRxiv*, 2020.2012.2028.424451, doi:10.1101/2020.12.28.424451 (2020).
- 57 Huo, J. *et al.* Neutralization of SARS-CoV-2 by destruction of the prefusion spike. *Cell Host Microbe* **28**, 445-454 e446, doi:10.1016/j.chom.2020.06.010 (2020).
- 58 Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132, doi:10.1107/S0907444909047337 (2010).
- 59 Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 235-242, doi:10.1107/S0907444910045749 (2011).
- 60 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674, doi:10.1107/S0021889807021206 (2007).
- 61 Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-221, doi:10.1107/S0907444909052925 (2010).
- 62 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132, doi:10.1107/S0907444904019158 (2004).
- 63 Schrodinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8* (2015).
- 64 Cornwell, O., Radford, S. E., Ashcroft, A. E. & Ault, J. R. Comparing hydrogen deuterium exchange and fast photochemical oxidation of proteins: a structural characterisation of wild-type and deltaN6 beta2-microglobulin. *J Am Soc Mass Spectrom* **29**, 2413-2426, doi:10.1007/s13361-018-2067-y (2018).
- 65 Starr, T. N. *et al.* Prospective mapping of viral mutations that escape antibodies used to treat COVID-19. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.11.30.405472 (2020).
- 66 Otwinowski, J., McCandlish, D. M. & Plotkin, J. B. Inferring the shape of global epistasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E7550-E7558, doi:10.1073/pnas.1804015115 (2018).
- 67 Plante, J. A. *et al.* Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2895-3 (2020).
- 68 Xie, X. *et al.* An infectious cDNA clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* **27**, 841-848 e843, doi:10.1016/j.chom.2020.04.004 (2020).

Таблица А – Данные по активности

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА СВЯЗЫВАНИЯ					РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА НЕЙТРАЛИЗАЦИИ					
ELISA - очищенный IgG (OD 450 нм)					(Качественная реакция Да/Нет или значение IC50 (нг/мл))					
ID клона (COV2 -xxxx)	Тример шиповидного белка SARS- CoV-2	RBD SARS -CoV- 2	NTD SARS -CoV- 2	Тример шиповидног о белка SARS-CoV?	Блокир ование hACE2	Реакция нейтрализации SARS- CoV-2 xCelligence (импеданс клетки)		Реакция с подавлением фокусообразов ания SARS- CoV-2	Нано-люциферазный тест снижения вирусной нагрузки	
						Качествен ный	Расчетная IC50		SARS- CoV-2	SARS
2196	4,2	4,2	0,05	0,09	Да	Да	н. о.	29	<100	н. о.
2838	3,67	3,62	0,12	0,21	н. о.	Да	<60	14	н. о.	н. о.
2952	3,54	3,55	0,1	0,15	н. о.	Да	>304	89	н. о.	н. о.
2514	3,56	3,56	0,09	3,6	н. о.	Да	<200	84	н. о.	н. о.
2165	4,2	4,2	0,05	0,17	н. о.	Да	н. о.	185	<400	н. о.
2391	3,57	3,65	0,1	0,1	н. о.	Да	<600	45	н. о.	н. о.
3025	3,70	3,70	н. о.	0,21	Да	Да	н. о.	31	н. о.	н. о.
2094	4,3	4,3	0,1	4,1	Да	Да	н. о.	151	<50	>1,000
2096	4,3	4,3	0,12	0,11	Да	Да	н. о.	290	<200	н. о.
2130	4,3	4,2	0,18	0,1	Да	Да	н. о.	121	<100	н. о.

Пример 5. Сильные нейтрализующие человеческие антитела, которые блокируют связывание SARS-CoV-2 с рецептором и защищают животных

АВТОРЫ: Seth J. Zost^{1*}, Pavlo Gilchuk^{1*}, James Brett Case³, Elad Binshtein¹, Rita E. Chen^{2,3}, Joseph X. Reidy¹, Andrew Trivette¹, Rachel S. Nargi¹, Rachel E. Sutton¹, Naveenchandra Suryadevara¹, Lauren E. Williamson⁴, Elaine C. Chen⁴, Taylor Jones¹, Samuel Day¹, Luke Myers¹, Ahmed O. Hassan³, Natasha M. Kafai^{2,3}, Emma S. Winkler^{2,3}, Julie M. Fox³, James J. Steinhardt⁶, Kuishu Ren⁷, Yueh-Ming Loo⁷, Nicole L. Kallewaard⁷, David R. Martinez⁵, Alexandra Schäfer⁵, Lisa E. Gralinski⁵, Ralph S. Baric⁵, Larissa B. Thackray³, Michael S. Diamond^{2,3,8,9}, Robert H. Carnahan^{1,10**}, James E. Crowe, Jr.^{1,4,10**}

Сведения об авторах:

¹Центр вакцин Вандербильта, Медицинский центр Университета Вандербильта, Нэшвилл, Теннесси, 37232, США

²Кафедра патологии и иммунологии, Медицинский колледж университета Вашингтона, Сент-Луис, Миссури, 63110, США

³Кафедра медицины, Медицинский колледж университета Вашингтона, Сент-Луис, 63110, Миссури, США ⁴Кафедра патологии, микробиологии и иммунологии, Медицинский центр Университета Вандербильта, Нэшвилл, Теннесси, 37232, США

⁵Кафедра эпидемиологии, Университет Северной Каролины в Чапел-Хилл, Чапел-Хилл, Северная Каролина, 27599, США

⁶Исследование антител и инженерия белков, Биофармацевтические исследования и разработки, AstraZeneca, Гейтерсберг, Мэриленд, 20878, США

⁷Микробиологические науки, Биофармацевтические исследования и разработки, AstraZeneca, Гейтерсберг, Мэриленд, 20878, США

⁸Кафедра молекулярной микробиологии, Медицинский колледж университета Вашингтона, Сент-Луис, Миссури, 63110, США

⁹Центр иммунологии человека и программ иммунотерапии Эндрю М. и Джейн М. Бурски, Медицинский колледж университета Вашингтона, Сент-Луис, Миссури, 63110, США

¹⁰Кафедра педиатрии, Медицинский центр Университета Вандербильта, Нэшвилл, Теннесси, 37232, США

Контактная информация:

James E. Crowe, Jr., M.D. [ОСНОВНОЕ КОНТАКТНОЕ ЛИЦО]

Отделения педиатрии, патологии, микробиологии и иммунологии и Центр вакцин Вандербильта

Почта:

Центр вакцин Вандербильта (Vanderbilt Vaccine Center)

11475 Здание медицинских исследований IV

2213 Гарланд-авеню

Нэшвилл, Теннесси, 37232-0417, США

Телефон (615) 343-8064

Эл. почта james.crowe@vumc.org

Дополнительные сноски на титульном листе

* Эти авторы внесли одинаковый вклад

** Авторы для корреспонденции

Ключевые слова: Коронавирус; SARS-CoV-2; SARS-CoV; COVID-19; антитела моноклональные; человек; адаптивный иммунитет.

Пандемия COVID-19 представляет собой серьезную угрозу для всемирного здравоохранения, в отношении которой существуют лишь ограниченное медицинское противодействие, и нам не хватает полного понимания механизмов гуморального иммунитета^{1,2}. Из панели моноклональных антител (mAb), нацеливающихся на шиповидный

(S) гликопротеин, выделенных из В-клеток инфицированных субъектов, мы идентифицировали несколько mAb, которые проявляли сильную нейтрализующую активность со значениями IC₅₀, составляющими всего 0,9 или 15 нг/мл в реакциях нейтрализации псевдовируса или SARS-CoV-2 дикого типа (*wt*) соответственно. Наиболее активные mAb полностью блокируют рецептор-связывающий домен S-белка (SRBD) от взаимодействия с ACE2 человека. Конкурентное связывание, структурные и функциональные исследования позволили объединить mAb в определенные классы, распознающие отличающиеся эпитопы в основных антигенных сайтах на SRBD. Электронно-микроскопические исследования выявили, что эти mAb распознают отличающиеся конформационные состояния тримерного S-белка. Сильные нейтрализующие mAb, распознающие уникальные сайты, COV2-2196 и COV2-2130, одновременно связываются с S-белком и синергически нейтрализуют аутентичный вирус SARS-CoV-2. На двух мышинных моделях инфекции SARS-CoV-2 пассивный перенос одного из COV2-2916 или COV2-2130 отдельно или комбинации обоих mAb защищал мышей от тяжелой потери веса и уменьшал вирусную нагрузку и воспаление в легких. Эти результаты идентифицируют защитные эпитопы на SRBD и обеспечивают структурную основу для рационального конструирования вакцин и

отбора надежных иммунотерапевтических смесей.

S-белок SARS-CoV-2 представляет собой молекулярную детерминанту прикрепления, слияния и проникновения вируса в клетки-хозяева³. Определенная с помощью криоэлектронной микроскопии структура стабилизированного в конформации до слияния тримерного эктодомена S-белка (S2Pecto) для SARS-CoV-2, выявила особенности, сходные со структурой S-белка SARS-CoV⁴. Этот интегральный мембранный белок I типа и белок слияния I класса имеет N-концевую субъединицу (S1), которая опосредует связывание с рецептором, и С-концевую субъединицу (S2), которая опосредует слияние вируса с клеточной мембраной. Субъединица S1 содержит N-концевой домен (SNTD) и рецептор-связывающий домен (SRBD). Оба SARS-CoV-2 и SARS-CoV, геномы которых характеризуются примерно 78% идентичностью последовательности¹, используют ангиотензинпревращающий фермент 2 человека (hACE2) в качестве рецептора проникновения⁵⁻⁷. Предыдущие исследования иммунитета человека к другим высокопатогенным зоонозным бета-коронавирусам, включая SARS-CoV⁸⁻¹² и ближневосточный респираторный синдром (MERS)¹³⁻²², показали, что Ab к вирусному поверхностному шиповидному (S) гликопротеину опосредуют защитный иммунитет. Наиболее активные mAb, специфические в отношении S-белка, по-видимому, нейтрализуют бета-коронавирусы, блокируя прикрепление вируса к клеткам-хозяевам путем связывания с областью SRBD, которая напрямую опосредует взаимодействие с рецептором. Вполне вероятно, что человеческие Ab перспективны для применения с целью модификации заболевания во время инфекции SARS-CoV-2, при использовании для профилактики, профилактики после заражения или лечения инфекции SARS-CoV-2²³. Многие исследования, в том числе рандомизированные контролируемые испытания по оценке реконвалесцентной плазмы крови и одно испытание по оценке гипериммунного иммуноглобулина, продолжаются, но пока еще неясно, могут ли такие методы лечения снизить заболеваемость или смертность²⁴.

Мы выделили большую панель mAb, реактивных в отношении S-белка SARS-CoV-2, из В-клеток двух человек, которые ранее были инфицированы SARS-CoV-2 в Ухане, Китай²⁵. Подмножество этих антител связывалось с рецептор-связывающим доменом S-белка (SRBD) и проявляло нейтрализующую активность в скрининговом экспресс-анализе с использованием аутентичного SARS-CoV-2²⁵. В данном документе мы определили антигенный ландшафт SARS-CoV-2 и определили, какие сайты SRBD являются мишенью защитных mAb. Мы протестировали панель из 40 mAb человека к S-белку, предварительно отобранных нами с помощью скринингового экспресс-анализа нейтрализации, в

количественной реакции нейтрализации с подавлением фокусообразования (FRNT) со штаммом WA1/2020 SARS-CoV-2. Эти анализы выявили, что панель демонстрирует диапазон значений полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) от 15 до более 4000 нг/мл (представлены в виде тепловой карты на ФИГ. 20а, значения показаны в таблице В, а полные кривые показаны на ФИГ. 24). Мы предположили, что многие из этих SRBD-реактивных mAb нейтрализуют вирусную инфекцию, блокируя связывание SRBD с hACE2. Действительно, большинство протестированных нами нейтрализующих mAb непосредственно ингибировали взаимодействие hACE2 с тримерным S-белком (ФИГ. 20а, ФИГ. 25). В соответствии с данными результатами эти mAb также прочно связывались с тримерным эктодоменом S-белка (S2Pecto) или мономерным SRBD (ФИГ. 20а, ФИГ. 26). Мы оценивали, может ли эффективность связывания S2Pecto или SRBD или блокирования hACE2 независимо прогнозировать эффективность нейтрализации связывания, но ни одно из этих измерений не коррелировало с эффективностью нейтрализации (ФИГ. 20b-d). Однако каждое из mAb с самым высоким титром нейтрализующей активности (IC₅₀ < 150 нг/мл) также выявило самую сильную блокирующую активность в отношении hACE2 (IC₅₀ < 150 нг/мл) и исключительную активность связывания (EC₅₀ < 2 нг/мл) с тримером S2Pecto и SRBD (ФИГ. 20е). Репрезентативные кривые нейтрализации для двух активных нейтрализующих mAb, обозначенных COV2-2196 и COV2-2130, показаны на (ФИГ. 20f). Активную нейтрализацию подтвердили с использованием анализов нейтрализации псевдовирюсов, которые выявили гораздо более чувствительные фенотипы нейтрализации, чем вирус *wt*, и продемонстрировали необходимость применения анализов живых вирусов для оценки эффективности mAb (ФИГ. 20g). Оба этих mAb прочно связывались с тримером S2Pecto и полностью блокировали связывание hACE2 (ФИГ. 20h-i).

Затем мы определили основные антигенные сайты на SRBD для нейтрализующих mAb с помощью анализа конкурентного связывания. Сначала мы использовали конкурентный анализ на основе биослойной интерферометрии с минимальным доменом SRBD для скрининга в отношении mAb, которые конкурировали за связывание с активным нейтрализующим mAb COV2-2196 или рекомбинантной версией ранее описанного mAb к SARS-CoV CR3022, которое распознает консервативный криптический эпитоп^{10,26}. Мы идентифицировали три основные группы конкурирующих mAb (ФИГ. 21а). Самая большая группа mAb блокировала COV2-2196, но не rCR3022, в то время как некоторые mAb блокировали rCR3022, но не COV2-2196. Два mAb, включая COV2-2130, не блокировались ни одним из эталонных mAb. Большинство mAb конкурировали с hACE2 за связывание,

что свидетельствует о том, что они связывались вблизи сайта связывания hACE2 в SRBD. Мы использовали COV2-2196, COV2-2130 и rCR3022 в анализе конкурентного связывания на основе ELISA с тримерным белком S2Pecto и также обнаружили, что SRBD содержал три основных антигенных сайта, при этом некоторые mAb, вероятно, устанавливают контакты в более чем в одном сайте (ФИГ. 21b). Большинство активных нейтрализующих mAb напрямую конкурировали за связывание с COV2-2196.

Поскольку COV2-2196 и COV2-2130 не конкурировали за связывание с SRBD, мы оценивали синергизм этих mAb в отношении нейтрализации вируса, явление, ранее наблюдавшееся для mAb к SARS-CoV¹⁰. Мы протестировали ответы на комбинацию (см. матрицу нейтрализации доза-ответ, ФИГ. 21c) в FRNT с использованием SARS-CoV-2 и сравнивали эти экспериментальные значения с ожидаемыми ответами, рассчитанными с помощью моделей оценки синергизма²⁷. Сравнение выявило, что комбинация COV2-2196 + COV2-2130 была синергической (с показателем синергизма, составляющим 17,4, где любой показатель >10 указывает на синергизм). Данные на ФИГ. 21c показывают матрицу синергизма доза-ответ и демонстрируют, что комбинированная доза mAb, составляющая 79 нг/мл в смеси (16 нг/мл COV2-2196 и 63 нг/мл COV2-2130) обладала такой же активностью, что и 250 нг/мл каждого отдельного mAb (см. ФИГ. 21c). Это результаты показывают, что при использовании смеси допускается снижение дозы каждого mAb в более чем три раза для достижения той же эффективности нейтрализации вируса *in vitro*.

Затем мы определили эпитопы, распознаваемые репрезентативными mAb в двух основных группах конкурентного связывания, которые действуют синергично в отношении нейтрализации. Мы провели исследования мутагенеза SRBD с использованием аланиновых или аргининовых замен, чтобы определить критически важные остатки для связывания нейтрализующих mAb (ФИГ. 27). Исследования потери связывания выявили F486A или N487A как критически важные остатки для COV2-2196 и N487A как критически важный остаток для COV2-2165, которые конкурируют друг с другом за связывание, и подобным образом исследования мутагенеза для COV2-2130 с использованием мутантов K444A и G447R определили эти остатки как критически важные для распознавания (ФИГ. 22a). Предыдущие структурные исследования определили взаимодействие между SRBD и hACE2 (ФИГ. 22b)²⁸. Большинство взаимодействующих остатков в SRBD содержится в пределах линейного пептида из 60 аминокислот, который определяет мотив распознавания hACE2 (ФИГ. 22c). Затем мы протестировали связывание человеческих mAb с этим минимальным пептидом и обнаружили, что активные нейтрализующие представители самой большой группы конкурентного связывания, включая COV2-2196, COV2-2165 и

COV2-2832, распознают этот пептид (ФИГ. 22с), что свидетельствует о том, что эти mAb создают критически важные контакты в пределах мотива распознавания hACE2.

Мы использовали электронную микроскопию с негативным окрашиванием комплексов тример S2Pecto/Fab для структурного определения эпитопов для этих mAb. Активные нейтрализующие антитела COV2-2196 и COV2-2165 связывались с мотивом распознавания hACE2 в SRBD и распознавали 'открытое' конформационное состояние тримера S2Pecto (ФИГ. 22d). Однако способ взаимодействия этих двух антител отличался, поскольку положение связывания и угол относительно 'тела' шиповидного белка для одного отличались по сравнению с другим. COV2-2130, который представляет вторую группу конкурентного связывания, связан с RBD в тримере S2Pecto в 'закрытом' положении (ФИГ. 22d). Поскольку COV2-2196 и COV2-2130 не конкурировали за связывание, мы попытались получить комплексы обоих Fab, связанных одновременно с тримером S2Pecto. Мы обнаружили, что оба Fab связывались одновременно, когда тример S2Pecto находился в открытом положении, что указывает на то, что COV2-2130 может распознавать SRBD в обеих конформациях (ФИГ. 22е). Накладывая комплекс с двумя Fab на структуру комплекса RBD:CR3022²⁶, мы обнаружили, что эти антитела связываются с тремя отличающимися сайтами на SRBD, как и было предсказано на основании наших исследований конкурентного связывания (ФИГ. 22f).

Затем мы протестировали профилактическую эффективность монотерапии COV2-2196 или COV2-2130 или комбинации COV2-2196 + COV2-2130 на недавно разработанной модели инфекции SARS-CoV-2 у мышей BALB/c, у которых hACE2 экспрессируется в легком после интраназальной трансдукции аденовируса (AdV-hACE2). При этой относительно строгой модели заболевания мы также вводили однократную дозу антитела к Ifnar1 для усиления вирусной инфекции и патогенеза, что приводит к диссеминированной интерстициальной пневмонии (А. Hassan и М. Diamond, подано для публикации). Мы пассивно переносили одну дозу mAb COV2-2196 (10 мг/кг), COV2-2130 (10 мг/кг), комбинацию COV2-2196 + COV2-2130 (по 5 мг/кг каждого) или mAb изотипического контроля (10 мг/кг) мышам, трансдуцированным AdV-hACE2, за один день до интраназального контрольного заражения с помощью 4×10^5 БОЕ SARS-CoV-2. Профилактика с помощью COV2-2196 или COV2-2130 или их комбинации предотвратила тяжелую потерю веса, вызванную SARS-CoV-2, в течение первой недели инфекции (ФИГ. 23а). Уровни вирусной РНК были значительно снижены на 7 dpi в легких и отдаленных участках, включая сердце и селезенку (ФИГ. 23b). Экспрессия генов цитокинов интерферона-гамма (INF-g), IL-6, CXCL10 и CCL2 и хемокинов, которые являются

индикаторами воспаления, также была снижена в легких обработанных мышей на 7 dpi – пик заболевания (ФИГ. 23с).

Мы также протестировали COV2-2196 или COV2-2130 или их комбинацию в отношении профилактической эффективности на иммунокомпетентной модели с использованием адаптированного для мышей (MA) вируса SARS-CoV-2²⁹ (ФИГ. 23d). Тесты *in vitro* показали, что значения IC50 для нейтрализации были сопоставимы для вирусов SARS-CoV-2 *wt* и MA для этих mAb (данные не показаны). Каждая из обработок mAb, введенным в дозе 200 мкг/мышь (~8 мг/кг), снижала уровни вирусной РНК вплоть до 10⁵ раз на 2 dpi в легких по сравнению с группой изотипического контроля (ФИГ. 23е, слева). Соответственно, все животные из группы обработки COV2-2196 и COV2-2196 + COV2-2130 и 8 из 10 животных из группы обработки COV2-2130 больше не имели инфекционного вируса в легких на 2 dpi, как измерено по титру бляшкообразования в легочной ткани (ФИГ. 23е, справа). В совокупности эти результаты на мышах свидетельствуют о том, что COV2-2196 или COV2-2130 по отдельности или в комбинации являются многообещающими кандидатами для лечения или предупреждения COVID-19.

В данном документе мы определили антигенный ландшафт для большой панели высокоактивных mAb к SARS-CoV-2. Эти подробные исследования и скрининговые исследования, в ходе которых была идентифицирована данная панель mAb из более крупной панели из сотен²⁵, демонстрируют, что, хотя при естественном заражении SARS-CoV-2 производятся различные нейтрализующие человеческие антитела, при этом только небольшое подмножество этих mAb обладает высокой эффективностью (IC50 < 50 нг/мл против живого вируса SARS-CoV-2) и, следовательно, подходит для терапевтической разработки. Биохимический и структурный анализ этих активных mAb определил три основных антигенных сайта уязвимости к нейтрализации под действием человеческих mAb, вырабатываемых при естественной инфекции с SARS-CoV на SRBD. Было показано, что репрезентативные mAb для двух наиболее активных антигенных сайтов проявляют синергизм *in vitro* и защищают в виде смеси *in vivo*. Эти результаты выявляют критически важные особенности эффективного гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 и свидетельствуют о том, что роль синергической нейтрализующей активности в поликлональных ответах следует изучить дополнительно. Более того, поскольку SARS-CoV-2 продолжает циркулировать, популяционный иммунитет, вызванный естественной инфекцией, может начать выбирать антигенные варианты, которые ускользают от селективного давления нейтрализующих антител, что усиливает необходимость нацеливания на несколько эпитопов S-белка в вакцинах или иммунотерапевтических

препаратах.

Распространенные во всем мире варианты гена S-белка, о которых сообщалось к настоящему времени, располагаются в положениях D614G, V483A, L5F, Q675H, H655Y и S939F30, далеко от аминокислотных вариантов в остатках 486 или 487, идентифицированных в наших мутационных исследованиях для ведущих mAb, изученных в данном документе. Рационально подобранные терапевтические смеси, подобные описанным в данном документе, могли бы обеспечить еще большую устойчивость к ускользанию SARS-CoV-2. Эти исследования подготовили почву для доклинической оценки и разработки идентифицированных mAb в качестве кандидатов для применения в качестве иммунотерапевтических средств против COVID-19 у человека.

Доступность данных. Полученные с помощью электронной микроскопии карты были депонированы в Банке данных электронной микроскопии с кодами доступа EMBD 21965 (S2Pecto apo), EMD-21974 (S2Pecto + Fab COVs-2165), EMD-21975 (S2Pecto + Fab COVs-2196), EMD-21976 (S2Pecto + Fab COVs-2130) и EMD-21977 (S2Pecto + Fab COV2-2196 + Fab COV2-2130). Материалы, представленные в этом исследовании, будут доступны, но может потребоваться заключение Соглашения о передаче материалов.

Благодарности. Мы благодарим Angela Jones и персонал основной лаборатории Vanderbilt VANTAGE за ускоренное секвенирование, Ross Trosseth за помощь в организации данных и анализе, Robin Bombardi и Cinque Soto из VUMC за техническую консультацию по подходам к геномике, Arthur Kim, Adam Bailey, Laura VanBlargan, James Earnest, Broc McCune и Swathi Shrihari из WUSTL за помощь в проведении экспериментов и ключевые реагенты, а также Kevin M. Tuffy, Seme Diallo, Patrick M. McTamney и Lori Clarke из AstraZeneca за создание белковых и псевдовиральных реагентов и соответствующие данные. Данное исследование было поддержано грантами Агентства перспективных исследовательских проектов Министерства обороны (DARPA) HR0011-18-2-0001 и HR00 11-18-3-0001, контрактами NIH 75N93019C00074 и 75N93019C00062 и Исследовательским фондом Dolly Parton COVID-19 в Вандербильте. Данная работа была поддержана грантом NIH 1S10RR028106-01A1 для секвенатора нуклеиновых кислот нового поколения, размещенным в Vanderbilt Technologies for Advanced Genomics (VANTAGE) и Институте клинических и трансляционных исследований Вандербильта при поддержке гранта (UL1TR002243 от NCATS/NIH). S.J.Z. был поддержан NIH T32 AI095202. J.B.C. поддерживается стипендией для постдокторанта от Фонда Helen Hay Whitney. D.R.M. был поддержан NIH T32 AI007151 и премией фонда Burroughs Wellcome за программу повышения квалификации постдокторантов. J.E.C. является лауреатом премии Future

Insight Prize 2019 от Merck KGaA, Дармштадт, Германия, которая поддержала данное исследование исследовательским грантом. Содержание является исключительной ответственностью авторов и не обязательно отражает официальную точку зрения правительства США или других спонсоров.

Вклады авторов. Идея проекта: S.J.Z., P.G., R.H.C., L.B.T., M.S.D., J.E.C.; Получение финансирования: J.E.C. и M.S.D. Проведение лабораторных экспериментов: S.J.Z., P.G., J.B.C., E.B., R.E.C., J.X.R., A.T., R.S.N., R.E.S., N.S., L.E.W., A.O.H., N.M.K., E.W., J.M.F., L.B.T., J.J.S., K.R., Y.-M.L., A.S., L.E.G., D.R.M.; Выполнение вычислительной работы: E.C.C., T.J., S.D., L.M.; Наблюдение за исследованием: N.L.K., M.S.D., L.B.T., R.S.B., R.H.C., J.E.C. Написание первого черновика статьи: S.J.Z., P.G., R.H.C., J.E.C.; Все авторы рассмотрели и одобрили окончательный вариант рукописи.

Конфликт интересов. R.S.B. работал на должности консультанта Takeda и Sanofi Pasteur по вопросам, связанным с вакцинами. M.S.D. является консультантом Inbios, Vir Biotechnology, NGM Biopharmaceuticals, Eli Lilly и входит в Научный консультативный совет Moderna, в прошлом получил несвязанный исследовательский грант от Moderna и в настоящее время получает несвязанный исследовательский грант Emergent BioSolutions. J.E.C. работал на должности консультанта Sanofi и входит в состав научных консультативных советов компаний CompuVax и Meissa Vaccines, является получателем предыдущих несвязанных исследовательских грантов от Moderna и Sanofi и является основателем IDBiologics, Inc. Университет Вандербильта подал заявку на получение патентов, касающихся антител к SARS-CoV-2, которые имеют отношение к этой работе. AstraZeneca подала патенты в отношении материалов/результатов, связанные с данной работой. J.J.S., K.R., Y.-M.L. и N.L.K. являются сотрудниками AstraZeneca и в настоящее время владеют акциями или опционами на акции AstraZeneca. Все остальные авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительная информация

Дополнительная информация доступна для этого документа.

Корреспонденцию и запросы на материалы следует направлять J.E.C.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Zhou, P., *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270-273 (2020).
2. Zhu, N., *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**, 727-733 (2020).
3. Pillay, T.S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike

- protein. *J Clin Pathol* (2020).
4. Wrapp, D., *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **367**, 1260-1263 (2020).
 5. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R.S. & Li, F. Receptor recognition by the novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol* **94**(2020).
 6. Hoffmann, M., *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **181**, 271-280 e278 (2020).
 7. Li, W., *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450-454 (2003).
 8. Sui, J., *et al.* Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2536-2541 (2004).
 9. ter Meulen, J., *et al.* Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet* **363**, 2139-2141 (2004).
 10. ter Meulen, J., *et al.* Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants. *PLoS Med* **3**, e237 (2006).
 11. Zhu, Z., *et al.* Potent cross-reactive neutralization of SARS coronavirus isolates by human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12123-12128 (2007).
 12. Rockx, B., *et al.* Structural basis for potent cross-neutralizing human monoclonal antibody protection against lethal human and zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus challenge. *J Virol* **82**, 3220-3235 (2008).
 13. Chen, Z., *et al.* Human neutralizing monoclonal antibody inhibition of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in the common marmoset. *J Infect Dis* **215**, 1807-1815 (2017).
 14. Choi, J.H., *et al.* Characterization of a human monoclonal antibody generated from a B-cell specific for a prefusion-stabilized spike protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS One* **15**, e0232757 (2020).
 15. Niu, P., *et al.* Ultrapotent human neutralizing antibody repertoires against Middle East respiratory syndrome coronavirus from a recovered patient. *J Infect Dis* **218**, 1249-1260 (2018).
 16. Wang, L., *et al.* Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape. *J Virol* **92**(2018).

17. Wang, N., *et al.* Structural definition of a neutralization-sensitive epitope on the MERS-CoV S1-NTD. *Cell Rep* **28**, 3395-3405 e3396 (2019).
18. Zhang, S., *et al.* Structural definition of a unique neutralization epitope on the receptor-binding domain of MERS-CoV spike glycoprotein. *Cell Rep* **24**, 441-452 (2018).
19. Corti, D., *et al.* Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10473-10478 (2015).
20. Jiang, L., *et al.* Potent neutralization of MERS-CoV by human neutralizing monoclonal antibodies to the viral spike glycoprotein. *Sci Transl Med* **6**, 234ra259 (2014).
21. Tang, X.C., *et al.* Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E2018-2026 (2014).
22. Ying, T., *et al.* Exceptionally potent neutralization of Middle East respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies. *J Virol* **88**, 7796-7805 (2014).
23. Jiang, S., Hillyer, C. & Du, L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol* **41**, 355-359 (2020).
24. Valk, S.J., *et al.* Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a rapid review. *Cochrane Database Syst Rev* **5**, CD013600 (2020).
25. Zost, S.J., *et al.* Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *bioRxiv*, 2020.2005.2012.091462 (2020).
26. Yuan, M., *et al.* A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* **368**, 630-633 (2020).
27. Ianevski, A., He, L., Aittokallio, T. & Tang, J. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data. *Bioinformatics* **33**, 2413-2415 (2017).
28. Lan, J., *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **581**, 215-220 (2020).
29. Dinno, K.H., *et al.* A mouse-adapted SARS-CoV-2 model for the evaluation of COVID-19 medical countermeasures. *bioRxiv*, 2020.2005.2006.081497 (2020).
30. Laha, S., *et al.* Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. *bioRxiv*, 2020.2005.2003.066266 (2020).

Таблица В. Значения IC50 нейтрализации, IC50 блокирования hACE2 и EC50 для панели mAb при связывании с антигенами S2Pecto или SRBD

MAb	IC50 нейтрализации, нг/мл	hACE2 IC50 блокирования, нг/мл	EC50 связывания S2Pecto, нг/мл	EC50 связывания SRBD, нг/мл	EC50 связывания S2Pecto SARS-CoV, нг/мл
COV2-2094	154	53	1,8	1,4	11,7
COV2-2096	59	67	1,0	1,0	—
COV2-2130	107	61	1,5	0,7	—
COV2-2165	332	62	1,4	0,6	—
COV2-2196	15	48	1,2	1,1	—
COV2-3025	37	41	1,1	1,1	—

rCR3022	—	—	10,2	1,1	5,2
r2D22	—	—	—	—	—

Таблица С. Краткое изложение набора данных электронной микроскопии и статистических данных по белку S2Pecto SARS-CoV-2 аро или в комплексе с Fab человека

		Структура белка S2Pecto SARS-CoV-2 в комплексе с указанным Fab				
		Без Fab*	Fab COV2-2165	Fab COV2-2196	Fab COV2-2130	Fab COV2-2196 + Fab COV2-2130
	№ EMDB:	EMD-21965	EMD-21974	EMD-21975	EMD-21976	EMD-21977
Настройка микроскопа	Микроскоп	TF-20	TF-20	TF-20	TF-20	TF-20
	Напряжение (кВ)	200	200	200	200	200
	Детектор	US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD
	Увеличение	50000х	50000х	50000х	50000х	50000х
	Размер пикселя	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18
	Выдержка (e-/Å ²)	25	25	25	30	38
	Диапазон дефо- кусировки (мкм)	1,5-1,8	1,5-1,8	1,5-1,8	1,5-1,8	1,5-1,8
Данные	Число микрофотографий	122	83	190	550	466
	Число частиц	3,836	3,705	5,471	10,000	9,434
	Число частиц после 2D	2,718	1,868	3,595	2,684	4,231
	Конечное число частиц	2,188	1,057	2,737	1,385	3,018
	Симметрия	C1	C1	C1	C1	C1
Модель докинга	CoV-2-S CC	PDB: 6VXX 0.895	PDB: 6VYB 0.836	PDB: 6VYB 0.828	PDB: 6VXX 0.900	PDB: 6VYB 0.8952
	Fab (PDB: 12E8) CC	n.a.	0,916	0,905	0,91	0,8648 / 0,8929

* Ранее описаны в Zost *et al.*, 2020 (ссылка 25).

Методы

Антитела. Человеческие антитела, изученные в этой статье, выделяли из образцов крови двух субъектов в Северной Америке с подтвержденной ранее лабораторными методами симптоматической инфекцией SARS-CoV-2, которая была приобретена в Китае. Первоначальные клинические исследования для получения образцов после письменного информированного согласия описывались ранее¹ и были одобрены Институциональным наблюдательным советом Медицинского центра Университета Вандербильта и Советом по этике исследований Университета Торонто. Субъекты (56-летний мужчина и 56-летняя женщина) являются супружеской парой и жителями города Ухань, Китай, которые отправились в путешествие в Торонто, Канада, где РВМС получали с помощью лейкофереза через 50 дней после появления симптомов. Антитела выделяли с использованием различных инструментов для выделения и клонирования одиночных антиген-специфических В-клеток и генов вариабельных доменов антител, кодирующих моноклональные антитела¹.

Культура клеток. Vero E6 (CRL-1586, Американская коллекция типовых культур (Американская коллекция типовых культур, ATCC), Vero CCL81 (ATCC), HEK293 (ATCC) и HEK293T (ATCC) поддерживали при 37°C в 5% CO₂ в минимальной питательной среде Дульбекко (DMEM), содержащей 10% (об./об.) термоинаktivированной фетальной бычьей сыворотки (FBS), 10 мМ HEPES, pH 7,3, 1 мМ пирувата натрия, 1× заменимых аминокислот и 100 ед./мл пенициллина-стрептомицина. Клетки Vero-фуриг получили от T. Pierson (NIH), и они были описаны ранее². Клетки Expi293F (ThermoFisher Scientific, A1452) поддерживали при 37°C в 8% CO₂ в среде для экспрессии Expi293F (ThermoFisher Scientific, A1435102). Клетки ExpiCHO (ThermoFisher Scientific, A29127) поддерживали при 37°C в 8% CO₂ в среде для экспрессии ExpiCHO (ThermoFisher Scientific, A2910002). Тестирование культур Expi293F и ExpiCHO на микоплазму проводили ежемесячно с использованием набора для обнаружения микоплазмы на основе ПЦР (ATCC, 30-1012K).

Вирусы. Штамм n-CoV/USA_WA1/2020 SARS-CoV-2 2019 получили из Центров по контролю и профилактике заболеваний (безвозмездно предоставлен Natalie Thornburg). Вирус пассировали в клетках Vero CCL81 и титровали с помощью анализа бляшкообразования на клетках Vero E6. Вся работа с инфекционным SARS-CoV-2 была одобрена Институциональными комитетами по биобезопасности Медицинского колледжа университета Вашингтона или Университета Северной Каролины в Чапел-Хилл, и ее проводили в одобренных учреждениях BSL3 с использованием соответствующих респираторов для очистки воздуха с электроприводом и средств индивидуальной защиты.

Рекомбинантные антигены и белки. Ген, кодирующий эктодомен стабилизированного

в конформации до слияния шиповидного белка SARS-CoV-2 (S2Pecto), синтезировали и клонировали в плазмидный вектор экспрессии на основе ДНК для клеток млекопитающих. Ранее сообщалось об аналогичным образом сконструированном антигене S-белка с двумя пролинами и удалением сайта расщепления фурином для стабилизации формы S-белка до слияния³. Вкратце, этот ген включает эктодомен SARS-CoV-2 (до остатка 1208), домен тримеризации фибритина Т4, сайт-специфическую последовательность биотинилирования AviTag и С-концевую 8х-His-метку. Чтобы стабилизировать конструкцию в конформации до слияния, мы включили замены K986P и V987P и мутировали сайт расщепления фурином по остаткам 682-685 с RRAR на ASVG. Этот рекомбинантный шиповидный 2Р-стабилизированный белок (обозначенный в данном документе как S2Pecto) выделили с помощью металл-аффинной хроматографии на колонках HisTrap Excel (GE Healthcare) и препараты белка дополнительно очищали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке Superose 6 Increase 10/300 (GE Healthcare). Присутствие тримерного S-белка в конформации до слияния подтверждали с помощью электронной микроскопии с негативным окрашиванием¹. Для электронной микроскопии с S-белком и Fab мы экспрессировали вариант S2Pecto без AviTag, но содержащий С-концевую Twin-Strep-метку, аналогично описанному ранее³. Экспрессированный белок выделяли с помощью металл-аффинной хроматографии на колонках HisTrap Excel (GE Healthcare) с последующей дополнительной очисткой на колонке StrepTrap HP (GE Healthcare) и эксклюзионной хроматографией на TSKgel G4000SW XL (TOSOH). Для экспрессии субдомена SRBD S-белка SARS-CoV-2 остатки 319-541 клонировали в вектор экспрессии для клеток млекопитающих ниже сигнального пептида IL-2 и выше сайта расщепления тромбином, AviTag и 6х-His-метки. Белок RBD, слитый с Fc-доменом IgG1 мыши (обозначенный RBD-mFc), приобретен у Sino Biological (40592-V05H). Для картирования эпитопов с помощью аланинового сканирования варианты RBD SARS-CoV-2 (остатки 334-526) или варианты RBD с одиночной мутацией клонировали с N-концевой лидерной последовательностью CD33 и С-концевым линкером GSSG, AviTag, линкером GSSG и 8хHis-меткой. Шиповидные белки экспрессировали в клетках FreeStyle 293 (Thermo Fisher) и выделяли с помощью аффинной хроматографии с использованием колонки HisTrap (GE Healthcare) с последующей эксклюзионной хроматографией с колонкой Superdex200 (GE Healthcare). Очищенные белки анализировали с помощью SDS-PAGE для гарантирования чистоты и соответствующей молекулярной массы.

Подготовка сетки для окрашивания, визуализация и обработка белка S2Pecto SARS-CoV-2 или комплексов S2Pecto/Fab при электронной микроскопии (ЭМ). Для выполнения ЭМ-визуализации Fab получали путем расщепления рекомбинантных

хроматографически очищенных IgG с использованием фермента цистеиновой протеазы, иммобилизованной на смоле (FabALACTICA, Genovis). Расщепление происходило в 100 mM фосфата натрия, 150 mM NaCl, pH 7,2, в течение ~16 часов при RT. Чтобы удалить расщепленный Fc и интактный IgG, подвергнутую расщеплению смесь инкубировали со смолой для Fc CaptureSelect (Genovis) в течение 30 мин при RT в PBS-буфере. При необходимости проводили замену буфера у Fab на Tris-буфер путем центрифугирования на спин-колонке Zeba (Thermo Scientific).

Для скрининга и визуализации негативно окрашенного (NS) белка S2Pecto SARS-CoV-2 в комплексе с Fab человека белки инкубировали в течение ~1 часа и примерно 3 мкл образца в концентрациях, составляющих приблизительно 10-15 мкг/мл наносили на сетку тлеющего разряда с непрерывной углеродной пленкой на медных ЭМ-сетках из 400 квадратных ячеек (Electron Microscopy Sciences). Сетки окрашивали 0,75% раствором уранилформиата (UF)⁴. Изображения записывали на ПЗС-камеру Gatan US4000 4k × 4k с использованием просвечивающего электронного микроскопа FEI TF20 (TFS), работающего при 200 кэВ и управляемого с помощью SerialEM⁵. Все изображения получали при 50000-кратном увеличении с размером пикселя 2,18 Å/пиксель в режиме низкой дозы при расфокусировке от 1,5 до 1,8 мкм. Суммарная доза для микрофотографий составляла ~25-38 е-/Å². Обработку изображений проводили с использованием пакета программ cryoSPARC⁶. Изображения импортировали и частицы оценивали с CTF. Затем изображения очищали от шума и отбирали с помощью Topaz⁷. Частицы извлекали с размером окна 256 пикселей и группировали по 128 пикселей. Рассчитывали средние значения 2D-класса, и хорошие классы отбирали для модели *ab-initio* и уточнения без симметрии. Для ЭМ-модели докинга белка S2Pecto SARS-CoV-2 использовали закрытую модель (PDB: 6VXX) в Chimera⁸ для докинга с ЭМ-картой (подробности см. также в таблице С). Для комплексов S2Pecto SARS-CoV-2/Fab COV2-2165 и S2Pecto SARS-CoV-2/Fab COV2-2165 использовали открытую модель SARS-CoV-2 (PDB: 6VYB) и Fab (Fab: 12E8) в Chimera для докинга с ЭМ-картами (подробности см. также в таблице С). Для комплекса S2Pecto SARS-Cov-2/Fab COV2-2130 использовали закрытую модель и Fab (PDB: 12E8) в Chimera для докинга с ЭМ-картой (подробности см. также в таблице С). Все изображения выполнены с помощью Chimera.

Получение и очистка mAb. Последовательности mAb, которые были синтезированы (Twist Bioscience) и клонированы в моноцистронный вектор экспрессии IgG1 (обозначенный как pTwist-mCis_G1), использовали для секреции mAb в культуре клеток млекопитающих. Этот вектор содержит улучшенную последовательность 2A и линкер GSG, что обеспечивает одновременную экспрессию генов тяжелой и легкой цепей mAb из одной конструкции после трансфекции⁹. Мы ранее описали экспрессию mAb в

микромасштабе в 1 мл культур ExpiCHO в 96-луночных планшетах¹. Для более крупномасштабной экспрессии mAb мы выполнили трансфекцию (от 1 до 300 мл на антитело) культур клеток CHO с использованием системы экспрессии Gibco™ ExpiCHO™ и протокола для мини-биореакторных пробирок объемом 50 мл (Corning), описанного поставщиком. Супернатанты культур очищали с использованием HiTrap MabSelect SuRe (Cytiva, ранее GE Healthcare Life Sciences) на 24-колоночной системе параллельной хроматографии белков (Protein BioSolutions). В очищенных mAb проводили замену буфера на PBS, концентрировали с использованием блоков центрифужных фильтров Amicon® Ultra-4 50 кДа (Millipore Sigma) и хранили при температуре 4°C до применения.

Анализы связывания на основе ELISA. Лунки 96-луночных планшетов для микротитрования покрывали очищенным рекомбинантным S-белком SARS-CoV-2 или белком SRBD SARS-CoV-2 при 4°C на протяжении ночи. Планшеты блокировали с помощью 2% обезжиренного сухого молока и 2% нормальной козьей сыворотки крови в DPBS, содержащем 0,05% Tween-20 (DPBS-T), в течение 1 часа. Связанные антитела обнаруживали с использованием козьего антитела к IgG человека, конъюгированного с HRP (пероксидазой хрена) (Southern Biotech), и субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (Thermo Fisher Scientific). Развитие окраски отслеживали, добавляли 1 н хлористоводородную кислоту для остановки реакции и измеряли поглощение при 450 нм с использованием спектрофотометра (Biotek). Для анализов доза-ответ серийные разведения очищенных mAb вносили в лунки в трех повторях, и обнаруживали связывание mAb, как подробно описано выше. Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) для связывания определяли с использованием программного обеспечения Prism версии 8.0 (GraphPad) после логарифмического преобразования концентрации mAb с использованием сигмоидального нелинейного регрессионного анализа доза-ответ.

ELISA связывания минимального пептида ACE2-связывающего мотива RBD. Лунки 384-луночных планшетов для микротитрования покрывали с помощью 1 мкг/мл стрептавидина при 4°C на протяжении ночи. Планшеты блокировали с помощью 0,5% BSA в DPBS, содержащем 0,05% Tween-20 (DPBS-T), в течение 1 часа. Планшеты промывали 4 раза с помощью 1х PBST и 2 мкг/мл биотинилированного пептида ACE2-связывающего мотива (кат. № LT5578, от LifeTein, LLC) добавляли для связывания стрептавидина в течение 1 часа при RT. Очищенные mAb разводили в блокирующем буфере, добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 часа при RT. Связанные антитела обнаруживали с использованием козьего антитела к IgG человека, конъюгированного с HRP (пероксидазой хрена) (кат. № 2014-05, Southern Biotech), и субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (ThermoFisher Scientific). Развитие окраски отслеживали, добавляли 1 н

хлористоводородную кислоту для остановки реакции и измеряли поглощение при 450 нм с использованием спектрофотометра (Biotek). Для анализов доза-ответ серийные 3-кратные разведения, начиная с концентрации 10 мкг/мл очищенных mAb, вносили в лунки в трех повторях, и обнаруживали связывание mAb, как подробно описано выше.

Анализ связывания антител с вариантными белками RBD с аланиновыми или аргининовыми точечными мутациями. Биослойную световую интерферометрию (BLI) проводили с использованием прибора Octet RED96 (ForteBio; Pall Life Sciences) и белка RBD дикого типа или мутантного белка RBD с изменением одной аминокислоты в определенных положениях на аланин или аргинин. Связывание белков RBD подтверждали вначале путем захвата содержащего окта-His-метку RBD дикого типа или мутантного белка из раствора с концентрацией 10 мкг/мл (≈ 200 нМ) на биосенсорах Penta-His в течение 300 с. Затем наконечники биосенсоров погружали в буфер для связывания (PBS/0,2% Tween 20) для промывки в течение 60 с, затем погружали в раствор, содержащий 150 нМ mAb, на 180 с (ассоциация), за которым следовало последующее погружение в буфер для связывания на 180 с (диссоциация). Ответ для каждого мутантного белка RBD нормализовали по ответу белка RBD дикого типа.

Реакции нейтрализации с подавлением фокусообразования (FRNT). Серийные разведения mAb инкубировали с 10^2 БОЕ SARS-CoV-2 в течение 1 часа при 37°C. Комплексы mAb–вирус добавляли к монослоям культуры клеток Vero E6 в 96-луночных планшетах на 1 час при 37°C. Впоследствии клетки перекрывали с помощью 1% (вес/об.) метилцеллюлозы в минимальной питательной среде (MEM) с добавлением 2% термоинактивированной FBS. Спустя 30 часов планшеты фиксировали путем удаления перекрытия и фиксировали с помощью 4% PFA в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре. Планшеты инкубировали последовательно с 1 мкг/мл антитела к S-белку, rCR3022¹⁰, и конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) козьего антитела к IgG человека в PBS с добавлением 0,1% (вес/об.) сапонины (Sigma) и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Фокусы инфицированных SARS-CoV-2 клеток визуализировали с использованием субстрата для пероксидазы TrueBlue (KPL) и определяли количественно на ImmunoSpot 5.0.37 Macro Analyzer (Cellular Technologies). Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Prism версии 8.0 (GraphPad).

Получение псевдотипированного S-белком лентивируса. Суспензионные клетки 293 высевали и трансфицировали лентивирусным вектором третьего поколения на основе ВИЧ, экспрессирующим люциферазу вместе с упаковывающими плазмидами, кодирующими следующее: шиповидный белок SARS-CoV-2 с делецией 19 аминокислот на C-конце, Rev

и Gag-pol. Среду заменяли через 16-20 часов после трансфекции, а супернатант, содержащий вирус, собирали спустя 24 часа. Клеточный дебрис удаляли с помощью низкоскоростного центрифугирования, а супернатант пропускали через фильтрующий блок с диаметром пор 0,45 мкм. Псевдовиром осаждали с помощью ультрацентрифугирования и ресуспендировали в PBS с получения исходного материала с 100-кратной концентрацией.

Анализ нейтрализации псевдовиром. Серийные разведения mAb готовили в 384-луночном планшете для микротитрования и предварительно инкубировали с псевдовиром в течение 30 минут при 37°C, к которым добавляли клетки 293, стабильно экспрессирующие ACE2 человека. Планшет возвращали в инкубатор при 37°C, а затем спустя 48 часов измеряли активность люциферазы на многорежимном планшет-ридере EnVision 2105 (Perkin Elmer) с использованием системы анализа на основе люциферазы Bright-Glo™ (Promega) в соответствии с рекомендациями производителя. Процент ингибирования рассчитывали относительно контроля с псевдовиром отдельно. Значения IC50 определяли методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Prism версии 8.1.0 (GraphPad). Среднее значение IC50 для каждого антитела определяли на основании минимум 3 независимых экспериментов.

Измерение синергической нейтрализации под действием комбинации антител. Синергизм определяли как более высокую нейтрализующую активность, опосредованную смесью из двух mAb, по сравнению с активностью, опосредованной отдельными mAb при той же общей концентрации антител *in vitro*. Чтобы оценить синергизм двух mAb в смеси для нейтрализации SARS-CoV-2, мы использовали ранее описанный подход для количественного определения синергизма¹¹. Чтобы оценить значимость положительного эффекта от комбинирования mAb, наблюдаемые ответы на комбинации (матрица доза-ответ) сравнивали с ожидаемыми ответами, рассчитанными с помощью моделей оценки синергизма¹¹. Нейтрализацию вируса измеряли в традиционном анализе реакции нейтрализации с подавлением фокусообразования (FRNT) с использованием SARS-CoV-2 дикого типа и монослоев культуры клеток Vero E6. Отдельные mAb COV2-2196 и COV2-2130 смешивали в разных концентрациях для оценки нейтрализующей активности различных соотношений mAb в смеси. В частности, каждое из семикратных разведений mAb COV2-2130 (начиная с 500 нг/мл) смешивали с каждым из девяти разведений mAb COV2-2196 (начиная с 500 нг/мл) в общем объеме 50 мкл на каждое условие, а затем инкубировали с 50 мкл живого SARS-CoV-2 в среде для культивирования клеток (среда RPMI-1640 с добавлением 2% FBS) перед нанесением на конфлюэнтные клетки Vero E6, выращенные в 96-луночных планшетах. Контрольные значения включали значения для определения зависимости доза-ответ для нейтрализующей активности, измеренной на

индивидуальной основе для отдельных mAb COV2-2196 или COV2-2130, которые оценивали при тех же дозах, что и в смеси. Каждое измерение проводили в двух повторах. Затем мы рассчитали процент нейтрализации вируса для каждого условия, а затем рассчитали значение показателя синергизма, которое определило взаимодействие между этими двумя mAb в смеси. Показатель синергизма, составляющая менее 10, указывает на антагонизм, показатель от -10 до 10 указывает на аддитивный эффект, а показатель выше 10 указывает на синергический эффект¹¹.

Количественное определение mAb. Количественное определение очищенных mAb проводили с помощью УФ-спектрофотометрии с использованием спектрофотометра NanoDrop с учетом коэффициента экстинкции IgG человека.

Анализ конкурентного связывания посредством биослойной интерферометрии. Биосенсоры захвата Fc IgG мыши (FortéBio 18-5089) на приборе для биослойной интерферометрии Octet HTX (FortéBio) пропитывали в течение 10 минут в 1x кинетическом буфере (Molecular Devices 18-1105) с последующим измерением исходного сигнала в течение 60 секунд. Рекомбинантный RBD SARS-CoV-2, слитый с IgG1 мыши (RBD-mFc, Sino Biological 40592-V05H), иммобилизовали на наконечниках биосенсора в течение 180 секунд. После стадии промывки в 1x кинетическом буфере в течение 30 секунд эталонное антитело (5 мкг/мл) инкубировали с содержащим антиген биосенсором в течение 600 секунд. Эталонные антитела включали человеческие mAb к SARS-CoV, CR3022 и COV2-2196. После стадии промывки в 1x кинетическом буфере в течение 30 секунд затем наконечники биосенсора погружали во второе антитело (5 мкг/мл) на 300 секунд. Максимальное связывание каждого антитела нормализовали по контролю, содержащему только буфер. Самостоятельную блокировку вычитали. Сравнение между максимальным сигналом каждого антитела использовали для определения процента связывания каждого антитела. Снижение максимального сигнала до <33% от неконкурирующего сигнала считалось полной конкуренцией за связывание со вторым антителом в присутствии эталонного антитела. Снижение максимального сигнала до уровня от 33 до 67% от неконкурирующего считалось промежуточной конкуренцией за связывание со вторым антителом в присутствии эталонного антитела. Процент связывания максимального сигнала >67% рассматривали как отсутствие конкуренции за связывание со вторым антителом в присутствии эталонного антитела.

Высокопроизводительный анализ ингибирования связывания ACE-2. Лунки 384-луночных планшетов для микротитрования покрывали очищенным рекомбинантным белком S2Pecto SARS-CoV-2 при 4°C на протяжении ночи. Планшеты блокировали с помощью 2% обезжиренного сухого молока и 2% нормальной козьей сыворотки крови в

DPBS-T в течение 1 часа. Очищенные mAb после экспрессии в микромасштабе двукратно разбавляли в блокирующем буфере, начиная с 10 мкг/мл в трех повторах, добавляли в лунки (20 мкл/лунка) и инкубировали в течение 1 часа при температуре окружающей среды. Рекомбинантный белок ACE2 человека с С-концевой FLAG-меткой добавляли в лунки при концентрации 2 мкг/мл в объеме 5 мкл/лунка (конечная концентрация ACE2 составляет 0,4 мкг/мл) без промывки антитела, а затем инкубировали в течение 40 мин при температуре окружающей среды. Планшеты промывали и связанный ACE2 обнаруживали с использованием конъюгированного с HRP антитела к FLAG (Sigma) и субстрата TMB. Связывание ACE2 без антитела служило в качестве контроля. Сигнал, полученный для связывания ACE2 в присутствии каждого разведения тестируемого антитела, выражали в процентах от связывания ACE2 без антитела после вычитания фонового сигнала. Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) для ингибирования связывания белка S2Pecto с ACE2 под действием mAb определяли после логарифмического преобразования концентрации антитела с использованием сигмоидального нелинейного регрессионного анализа доза-ответ (программное обеспечение Prism, GraphPad Prism версии 8.0).

Анализ блокирования ACE2 с использованием биосенсора биослойной интерферометрии. Биосенсоры к IgG мыши на приборе для биослойной интерферометрии Octet HTX (FortéBio) пропитывали в течение 10 минут в 1x кинетическом буфере с последующим измерением исходного сигнала в течение 60 секунд. Рекомбинантный RBD SARS-CoV-2, слитый с IgG1 мыши (RBD-mFc, Sino Biological 40592-V05H), иммобилизовали на наконечниках биосенсора в течение 180 секунд. После стадии промывки в 1x кинетическом буфере в течение 30 секунд антитело (5 мкг/мл) инкубировали с покрытым антигеном биосенсором в течение 600 секунд. После стадии промывки в 1x кинетическом буфере в течение 30 секунд затем наконечники биосенсора погружали в рецептор ACE2 (20 мкг/мл) (Sigma-Aldrich SAE0064) на 300 секунд. Максимальное связывание ACE2 нормализовали по контролю, содержащему только буфер. Процент связывания ACE2 в присутствии антитела сравнивали с максимальным связыванием ACE2. Снижение максимального сигнала до <30% считалось блокированием ACE2.

Высокопроизводительный анализ конкурентного связывания. Лунки 384-луночных планшетов для микротитрования покрывали очищенным рекомбинантным S-белком SARS-CoV-2 при 4°C на протяжении ночи. Планшеты блокировали с помощью 2% BSA в DPBS, содержащем 0,05% Tween-20 (DPBS-T), в течение 1 часа. Очищенные в микромасштабе немеченные mAb десятикратно разводили в блокирующем буфере, добавляли в лунки (20 мкл/лунка) в четырех повторах и инкубировали в течение 1 часа при температуре

окружающей среды. Биотинилированный препарат рекомбинантного mAb на основе последовательности гена вариабельных доменов ранее описанного mAb CR302212, а также недавно идентифицированных mAb COV2-2096, -2130 и -2196, которые распознают отличающиеся антигенные области S-белка SARS-CoV-2, добавляли в каждую из четырех лунок с соответствующим mAb в концентрации 2,5 мкг/мл в объеме 5 мкл/лунка (конечная концентрация биотинилированного mAb составляет 0,5 мкг/мл) без промывки немеченого антитела, а затем инкубировали в течение 1 часа при температуре окружающей среды. Планшеты промывали и связанные антитела обнаруживали с использованием конъюгированного с HRP авидина (Sigma) и субстрата TMB. Сигнал, полученный для связывания меченого биотином эталонного антитела в присутствии немеченого тестируемого антитела, выражали в процентах от связывания эталонного антитела отдельно после вычитания фонового сигнала. Тестируемые mAb считались конкурирующими, если их присутствие снижало связывание эталонного антитела до менее чем 41% от его максимального связывания, и не конкурирующими, если сигнал превышал 71%. Уровень 40–70% считался промежуточной конкуренцией.

Анализ связывания mAb с аланиновыми или аргининовыми мутантами RBD. Световую биослойную интерферометрию проводили с использованием прибора Octet RED96 (ForteBio; Pall Life Sciences). Связывание подтверждали вначале путем захвата содержащих окта-His-метку мутантов RBD с концентрацией 10 мкг/мл (≈ 200 нМ) на биосенсорах Penta-His в течение 300 с. Затем биосенсоры погружали в буфер для связывания (PBS/0,2% TWEEN 20) для промывки в течение 60 с, затем погружали в раствор, содержащий 150 нМ mAb, на 180 с (ассоциация), за которым следовало последующее погружение в буфер для связывания на 180 с (диссоциация). Ответ для каждого мутанта RBD нормализовали по ответу RBD дикого типа.

Эксперименты на мышах с использованием мышей, трансдуцированных *hACE2* человека. Исследования на животных проводили в соответствии с рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных Национального института здоровья. Протоколы были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных в Медицинском колледже университета Вашингтона (номер подтверждения A3381–01). Инокуляции вируса проводили под анестезией, которую индуцировали и поддерживали с помощью гидрохлорида кетамина и ксилазина, и предпринимали все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Мышей BALB/c приобрели в Jackson Laboratories (линия 000651). Самкам мышей (в возрасте 10–11 недель) вводили однократную внутрибрюшинную инъекцию, содержащую 2 мг mAb к *Ifnar1* (MAR1-5A3 13, Leinco), за один день до интраназального введения 2,5 х

10^8 BOE AdV-hACE2. Через пять дней после трансдукции AdV мышам инокулировали 4×10^5 BOE SARS-CoV-2 с помощью интраназального пути. mAb человека к SARS-CoV-2 или mAb изотипического контроля вводили за 24 часа до инокуляции SARS-CoV-2. Массу тела отслеживали ежедневно, и животных умерщвляли на день 5 или 7 после заражения и собирали ткани.

Измерение вирусной нагрузки. Ткани взвешивали и гомогенизировали с помощью гранул диоксида циркония в приборе MagNA Lyser (Roche Life Science) в 1 мл среды DMEM с добавлением 2% термоинактивированной FBS. Гомогенаты тканей осветляли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 5 мин и хранили при -80°C . РНК экстрагировали с использованием набора для выделения общей РНК MagMax mirVana (Thermo Scientific) и 96-луночного прибора для экстракции Kingfisher Flex (Thermo Scientific). Праймеры TaqMan разрабатывали для нацеливания на консервативную область гена N с использованием последовательности SARS-CoV-2 (MN908947) в качестве образца (праймер L: ATGCTGCAATCGTGCTACAA; праймер R: GACTGCCGCCTCTGCTC; зонд: /56-FAM/TCAAGGAAC/ZEN/AACATTGCCAA/3IABkFQ/). Чтобы установить стандартную кривую РНК, мы создали сцепленные сегменты гена N во фрагменте gBlocks (IDT) и клонировали их в вектор PCR-II topo (Invitrogen). Вектор линейаризовали и проводили T7-ДНК-зависимую транскрипцию РНК *in vitro*, чтобы получить материалы для количественной стандартной кривой.

Измерения мРНК цитокинов и хемокинов РНК выделяли из гомогенатов легких на 7 dpi, как описано выше. кДНК синтезировали из РНК, обработанной ДНКазой, с использованием набора для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК (Thermo Scientific) с добавлением ингибитора РНКазы в соответствии с протоколом производителя. Экспрессию цитокинов и хемокинов определяли с использованием мастер-микса для ПЦР TaqMan Fast Universal (Thermo Scientific) с коммерческими наборами праймеров/зондов, специфических для *IFN γ* (IDT: Mm.PT.58.41769240), *IL-6* (Mm.PT.58.10005566), *CXCL10* (Mm.PT.58.43575827), *CCL2* (Mm.PT.58.42151692), и результаты нормализовали по уровням *GAPDH* (Mm.PT.39a.1). Кратное изменение определяли с помощью метода $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ путем сравнения мышей, обработанных mAb, специфических для SARS-CoV-2, или mAb изотипического контроля, с контролем без обработки.

Эксперименты на мышах с использованием мышей дикого типа. Исследования на животных проводили в соответствии с рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных Национального института здоровья. Протоколы были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию

животных в Медицинском колледже Университета Северной Каролины в Чапел-Хилл (номер подтверждения соответствия требованиям содержания животных NIH/PHS – D16-00256 (A3410-01)). Инокуляции вируса проводили под анестезией, которую индуцировали и поддерживали с помощью гидрохлорида кетамина и ксилазина, и предпринимали все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Вирус SARS-CoV-2 (MA-SARS-CoV-2), адаптированный для мышей. Вирус получили, как описано ранее¹⁴. Вирус размножали в клетках Vero E6, выращенных в DMEM с 10% сыворотки Fetal Clone II и 1% пенициллина/стрептомицина. Титр вируса определяли с помощью анализа бляшкообразования. Вкратце, вирус серийно разбавляли и инокулировали на конфлюэнтные монослои клеток Vero E6 с последующим перекрытием агарозой. Бляшки визуализировали в день 2 после заражения после окрашивания красителем нейтральный красный.

Мыши дикого типа. В экспериментах использовали 12-месячных мышей BALB/c от Envigo. Мышей акклиматизировали в BSL3 в течение по меньшей мере 72 часов до начала экспериментов. За 6 часов до заражения мышей профилактически обрабатывали с помощью 200 мкг человеческих моноклональных антител путем внутрибрюшинной инъекции. На следующий день мышей анестезировали смесью кетамина и ксилазина и интраназально инфицировали с помощью 10^5 БОЕ MA-SARS-CoV-2, разведенного в PBS. Потерю массы тела измеряли ежедневно и через два дня после заражения мышей умерщвляли с помощью передозировки изофлурана перед проведением сбора тканей.

Анализ бляшкообразования в гомогенатах легочной ткани. Нижнюю долю правого легкого гомогенизировали в 1 мл PBS с использованием MagnaLyser (Roche). Серийные разведения вируса титровали на монослоях культуры клеток Vero E6 и вирусные бляшки визуализировали окрашиванием нейтральным красным через два дня после инокуляции. Предел обнаружения для анализа составляет 100 БОЕ на легкое.

Количественное определение и статистический анализ. Описательные статистики в виде среднее значение $\pm$ SEM или среднее значение $\pm$ SD определяли для непрерывных переменных, как указано выше. Технические и биологические повторы описаны в условных обозначениях к фигурам. В исследованиях на мышах анализ изменения массы тела и вирусной нагрузки *in vivo* проводили с помощью двухфакторного ANOVA и критерия Манна-Уитни соответственно. Статистический анализ проводили с использованием Prism версии 8.0 (GraphPad).

Библиографические ссылки на методы онлайн

- 1 Zost SJ, G. P., Chen RE, Case JB, Reidy JX, Trivette A, Nargi RS, Sutton RE, Suryadevara N, Chen EC, Binshtein E, Shrihari S, Ostrowski M, Chu HY, Didier JE,

- MacRenaris KW, Jones T, Day S, Myers L, Lee FE-H, Nguyen DC, Sanz I, Martinez DR, Baric RS, Thackray LB, Diamond MS, Carnahan RH, Crowe JE Jr. . Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *bioRxiv* 2020.05.12.091462; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.12.091462> (2020)
- 2 Mukherjee, S. *et al.* Enhancing dengue virus maturation using a stable furin over-expressing cell line. *Virology* **497**, 33-40, doi:10.1016/j.virol.2016.06.022 (2016).
 - 3 Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **367**, 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).
 - 4 Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y. & Walz, T. Negative staining and image classification - Powerful tools in modern electron microscopy. *Biol Proced Online* **6**, 23-34, doi:10.1251/bpo70 (2004).
 - 5 Mastronarde, D. N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol* **152**, 36-51, doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007 (2005).
 - 6 Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat Methods* **14**, 290-296, doi:10.1038/nmeth.4169 (2017).
 - 7 Bepler, T., Noble, A. J., and Berger, B. Topaz-Denoise: general deep denoising models for cryoEM. *bioRxiv*. doi:10.1101/838920 (2019).
 - 8 Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612, doi:10.1002/jcc.20084 (2004).
 - 9 Chng, J. *et al.* Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs* **7**, 403-412, doi:10.1080/19420862.2015.1008351 (2015).
 - 10 Yuan, M. *et al.* A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* **368**, 630-633, doi:10.1126/science.abb7269 (2020).
 - 11 Ianevski, A., He, L., Aittokallio, T. & Tang, J. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data. *Bioinformatics* **33**, 2413-2415, doi:10.1093/bioinformatics/btx162 (2017).
 - 12 ter Meulen, J. *et al.* Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet* **363**, 2139-2141, doi:10.1016/S0140-6736(04)16506-9 (2004).
 - 13 Sheehan, K. C. *et al.* Blocking monoclonal antibodies specific for mouse IFN-alpha/beta receptor subunit 1 (IFNAR-1) from mice immunized by in vivo hydrodynamic transfection. *J Interferon Cytokine Res* **26**, 804-819 (2006).
 - 14 Dinno KH, *et al.* A mouse-adapted SARS-CoV-2 model for the evaluation of COVID-19 medical countermeasures. *bioRxiv* 2020.05.06.081497; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.06.081497> (2020).

* * * * *

**ТАБЛИЦА 1 - НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ
ВАРИАБЕЛЬНОЙ ОБЛАСТИ АНТИТЕЛА**

Кл он	Seq ID	Цепь	Последовательность вариабельной области
CO V2 - 21 65	1	тяжел ая	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCAC CGTCCGTAGCAACTACATGACCTGGGTCCGCCAGACTCCAG GGAAGGGGCTGGAATGGGTGTCAGTTATTTATAGCGGTGGT AGCACATTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCAT CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTATCTTCAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCG AGAGATCTCGTGACTTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	2	легка я	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGG CATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGA CAGCCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAA GTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACA GAATTCACCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTT GCAACTTATTACTGTCAACTACTTAATAGTCACCCCCTCACC TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
CO V2 - 28 38	3	тяжел ая	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTAC CTTTATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGG ACAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTG GTAACACAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACC ATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCT GAGCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG CGGCCCCATATTGTAGTAGTATCAGCTGCAATGATGGTTTTG ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAG
	4	легка я	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAG TGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG

			GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAG ATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGG GTTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
CO V2 - 29 52	5	тяжел ая	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCAC CGTCCGTAGCAACTACATGACCTGGGTCCGCCAGACTCCAG GGAAGGGGCTGGAATGGGTGTCAGTTATTTATAGCGGTGGT AGCACATTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCAT CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTATCTTCAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCG AGAGATCTCGTGACTTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	6	легка я	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGG CATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGA CAGCCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAA GTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACA GAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTT GCAACTTATTACTGTCAACTACTTAATAGTCACCCCCTCACC TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAC
CO V2 - 25 14	7	тяжел ая	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAT CTTTGATGATTATGACATGACCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTG GTAGCACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAT GAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTG CAGTGATTATGTCTCCAATCCCCGTTATAGTGGCTACGATT GGGCGGGTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG GTCACCGTCTCTTCAG
	8	легка я	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTG GGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCA GAAGCTATTATGCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAG GTCCCTATACTTGTCATCTATGATAAAAACAACCGGCCCTCA

			GGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACAC AGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGG CTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACGCC GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG
CO V2 - 23 91	9	тяжел ая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACA CCTTCGGCAGCTTTGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATGAACTCTAACAG TGGGAACACAGCCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CTATGACCAGGGACACCTCCACAAATACAGCCTACATGGAG TTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTG TGCGAGAATGCGCAGTGGCTGGCCACACATGGCCGCCCCG ATGACTTCTGGGGCCGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA G
	10	легка я	CAGTCTGTGCTGACTCAGGCACCCTCAGCGTCTGGGACCCC CGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAACTCCA ATATCGGAAGTTATACTATAAACTGGTACCAGCAGCTCCCA GGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATTTATGGTAATGATCAGCG GACCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTTTGG CACCTCGGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGG ATGAAAATAATTATTACTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTG AATGGCCTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCT AG
CO V2 - 30 25	11	тяжел ая	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTAC CTTTATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGG ACAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTG GTAACACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACC ATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCT GAGCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG CGGCCCCATATTGTAGTAGTATCAGCTGCAATGATGGTTTTG ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	12	легка я	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAGAGAGTCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAG

			TGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAG ATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGG GTTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
CO V2 - 21 96	13	тяжел ая	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTAC CTTTATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGG ACAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTG GTAACACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACC ATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCT GAGCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG CGGCCCCATATTGTAGTAGTATCAGCTGCAATGATGGTTTTG ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	14	легка я	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAG TGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAG ATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGG GTTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
CO V2 - 20 94	15	тяжел ая	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CTTTGATGATTATGACATGACCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTG GTAGCACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAT GAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTG CAGTGATTATGTCTCCAATCCCCGTTATAGTGGCTACGATT GGGCGGGTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG GTCACCGTCTCTTCA

	16	легкая	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTG GGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCA GAAGCTATTATGCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAG GTCCCTATACTTGTCTATGATAAAAACAACCGGCCCTCA GGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACAC AGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGG CTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACGCC GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
CO V2 - 20 96	17	тяжелая	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACA CCTTCGGCAGCTTTGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATGAACTCTAACAG TGGAACACAGCCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CTATGACCAGGGACACCTCCACAAATACAGCCTACATGGAG TTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTG TGCGAGAATGCGCAGTGGCTGGCCCACACATGGCCGCCCCG ATGACTTCTGGGGCCGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
	18	легкая	CAGTCTGTGCTGACTCAGGCACCCTCAGCGTCTGGGACCCC CGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAACTCCA ATATCGGAAGTTATACTATAAACTGGTACCAGCAGCTCCCA GGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATTTATGGTAATGATCAGCG GACCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTTTGG CACCTCGGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGG ATGAAAATAATTACTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTG AATGGCCTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCGTCCT A
CO V2 - 21 30	19	тяжелая	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCC TGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC TTTCAGAGACGTCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATTAAGCAAAATT GATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCA GATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTA TACTGTACCACAGCGGGAAGCTATTACTATGATACTGTTGG

			TCCAGGCCTCCCAGAGGGAAAATTTGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
	20	легка я	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCT CTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAG TGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTA CCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATGTACT GGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGT GGCAGCGGGTCTGGGGCAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAATTTATTACTGTCAGCAAT ATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG ATCAAA

**ТАБЛИЦА 2 - БЕЛКОВЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ
ВАРИАБЕЛЬНОЙ ОБЛАСТИ АНТИТЕЛА**

Клон	Seq ID	Цепь	Последовательность вариабельной области
CO V2-2165	21	тяжелая	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTVRSNYMTWVRQT PGKGLEWVSVIYSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDLV TYGLDVWGQGTTVTVSS
	22	легкая	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQGISNYLAWYQQKPGT APNLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY YCQLLN SHPLTFGQGTRLEIK
CO V2-2838	23	тяжелая	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSC KASGFTFMSSAVQWVRQA RGQRLEWIGWIVIGSGNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYM ELSSLRSED TAVYYCAAPYCSSISCNDGFDIWGQGTMTVTVSS
	24	легкая	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQHYGSSRGWTFGQGTKVEIK
CO V2-2952	25	тяжелая	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTVRSNYMTWVRQT PGKGLEWVSVIYSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDLV TYGLDVWGQGTTVTVSS
	26	легкая	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQGISNYLAWYQQKPGT APNLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY YCQLLN SHPLTFGQGTRLEIK
CO V2-2514	27	тяжелая	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFIFDDYDMTWVRQA PGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTALYHCAVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDIWG QGTMTVTVSS
	28	легкая	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQ VPILVIYDKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEAD YYCNSRDSSGNAVVFGGGTKLTVL
CO V2-2391	29	тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFGSFDINWVRQA TGQGLEWMGRMNSNSGNTAYA QKFQGRVTMTRDTSTNTA YMELSSLRSED TAMY YCARMRSGWPTHGRPDDFWGRGTL VTVSS
	30	легкая	QSVLTQAPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSYTINWYQQLP G TAPKLLIYGNDQRTSGVPDRFSGSKFGTSASLAISGLQSEDE NNYYCAVWDDSLNGLVFGGGTKLTVL

CO V2- 302 5	31	тяжелая	EVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFMSSAVQWVRQARGQRLEWIGWIVIGSGNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAAPYCSSISCNDGFDIWGQGTMVTVSS
	32	легкая	EIVLTQSPGTLSPGERVTLSRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSRGWTFGQGTKVEIK
CO V2- 219 6	33	тяжелая	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFMSSAVQWVRQARGQRLEWIGWIVIGSGNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAAPYCSSISCNDGFDIWGQGTMVTVSS
	34	легкая	EIVLTQSPGTLSPGERATLSRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSRGWTFGQGTKVEIK
CO V2- 209 4	35	тяжелая	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFIFFDDYDMTWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAMVIMSPIPRYSYGDWAGDAFDIWGQGTMVTVSS
	36	легкая	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQVPILVIYDKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCNSRDSSGNAVVFGGGTKLTVL
CO V2- 209 6	37	тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGSFDINWVRQATGQGLEWMGRMNSNSGNTAYAQKFQGRVTMTRDTSTNTAYMELSSLRSEDТАMYYCARMRSGWPTHGRPDDFWGRGTLVTVSS
	38	легкая	QSVLTQAPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSYTINWYQQLPGTAPKLLIYGNDQRTSGVPDRFSGSKFGTSASLAISGLQSEDENNYYCAVWDDSLNGLVFGGGTKLTVL
CO V2- 213 0	39	тяжелая	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDVWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKIDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDТАVYYCTTAGSYYYDTVGPGLPFGKFDYWGGGTLVTVSS
	40	легкая	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGAEFTLTISLLQAEDVAIYYCQYYSTLTFGGGTKVEIK

ТАБЛИЦА 3 - ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ

Клон	CDRH1	CDRH2	CDRH3
COV2-2165	GLTVRSNY	IYSGGST	ARDLVTYGLDV
	41	42	43
COV2-2838	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	44	45	46
COV2-2952	GLTVRSNY	IYSGGST	ARDLVTYGLDV
	47	48	49
COV2-2514	GFIFDDYD	INWNGGST	AVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDI
	50	51	52
COV2-2391	GYTFGSFD	MNSNSGNT	ARMRSGWPTHGRPDDF
	53	54	55
COV2-3025	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	56	57	58
COV2-2196	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	59	60	61
COV2-2094	GFIFDDYD	INWNGGST	AVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDI
	62	63	64
COV2-2096	GYTFGSFD	MNSNSGNT	ARMRSGWPTHGRPDDF
	65	66	67
COV2-2130	GFTFRDVW	IKSKIDGGTT	TTAGSYYYDTVGPGLPEGKFDY
	68	69	70

ТАБЛИЦА 4 - ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ

Клон	CDRL1	CDRL2	CDRL3
COV2-2165	QGISNY	AAS	QLLNSHPLT
	71	72	73
COV2-2838	QSVSSSY	GAS	QHYGSSRGWT
	74	75	76
COV2-2952	QGISNY	AAS	QLLNSHPLT
	77	78	79
COV2-2514	SLRSYY	DKN	NSRDSSGNAV
	80	81	82
COV2-2391	NSNIGSYT	GND	AVWDDSLNGLV
	83	84	85
COV2-3025	QSVSSSY	GAS	QHYGSSRGWT
	86	87	88
COV2-2196	QSVSSSY	GAS	QHYGSSRGWT
	89	90	91
COV2-2094	SLRSYY	DKN	NSRDSSGNAV
	92	93	94
COV2-2096	NSNIGSYT	GND	AVWDDSLNGLV
	95	96	97
COV2-2130	QSVLYSSNNKNY	WAS	QQYYSTLT
	98	99	100

Все композиции и способы, раскрытые и заявленные в данном документе, могут быть изготовлены и выполнены без проведения ненужных экспериментов в свете настоящего изобретения. Хотя композиции и способы по данному изобретению были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области будет очевидно, что к композициям и способам, а также к стадиям или последовательности стадий способа, описанного в данном документе, могут быть применены вариации без отклонения от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные средства, которые являются родственными химически и физиологически, могут заменять средства, описанные в данном документе, при этом будут достигаться такие же или подобные результаты. Все такие подобные замены и

модификации, очевидные для специалистов в данной области, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции настоящего изобретения, определяемого прилагаемой формулой изобретения.

VII. БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

Следующие библиографические ссылки, в той мере, в которой они представляют иллюстративные процедурные или другие подробности, дополняющие изложенные в данном документе, специально включены в данный документ посредством ссылки.

Патент США № 3817837

Патент США № 3850752

Патент США № 3939350

Патент США № 3996345

Патент США № 4196265

Патент США № 4275149

Патент США № 4277437

Патент США № 4366241

Патент США № 4472509

Патент США № 4554101

Патент США № 4680338

Патент США № 4816567

Патент США № 4867973

Патент США № 4938948

Патент США № 5021236

Патент США № 5141648

Патент США № 5196066

Патент США № 5563250

Патент США № 5565332

Патент США № 5856456

Патент США № 5880270

Патент США № 6485982

"Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Abbondanzo *et al.*, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990.

Allred *et al.*, *Arch. Surg.*, 125(1), 107-113, 1990.

Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.

Barzon *et al.*, *Euro Surveill.* 2016 Aug 11; 21(32).

Beltramello *et al.*, *Cell Host Microbe* 8, 271-283, 2010.

Brown *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 12;130(1), :111-121, 1990.

Campbell, *In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.

- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Diamond *et al.*, *J Virol* 77, 2578-2586, 2003.
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.
- Duffy *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543, 2009.
- Elder *et al.* Infections, infertility and assisted reproduction. Part II: Infections in reproductive medicine & Part III: Infections and the assisted reproductive laboratory. Cambridge UK: Cambridge University Press; 2005.
- Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Gornet *et al.*, *Semin Reprod Med.* 2016 Sep; 34(5):285-292. Epub 2016 Sep 14.
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.
- Halfon *et al.*, *PLoS ONE* 2010; 5 (5) e10569
- Hessell *et al.*, *Nature* 449, 101–4, 2007.
- Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Mansuy *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1106-7.
- Nakamura *et al.*, In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.
- O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Persic *et al.*, *Gene* 187:1, 1997
- Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- Purpura *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1107-8. Epub 2016 Sep 19.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 3:624-652, 1990.
- Tang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28324-28330, 1996.
- Wawrzynczak & Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.
- Yu *et al.*, *J Immunol Methods* 336, 142-151, doi:10.1016/j.jim.2008.04.008, 2008.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или фрагмент антитела, которые связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2, где антитело или фрагмент содержат:

- (a) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:59, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:60, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:61, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:89, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:90, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:91;
- (b) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:68, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:69, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:70, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:98, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:99, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:100;
- (c) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:41, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:42, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:43, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:71, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:72, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:73;
- (d) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:44, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:45, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:46, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:74, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:75, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:76;
- (e) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:47, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:48, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:49, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:77, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:78, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:79;

- (f) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:50, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:51, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:52, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:80, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:81, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:82;
 - (g) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:53, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:54, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:55, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:83, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:84, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:85;
 - (h) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:56, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:57, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:58, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:86, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:87, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:88;
 - (i) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:62, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:63, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:64, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:66, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:67;
- или
- (j) CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:66, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:67, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:95, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:96, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:97.

2. Антитело или фрагмент антитела по п. 1, где антитело или фрагмент содержат последовательности вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичностью с:

- (a) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:33 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:34;
- (b) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:39 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:40;
- (c) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:21 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:22;
- (d) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:23 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:24;
- (e) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:25 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:26;
- (f) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:27 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:28;
- (g) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:29 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:30;
- (h) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:31 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:32;
- (i) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:35 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:36; или
- (j) аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:37 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:38.

3. Антитело или фрагмент антитела по п. 1 или п. 2, где антитело или фрагмент содержат:

- (a) последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:33, и/или последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:34;
- (b) последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:39, и/или последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40;
- (c) последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:21, и/или последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:22;

- (d) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:23, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:24;
- (e) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:26;
- (f) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:27, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:28;
- (g) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:29, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:30;
- (h) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:31, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32;
- (i) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:35, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:36; или
- (j) последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:37, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:38.

4. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-3, где антитело или фрагмент являются моноклональными.

5. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-4, где фрагмент антитела представляет собой рекомбинантное scFv-антитело (одноцепочечный фрагмент из вариабельных доменов), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент.

6. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-5, где антитело или фрагмент содержат мутацию YTE.

7. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-6, где антитело или фрагмент представляют собой IgG или рекомбинантное IgG-антитело или фрагмент антитела, содержащие Fc-фрагмент с мутацией для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, для увеличения периода полужизни и/или повышения терапевтической эффективности, такой как мутация LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE или LS, или с модификацией гликана для изменения (устранения или усиления) взаимодействий с FcR, такой как ферментативное или химическое добавление или удаление гликанов или экспрессия в линии клеток, сконструированной с определенным паттерном гликозилирования.

8. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-7, где антитело или фрагмент антитела способны нейтрализовать живой вирус SARS-CoV-2 BSL3 в анализе на основе реакции нейтрализации с подавлением фокусообразования (FRNT) с использованием монослоев культуры клеток Vero-E2, где необязательно антитело или фрагмент антитела способны нейтрализовать 96% живого вируса SARS-CoV-2 BSL3 при концентрации 250 нг/мл.

9. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-8, где антитело или фрагмент антитела блокируют связывание рецептор-связывающего домена (RBD) с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) человека, где необязательно антитело или фрагмент антитела блокируют активность против hACE2 с IC50 менее 150 нг/мл.

10. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-9, где антитело или фрагмент антитела способны нейтрализовать вирус SARS-CoV-2, содержащий шиповидный белок, который содержит замену D614G, где необязательно шиповидный белок не содержит замену E484K.

11. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-10, где антитело или фрагмент антитела способны связывать RBD в конформации "вверх".

12. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-11, где антитело или фрагмент антитела способны связывать RBD в конформациях "вверх" и "вниз".

13. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-11, где антитело или фрагмент антитела не способны связывать RBD в конформации "вниз".

14. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-13, где антитело или фрагмент способны связывать тримерный эктодомен шиповидного белка и способны связываться с мономерным RBD шиповидного белка, где необязательно связывание с тримерным эктодомом шиповидного белка и/или связывание с мономерным RBD шиповидного белка происходит при EC50 менее 2 нг/мл.

15. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-14, где антитело или фрагмент антитела дополнительно содержат детектируемую метку.

16. Способ лечения субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, или снижения вероятности инфицирования субъекта с риском заражения SARS-CoV-2, включающий доставку субъекту первого антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-15.

17. Способ защиты здоровья субъекта в возрасте 60 лет или старше, субъекта с ослабленным иммунитетом или субъекта, страдающего респираторным и/или сердечно-сосудистым нарушением, который инфицирован или подвергается риску инфицирования SARS-CoV-2, включающий доставку субъекту первого антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-15.

18. Способ по п. 16 или п. 17, где способ дополнительно включает доставку субъекту второго антитела или фрагмента антитела, где необязательно второе антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-15.

19. Способ лечения субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, или снижения вероятности инфицирования субъекта с риском заражения SARS-CoV-2, включающий доставку субъекту первого антитела или фрагмента антитела и второго антитела или фрагмента антитела, где первое и второе антитела или фрагменты антител являются синергичными в нейтрализации SARS-CoV-2.

20. Способ по п. 18 или п. 19, где первое антитело или фрагмент антитела и второе антитело или фрагмент антитела характеризуются показателем синергизма, составляющим 17,4.

21. Способ по любому из пп. 18-20, где допускается снижение дозы первого антитела или фрагмента антитела и второго антитела или фрагмента антитела в более чем 3 раза по сравнению с дозой первого антитела или фрагмента антитела или второго антитела или фрагмента антитела по отдельности для достижения такой же эффективности при нейтрализации вируса.

22. Способ по любому из пп. 18-21, где первое антитело или фрагмент антитела способны связываться с RBD в конформации "вверх" и не способны связываться с RBD в конформации "вниз".

23. Способ по любому из пп. 18-22, где второе антитело или фрагмент антитела способны связывать RBD как в конформации "вверх", так и в конформации "вниз".

24. Способ по любому из пп. 18-23, где первое антитело или фрагмент антитела и второе антитело или фрагмент антитела не конкурируют за связывание с RBD.

25. Способ по любому из пп. 18-24, где первое антитело или фрагмент антитела содержат CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:59,

CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:60, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:61, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:89, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:90, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:91.

26. Способ по любому из пп. 18-25, где второе антитело или фрагмент антитела содержат CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:68, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:69, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:70, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:98, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:99, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:100.

27. Способ по любому из пп. 18-26, где первое антитело или фрагмент антитела содержат последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:33, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:34.

28. Способ по любому из пп. 18-27, где второе антитело или фрагмент антитела содержат последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:39, и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40.

29. Способ по любому из пп. 16-28, где доставка снижает экспрессию INF- γ , IL-6, CXCL10 и CCL2 у субъекта.

30. Способ по любому из пп. 16-29, где доставка является внутривенной.

31. Способ по любому из пп. 16-30, где возраст субъекта составляет 60 лет или старше, он имеет ослабленный иммунитет или страдает респираторным и/или сердечно-сосудистым нарушением.

32. Способ по любому из пп. 16-31, где доставка улучшает дыхание субъекта по сравнению с необработанным контролем.

33. Способ по любому из пп. 16-32, где доставка снижает вирусную нагрузку по сравнению с необработанным контролем.

34. Способ по любому из пп. 17-33, где доставка предшествует инфицированию.

35. Способ по любому из пп. 17-33, где доставка происходит после инфицирования.

36. Вакцинный состав, содержащий одно или несколько антител или фрагментов антител по любому из пп. 1-15.

37. Вакцинный состав по п. 36, дополнительно содержащий второе антитело или фрагмент антитела, которые связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2, где необязательно второе антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-15.

38. Вакцинный состав, содержащий один или несколько векторов экспрессии, кодирующих первое антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-15.

39. Вакцинный состав по п. 38, где вектор(-ы) экспрессии представляет(-ют) собой вирус Синдбис или вектор(-ы) на основе VEE.

40. Вакцинный состав по п. 38 или п. 39, составленный для доставки путем инъекции с помощью иглы, струйной инъекции или электропорации.

41. Вакцинный состав по п. 40, дополнительно содержащий один или несколько векторов экспрессии, кодирующих второе антитело или фрагмент антитела, которые связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или фрагмент антитела необязательно представляют собой антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-15.

42. Способ обнаружения инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, у субъекта, включающий:

(а) приведение образца от субъекта в контакт с антителом или фрагментом по любому из пп. 1-15 и

(b) обнаружение SARS-CoV-2 в образце при связывании антитела или фрагмента антитела с антигеном SARS-CoV-2 в образце.

43. Способ по п. 42, где образец представляет собой физиологическую жидкость.

44. Способ по п. 42 или п. 43, где образец представляет собой кровь, мокроту, слезы, слюну, слизь или сыворотку крови, сперму, цервикальный или вагинальный секрет, амниотическую жидкость, ткани плаценты, мочу, экссудат, транссудат, соскобы тканей или фекалии.

45. Способ по любому из пп. 42-44, где обнаружение включает ELISA, RIA, иммунохроматографический анализ или вестерн-блоттинг.

46. Способ определения антигенной целостности, правильной конформации и/или правильной последовательности поверхностного шиповидного белка SARS-CoV-2, включающий:

(а) приведение образца, содержащего антиген, в контакт с антителом или фрагментом по любому из пп. 1-15 и

(b) определение антигенной целостности, правильной конформации и/или правильной последовательности антигена при детектируемом связывании антитела или фрагмента антитела с антигеном.

47. Способ по п. 46, где образец содержит антиген, полученный рекомбинантным путем.

48. Способ по п. 46, где образец содержит вакцинный состав или производственную партию вакцины.

49. Способ по любому из пп. 46-48, где обнаружение включает ELISA, RIA, вестерн-блоттинг, биосенсор с использованием поверхностного плазмонного резонанса или биослойной интерферометрии или окрашивание при проточной цитометрии.

50. Способ по любому из пп. 46-49, дополнительно включающий выполнение стадий (a) и (b) во второй раз для определения антигенной стабильности антигена с течением времени.

51. Гибридома или сконструированная клетка, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-15.

52. Выделенное человеческое моноклональное антитело или фрагмент антитела, или гибридома или сконструированная клетка, продуцирующие их, где антитело связывается с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2.

53. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-15, и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или фрагмента антитела.

54. Полинуклеотид по п. 53, где полинуклеотид содержит последовательность под любым из SEQ ID NO:1-20.

55. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 54.

56. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 53 или п. 54, вектор по п. 55 или первый вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи, и второй вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его фрагмента антитела по любому из пп. 1-15.

57. Способ получения антитела или фрагмента антитела, включающий (a) культивирование клетки по п. 56 и (b) выделение антитела или его фрагмента антитела из культивируемой клетки.

58. Композиция, содержащая первое антитело или фрагмент антитела, которые связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2, и второе антитело или фрагмент антитела, которые связываются с поверхностным шиповидным белком SAR-

CoV-2, где необязательно композиция представляет собой фармацевтически приемлемую композицию.

59. Набор, содержащий первое антитело или фрагмент антитела, которые связываются с поверхностным шиповидным белком SARS-CoV-2, и второе антитело или фрагмент антитела, которые связываются с поверхностным шиповидным белком SAR-CoV-2, где необязательно набор дополнительно содержит инструкции по применению первого антитела или фрагмента антитела и второго антитела или фрагмента антитела для лечения субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, или для снижения вероятности инфицирования субъекта с риском заражения SARS-CoV-2.

60. Композиция или набор по п. 58 или п. 59, где первое антитело или фрагмент антитела и второе антитело или фрагмент антитела характеризуются показателем синергизма, составляющим 17,4.

61. Композиция или набор по любому из пп. 58-60, где допускается снижение дозы первого антитела или фрагмента антитела и второго антитела или фрагмента антитела в более чем 3 раза по сравнению с дозой первого антитела или фрагмента антитела или второго антитела или фрагмента антитела по отдельности для достижения такой же эффективности при нейтрализации вируса.

62. Композиция или набор по любому из пп. 58-61, где первое антитело или фрагмент антитела способны связываться с RBD в конформации "вверх" и не способны связываться с RBD в конформации "вниз".

63. Композиция или набор по любому из пп. 58-62, где второе антитело или фрагмент антитела способны связывать RBD как в конформации "вверх", так и в конформации "вниз".

64. Композиция или набор по любому из пп. 58-63, где первое антитело или фрагмент антитела и второе антитело или фрагмент антитела не конкурируют за связывание с RBD.

65. Композиция или набор по любому из пп. 58-64, где первое антитело или фрагмент антитела содержат CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:59, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:60, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:61, CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:89, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:90, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:91.

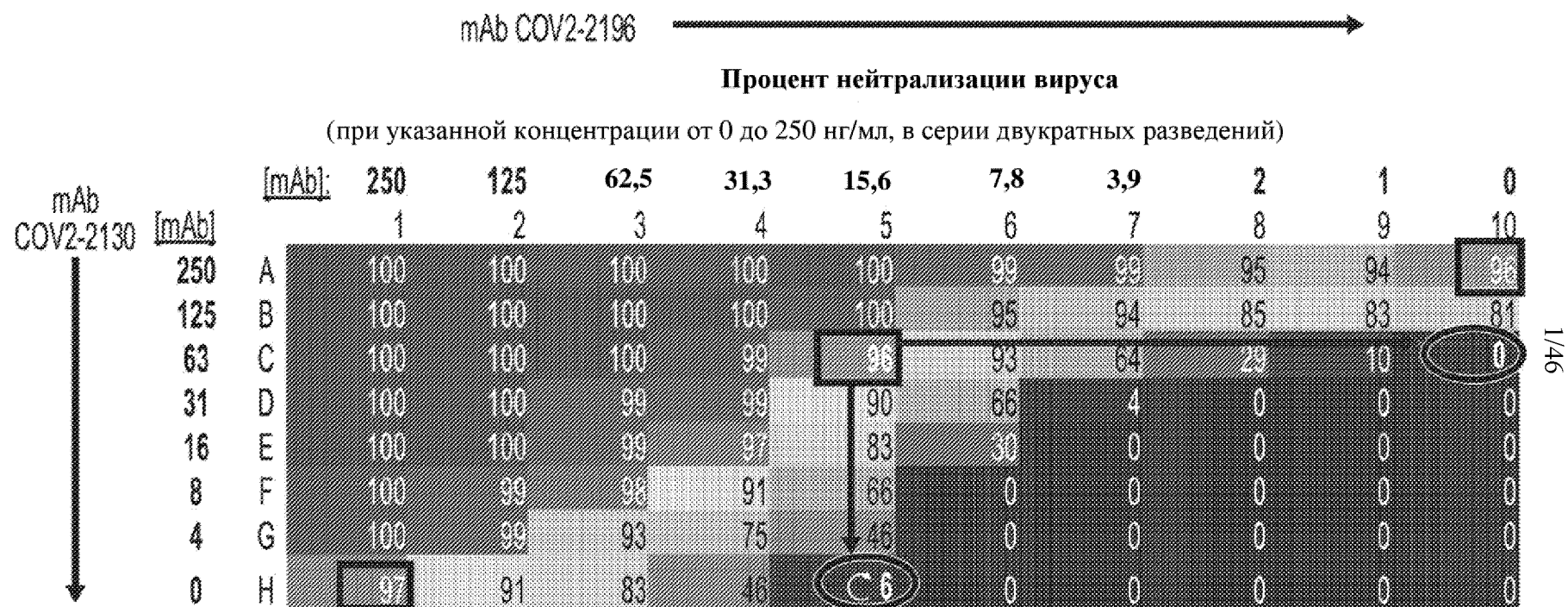
66. Композиция или набор по любому из пп. 58-65, где второе антитело или фрагмент антитела содержат CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:68, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:69, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:70, CDRL1,

содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:98, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:99, CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:100.

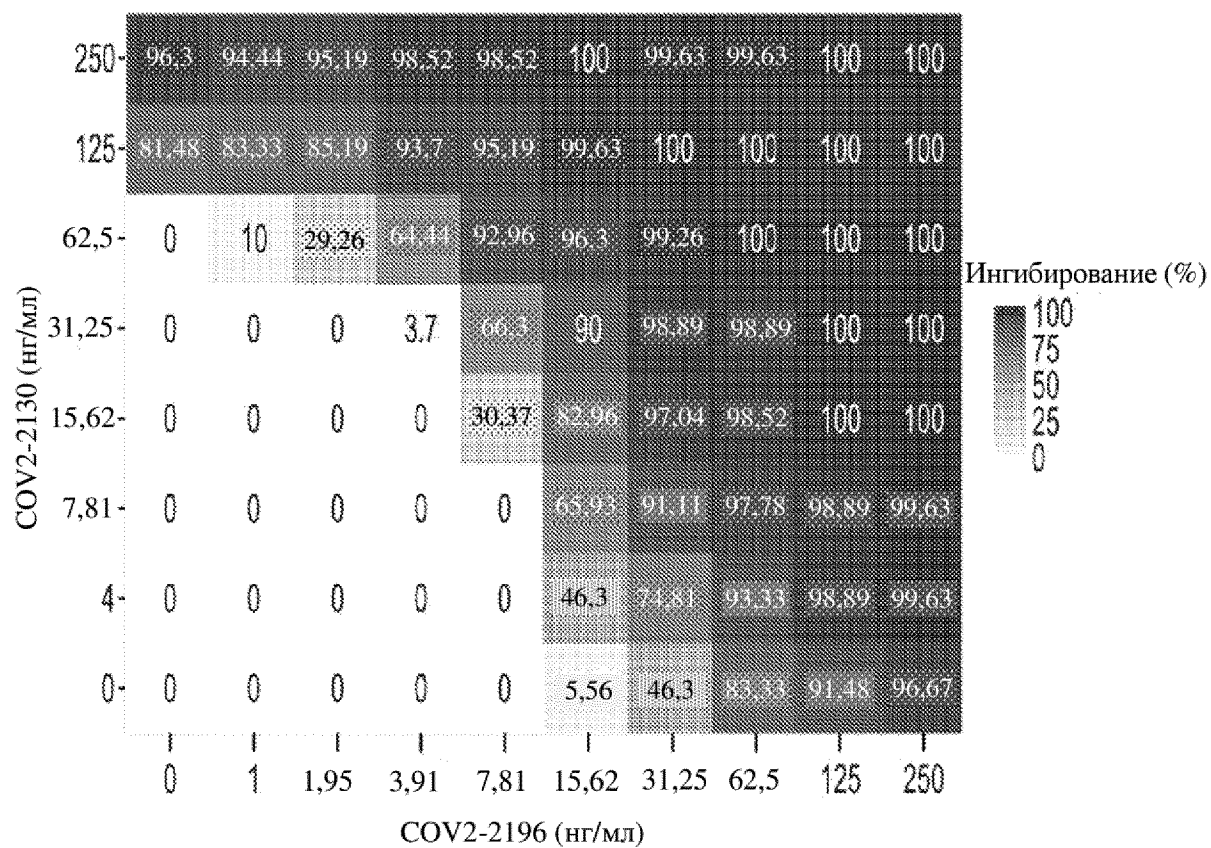
67. Композиция или набор по любому из пп. 58-66, где первое антитело или фрагмент антитела содержат последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:33, и/или последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:34.

68. Композиция или набор по любому из пп. 58-67, где второе антитело или фрагмент антитела содержат последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:39, и/или последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40.

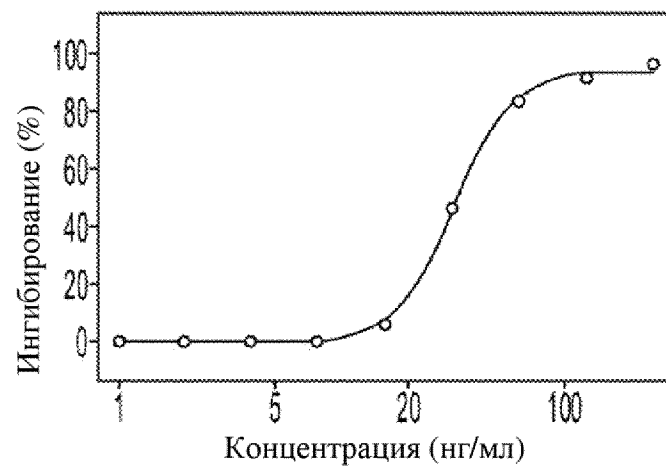
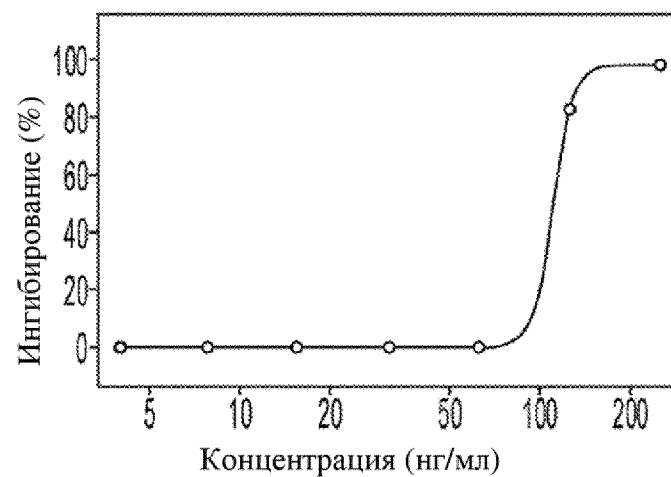
69. Набор по любому из пп. 59-68, где первое антитело или фрагмент антитела и второе антитело или фрагмент антитела находятся в отдельных контейнерах.

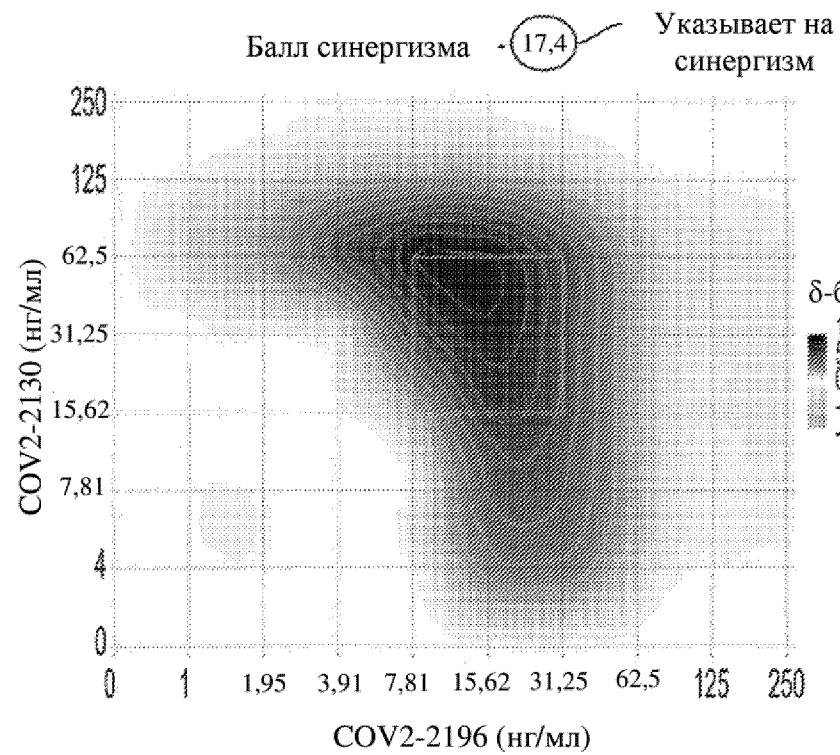


ФИГ. 1



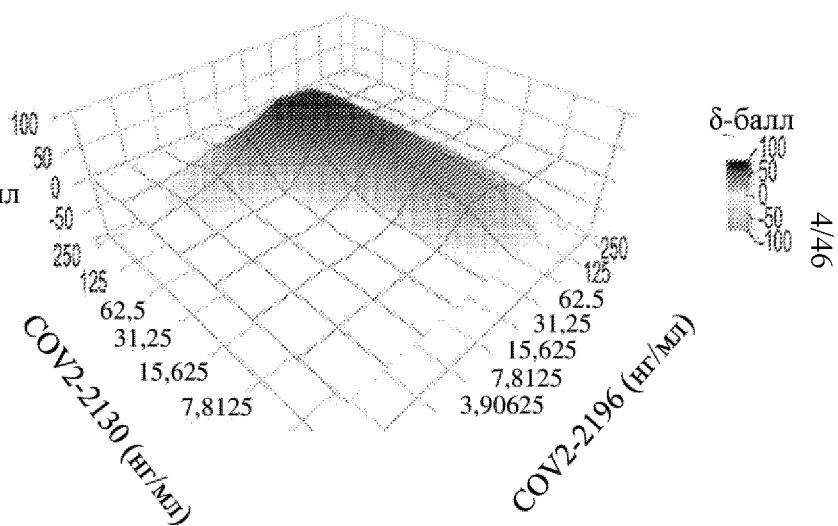
ФИГ. 2А

Кривая доза-ответ для лекарственного средства: COV2-2196 отдельно**Кривая доза-ответ для лекарственного средства: COV2-2130 отдельно****ФИГ. 2В**

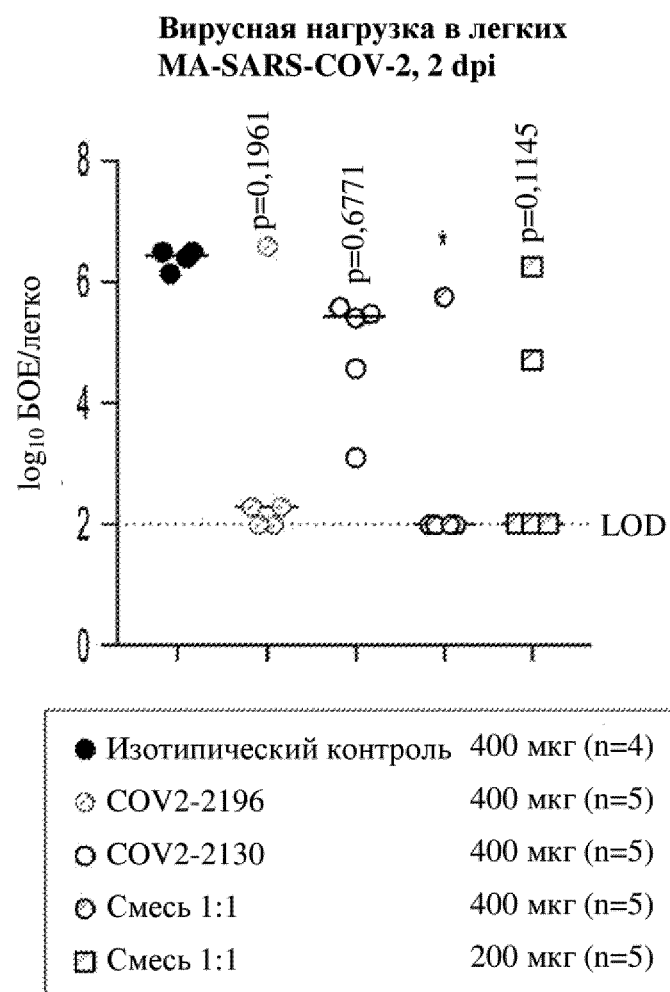


COV2-2130 (нг/мл) и COV2-2196 (нг/мл)

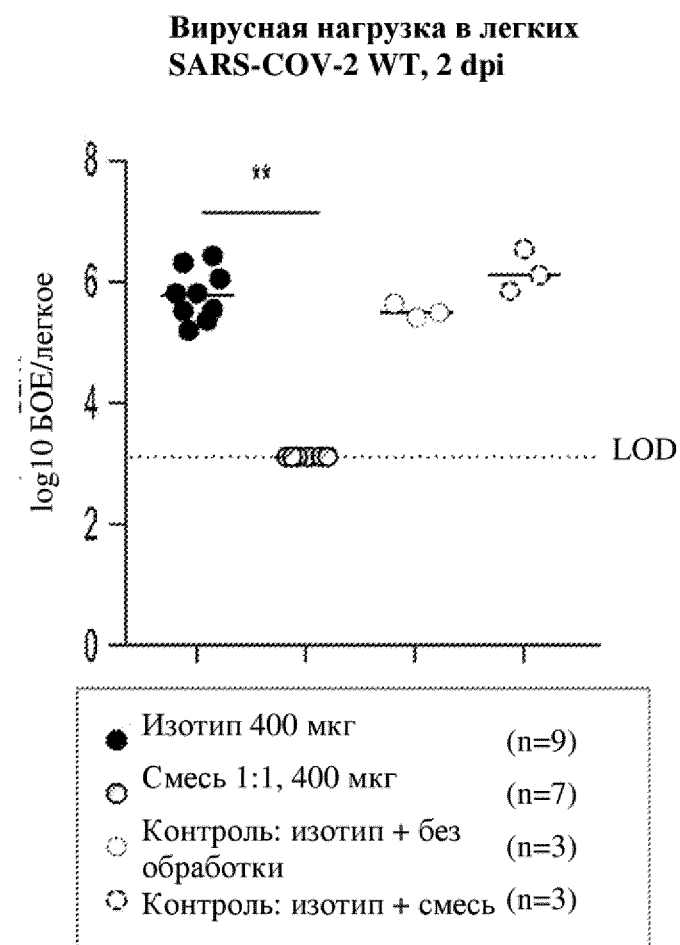
Балл синергизма ZIP – 17,421



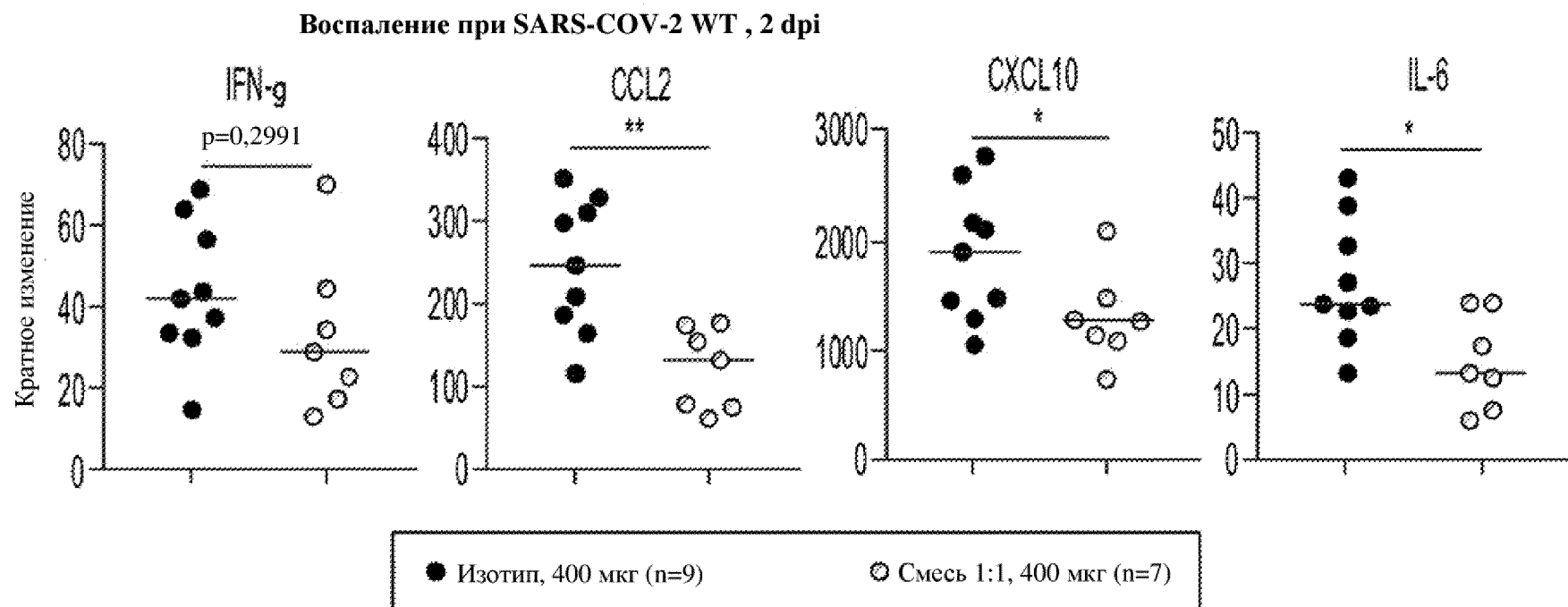
ФИГ. 3



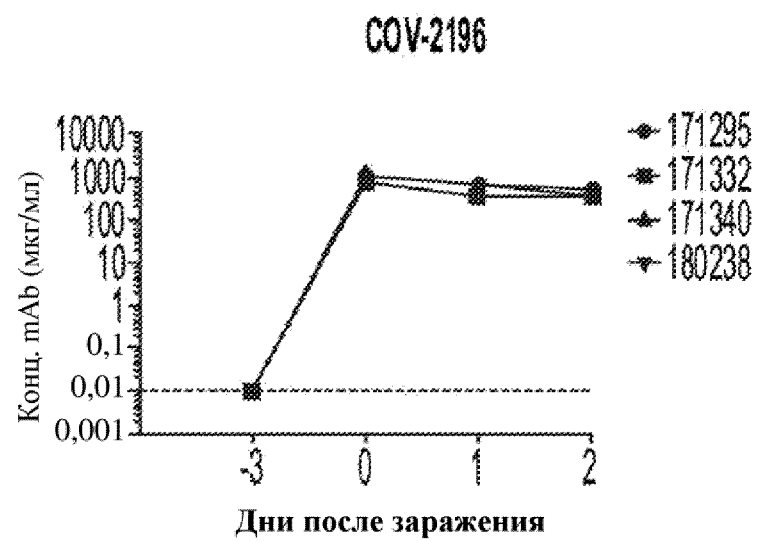
ФИГ. 4А



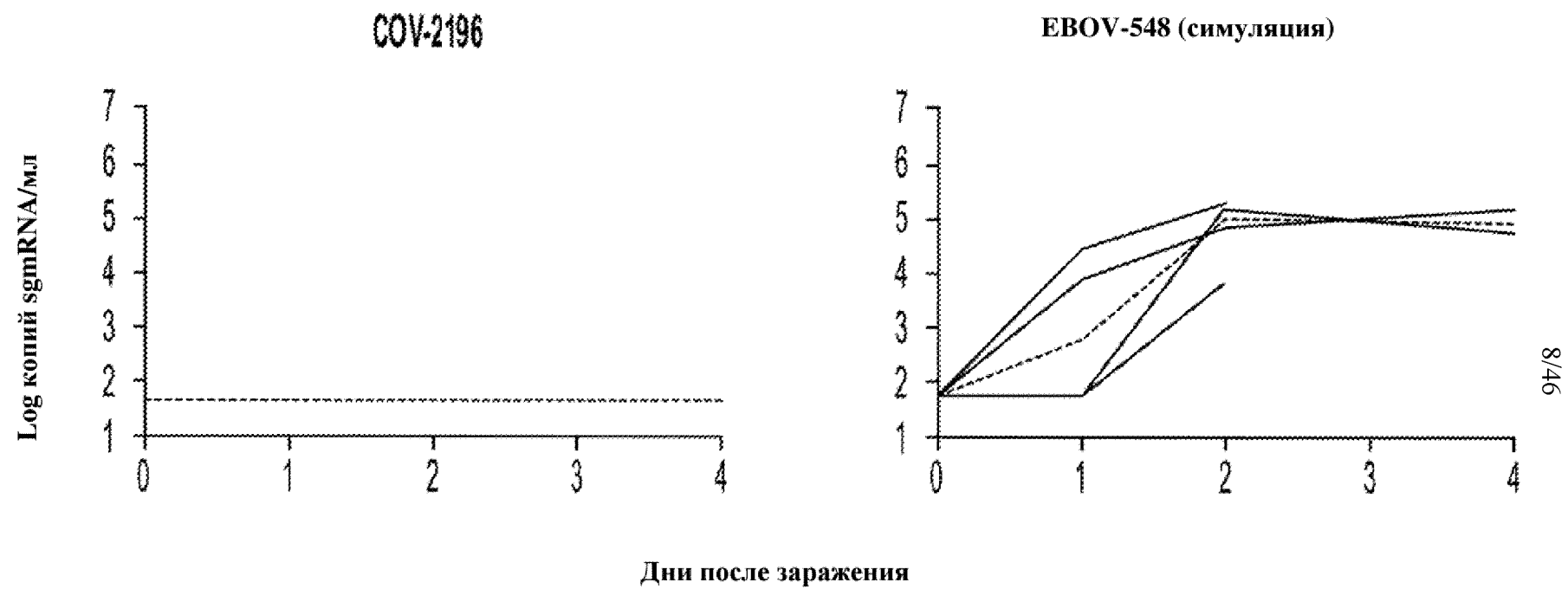
ФИГ. 4В



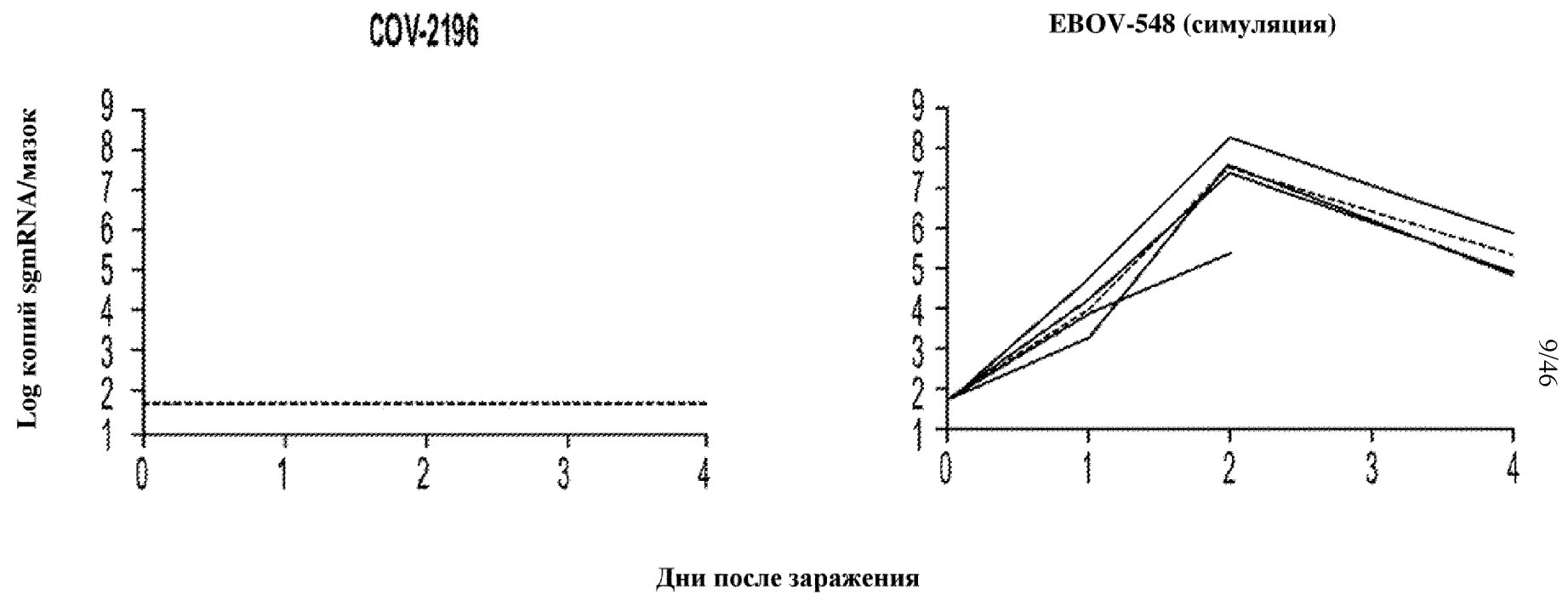
ФИГ. 4С



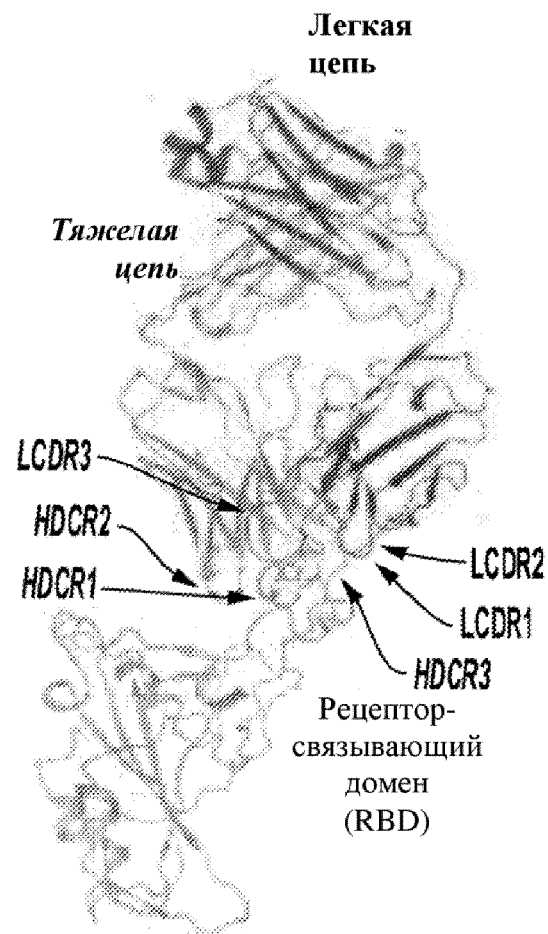
ФИГ. 5



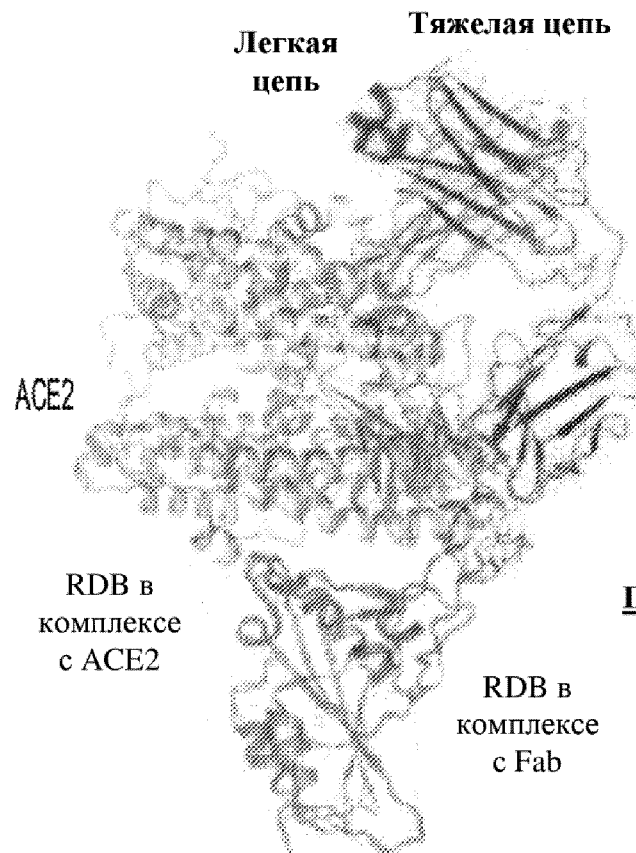
ФИГ. 6



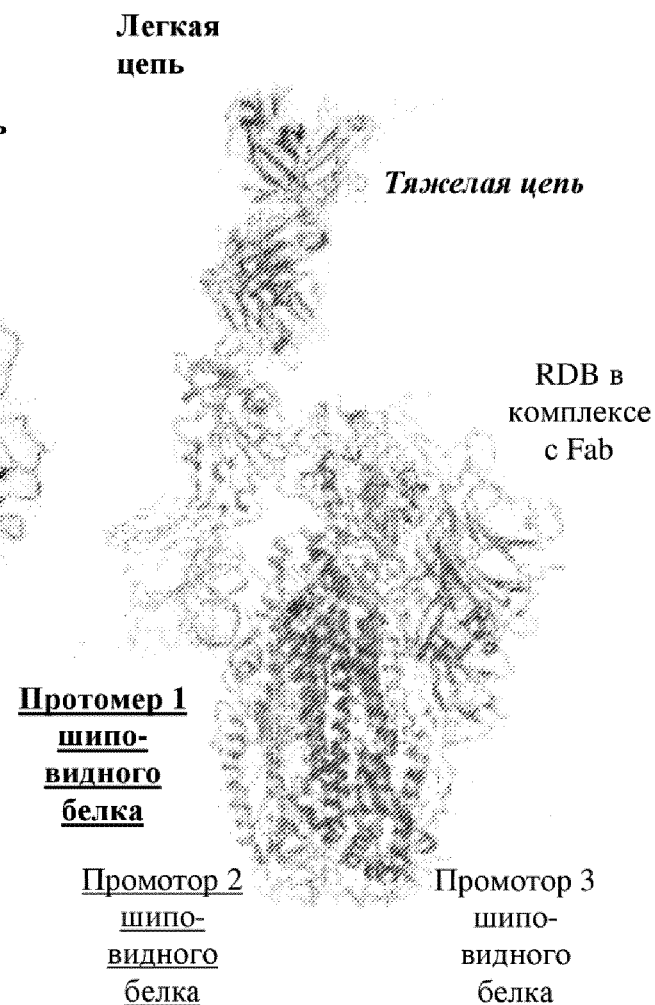
ФИГ. 7



ФИГ. 8А

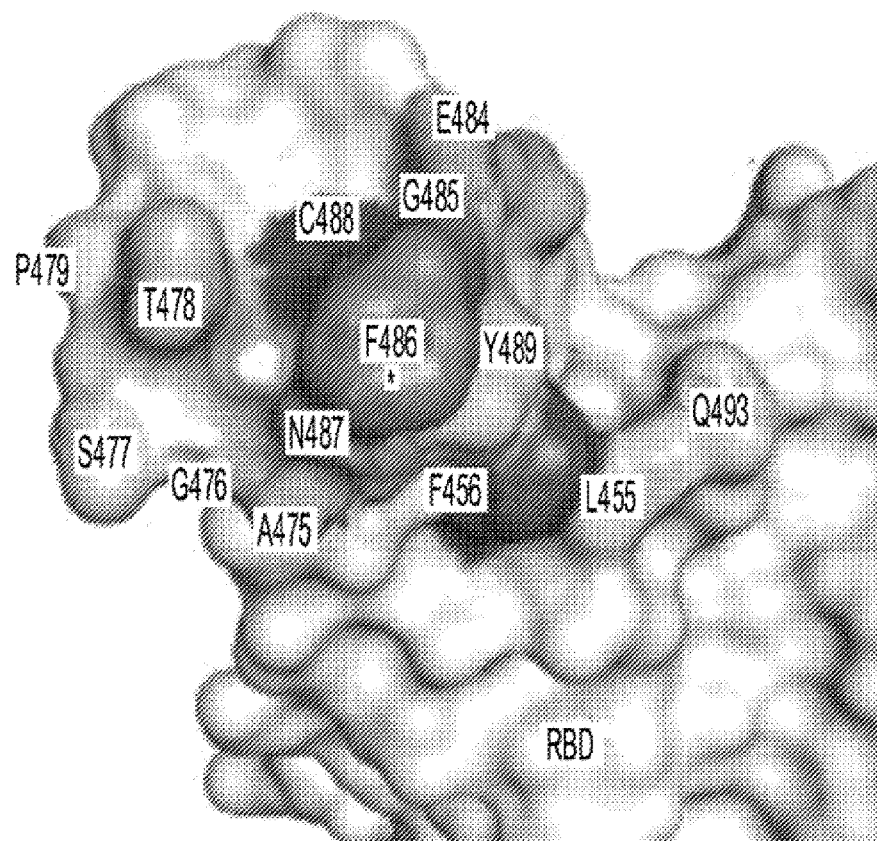


ФИГ. 8В



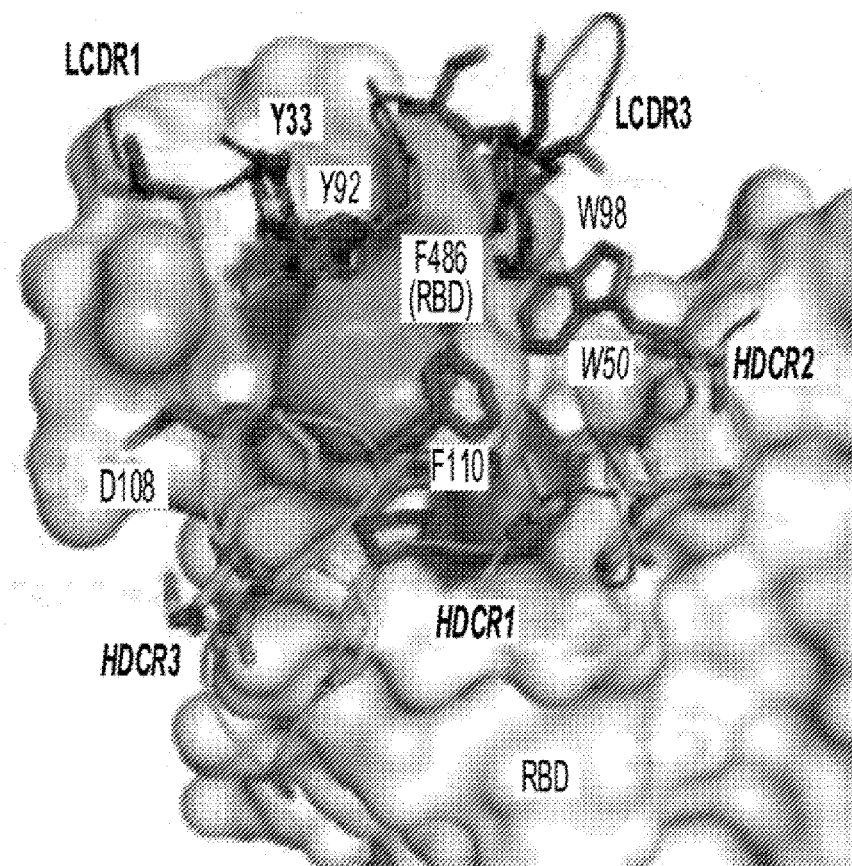
ФИГ. 8С

Сайт связывания COV2-2196

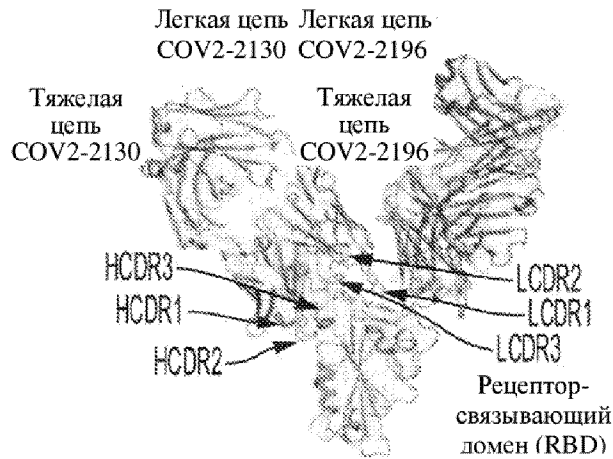


ФИГ. 8D

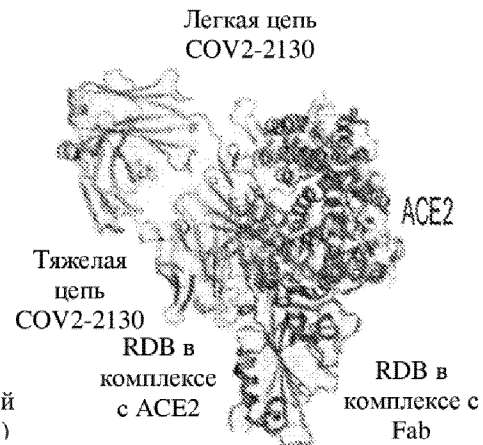
CDR COV2-2196 на RBD



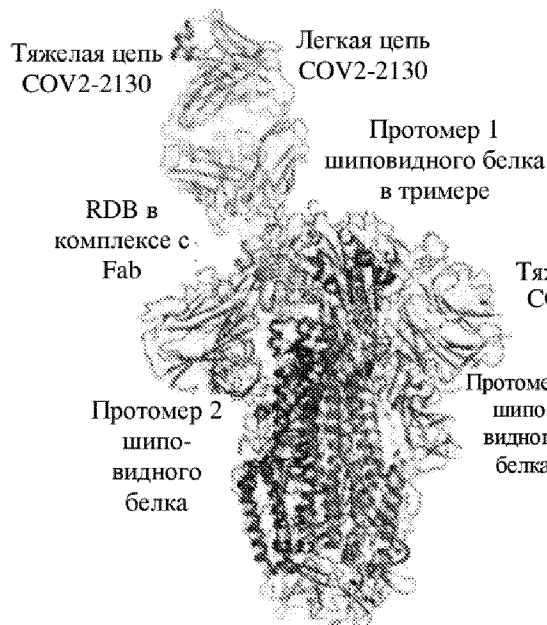
ФИГ. 8E



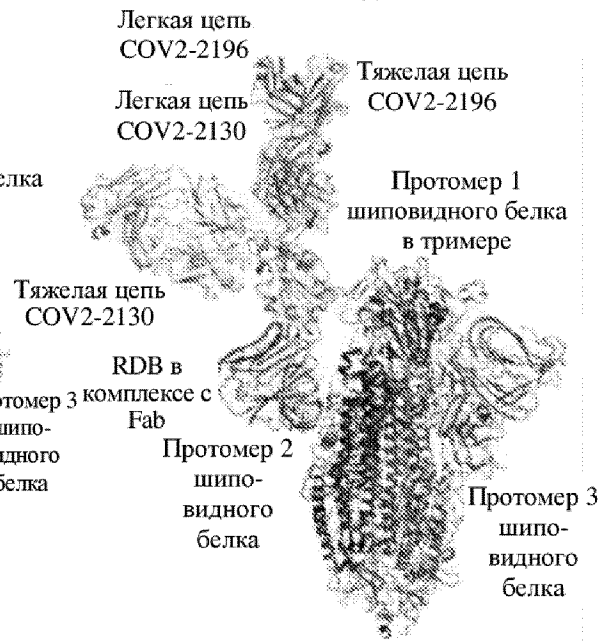
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В

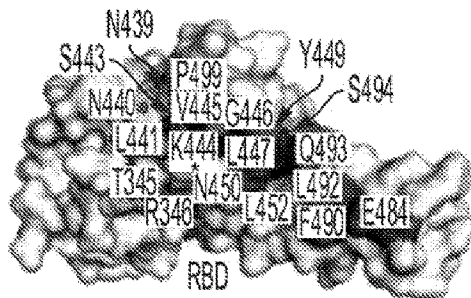


ФИГ. 9С



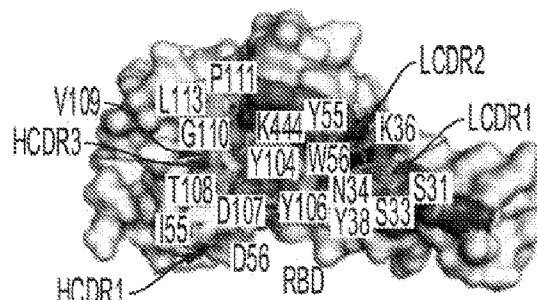
ФИГ. 9D

Контактные остатки COV2-2130 на RBD



ФИГ. 9Е

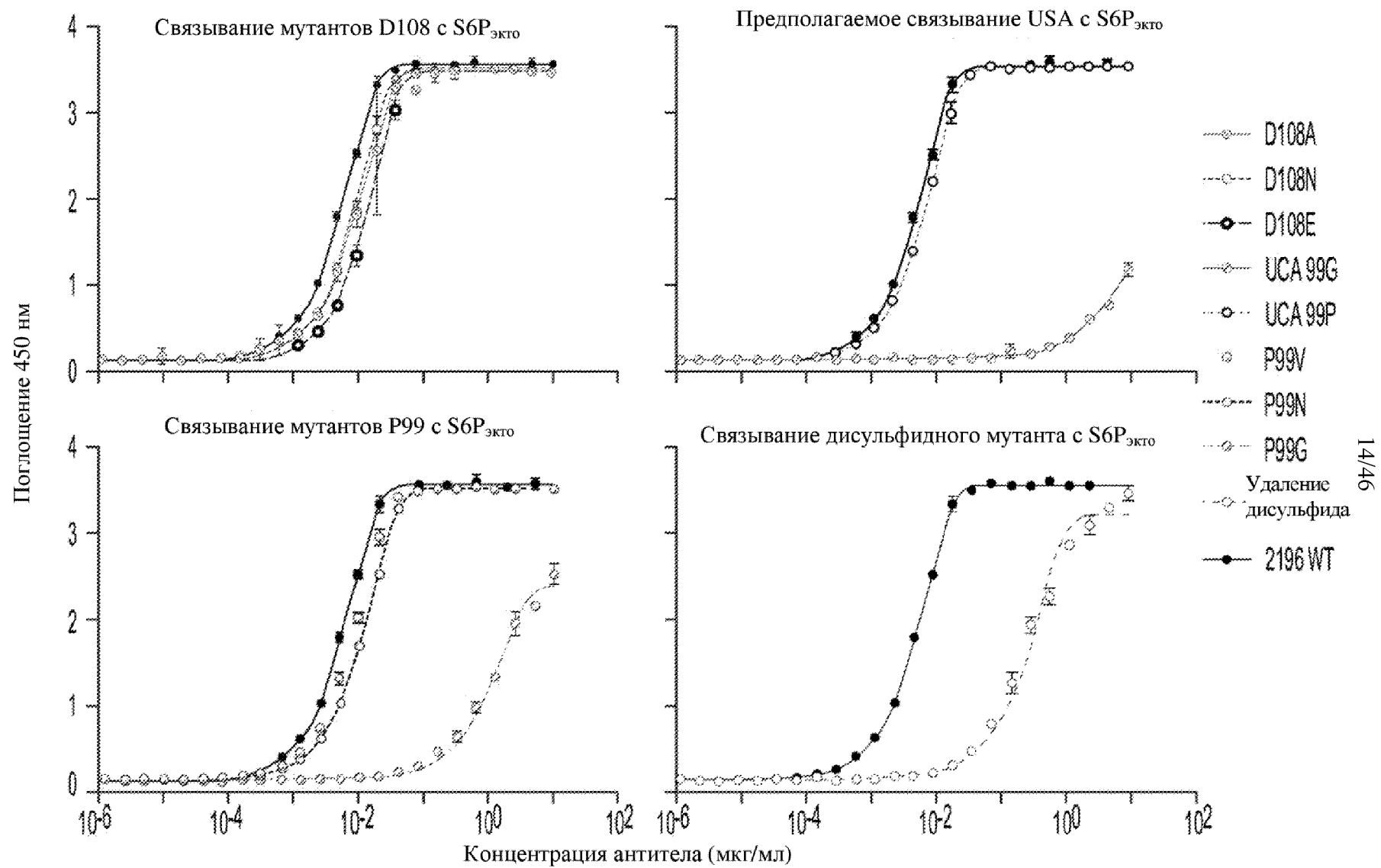
CDR COV2-2130 на контактных остатках RBD



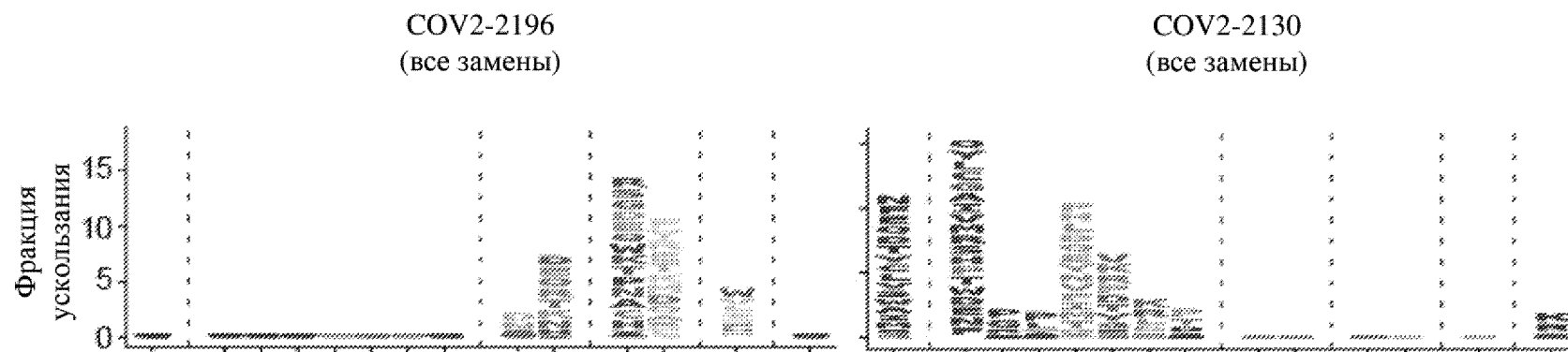
ФИГ. 9F

ген	Тяжелая цепь		Легкая цепь		Ссылка
	FR2-HCDR2	HCDR3-FR4	LCDR1-FR2	LCDR3-FR4	
<i>IGHV1-58</i>	IGWIV	CAA.....			
<i>IGHD2-2</i>		...GYCSSTS C YA.....			
<i>IGHD2-8</i>		...GYCTNGV C YA.....			
<i>IGHD2-15</i>		...GYCSGGS C YS.....	<i>IGKV3-20</i> SSYLAW	QYGSSP.....	
<i>IGHJ3*02</i>		DAFDIW	<i>IGKJ1*01</i>	WTFG	
mAb	4A	9A	31	91	
COV2-2196	IGWIV	CAAPYCSSTSCNDGFDIW	SSYLAW	HYGSSRGWTFG	Zost et al., 2020
COV2-2381	IGWIA	CAAPYCSRTSCHDAFDIW	SSYLAW	HFGSSSQWTFG	
COV2-2072	IGWIV	CAAPHCNRTSCYDAFDLW	SSYLGW	QYGSSP.WTTG	
MnC5t2p1_G1	IGWIV	CAAPRCSQQSCYDGFIDIW	SSYLAW	QYGSSP.WTFG	Kreer et al., 2020
HbnC3t1p2_C6	IGWIV	CAAPYCSSTRCYDAFDIW	SSYLAW	QYGRSP.WTFG	
HbnC3t1p1_C6	IGWIV	CAAPHCSSTICYDGFIDIW	SSYLAW	QYGSSP.WTTG	
S2E12	VGWIV	CASPYCSGGS C SDGFIDIW	SSYLAW	QYVGLTGWTFG	Tortonci et al., 2020
COV107_1	IGWIV	CAAPHCSSTSCFD DAF IDIW	SSYLAW	QYGN SP .WTFG	Robbiani et al., 2020
COV107_2	IGWIV	CAAPYCSGGS C SD DAF IDIW	SSYLAW	QYGSSP.WTFG	
COV72	IGWIV	CAAVDCNSTSCYDAFDIW	SSYLAW	QYDISP.WTTG	
COV21_1	IGWIV	CAAPHCSGGS CLDAF IDIW	SSYLAW	QYGSSP.WTFG	
COV21_2	IGWIV	CAAPHCSGGS CYDAF IDIW	SSYLAW	QYGSSP.WTFG	
COV57_1	IGWIV	CAANHCSGGS CYDGF IDIW	SSYLAW	QYGSSP.WTTG	
COV57_2	IGWIV	CAAPYCSGGS CNDAF IDIW	SSYLAW	QYGSSP.WTTG	

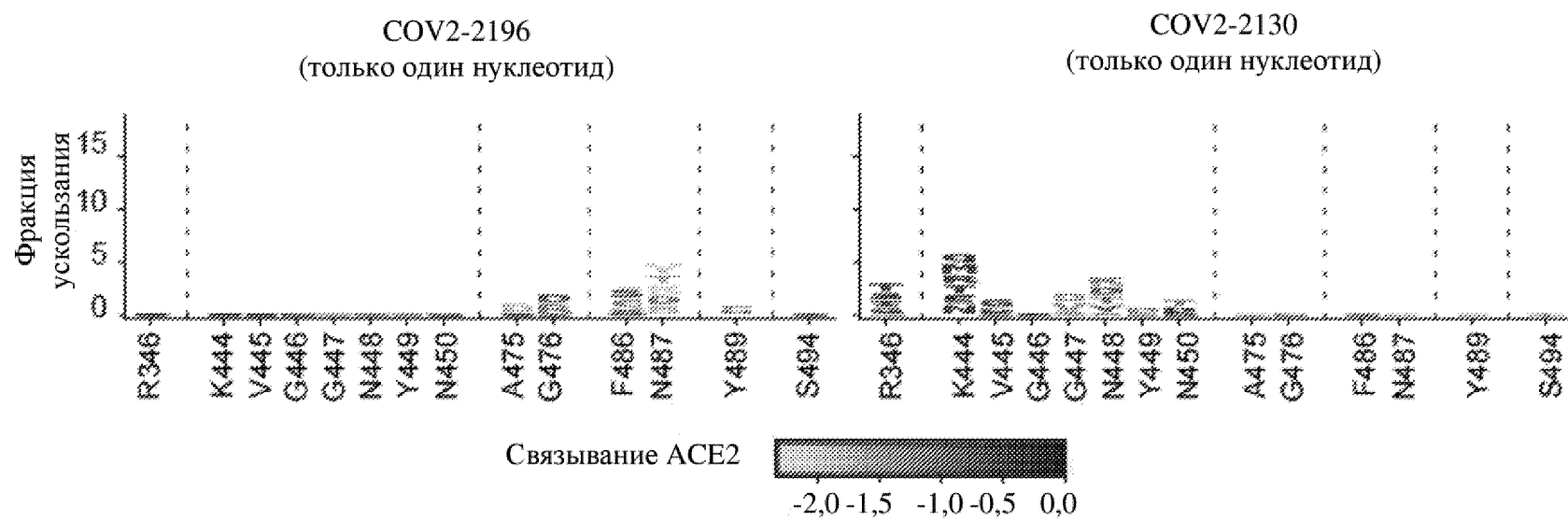
ФИГ. 10А



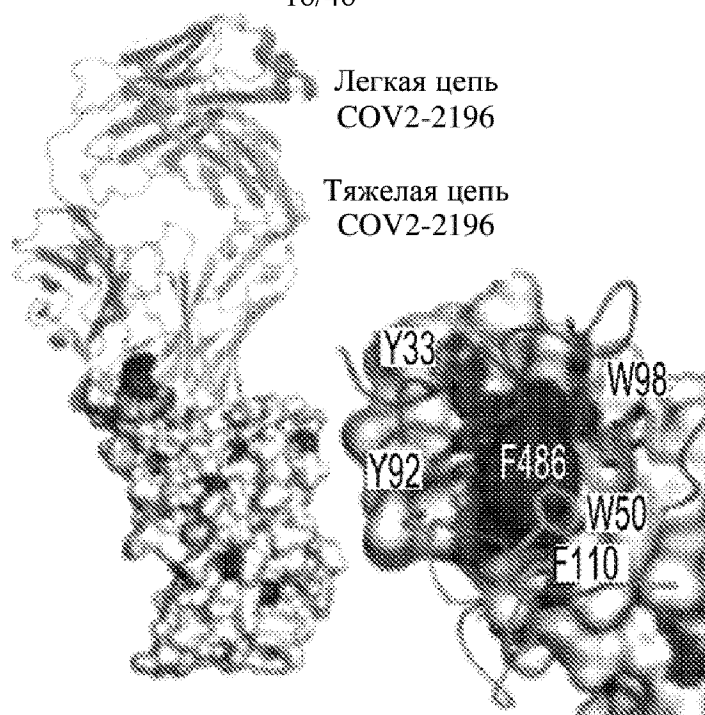
ФИГ. 10В



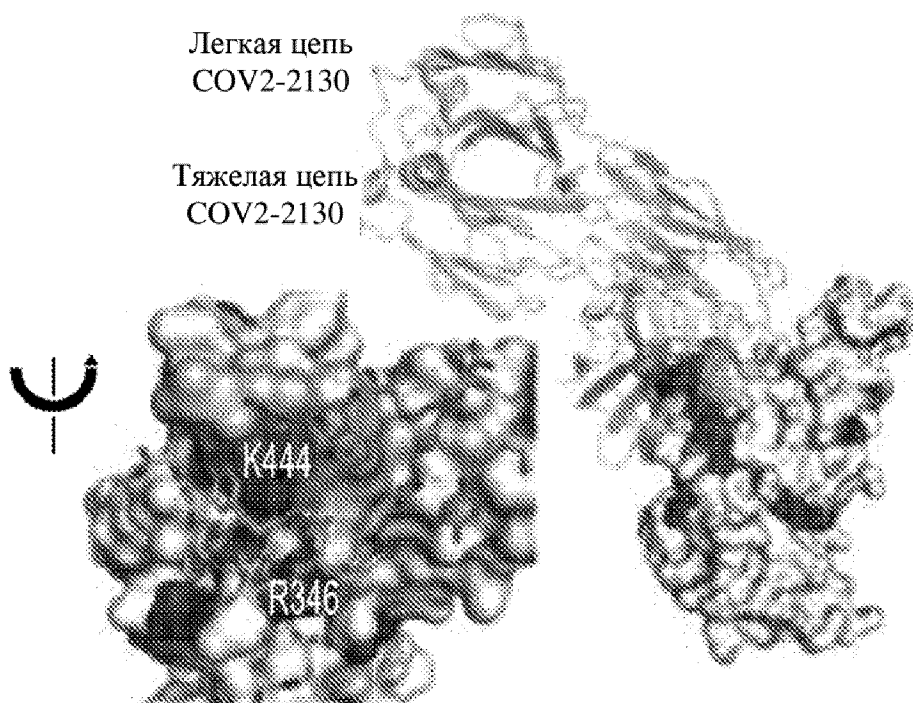
ФИГ. 11A



ФИГ. 11B



ФИГ. 11С



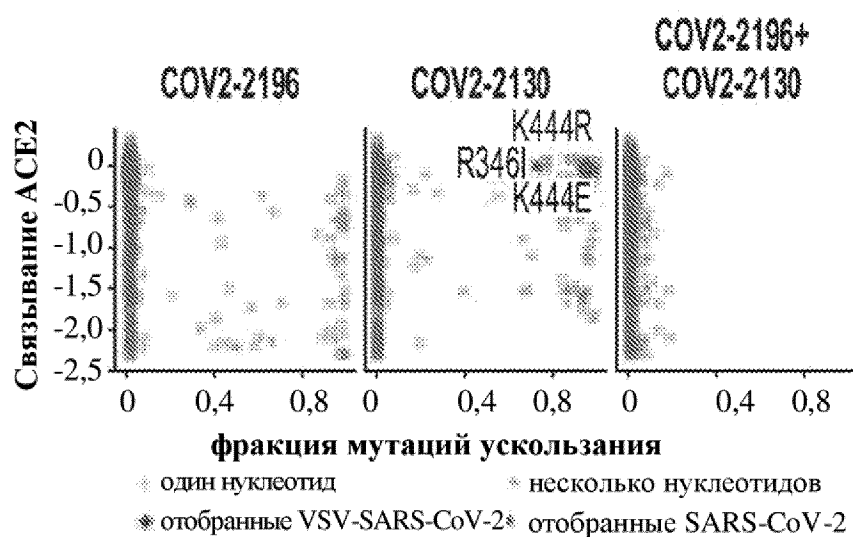
ФИГ. 11D

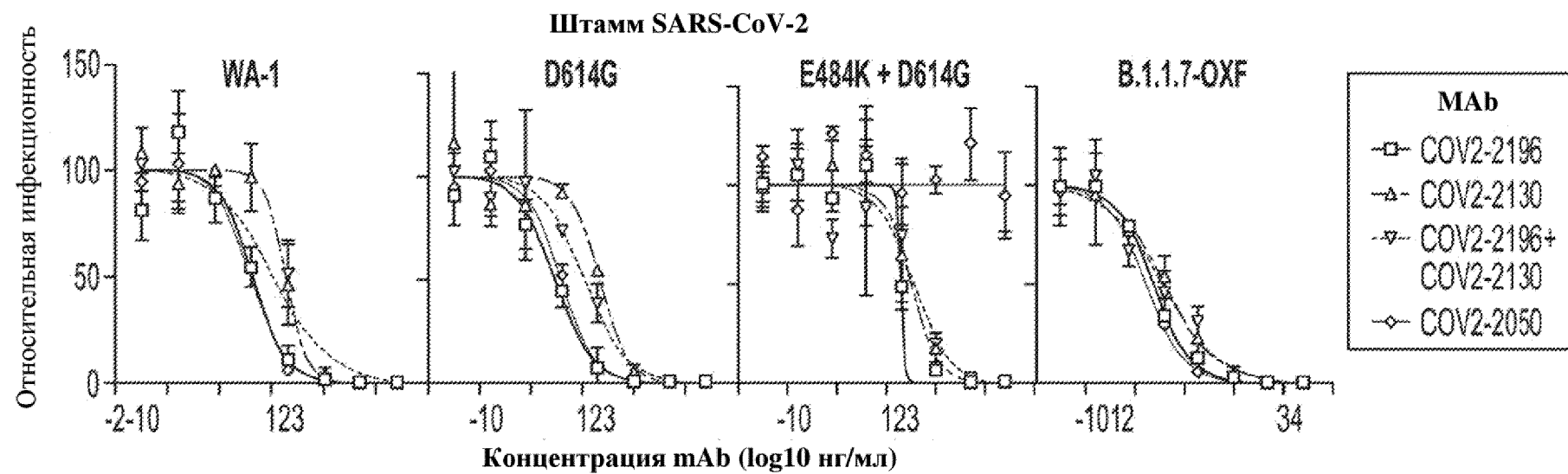
Отбор вариантов VSV-SARS-CoV-2 с ускользанием

Условия отбора	Повторы с ускользанием/общее	Идентифицированные мутации
COV2-2196	0/88 (0%)	N/A
COV2-2130	8/20 (40%)	K444R (6), K444E (2)
Смесь (2196+2130)	0/104 (0%)	N/A

ФИГ. 11E**Отбор вариантов с устойчивостью к SARS-CoV-2**

Условия пассирования	Условия теста	Обнаружена устойчивость	Идентифицированные мутации
AZD8895 (COV2-2196)	AZD8895 AZD7442	Нет Нет	N/A
AZD1061 (COV2-2130)	AZD1061 AZD7442	Да	N74K, R346I
		Нет	N/A
AZD7442 (смесь)	AZD7442	Нет	N/A

ФИГ. 11F**ФИГ. 11G**



ФИГ. 11Н

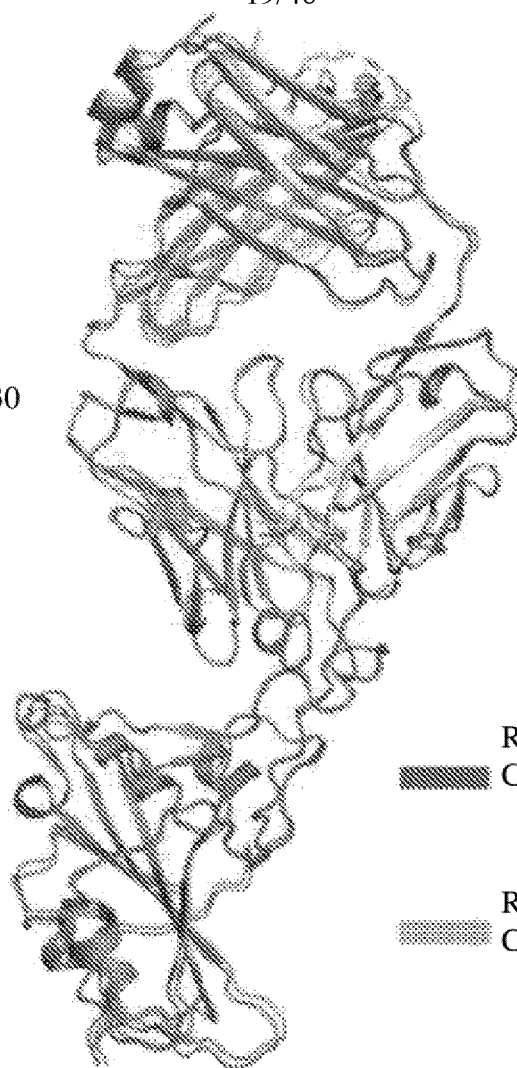
19/46

Легкая цепь в
комплексе
COV2-2196

Легкая цепь в
комплексе
COV2-2196-2130

Тяжелая цепь в
комплексе
COV2-2196

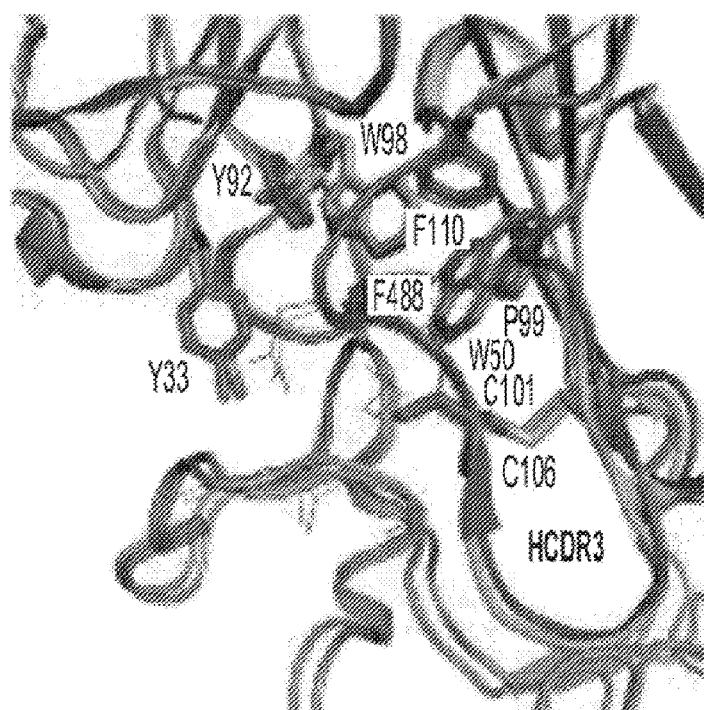
Тяжелая цепь в
комплексе
COV2-2196-21



RBD в комплексе
COV2-2196-2130

RBD в комплексе
COV2-2196

ФИГ. 12



Тяжелая цепь

COV2-2196 HC

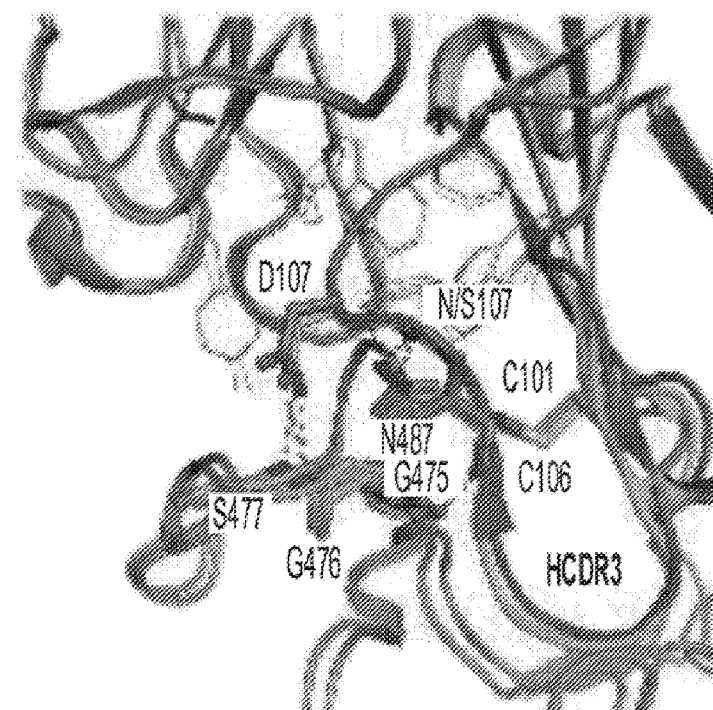
S2E12 HC

Легкая цепь

COV2-2196 LC

S2E12 LC

ФИГ. 13А

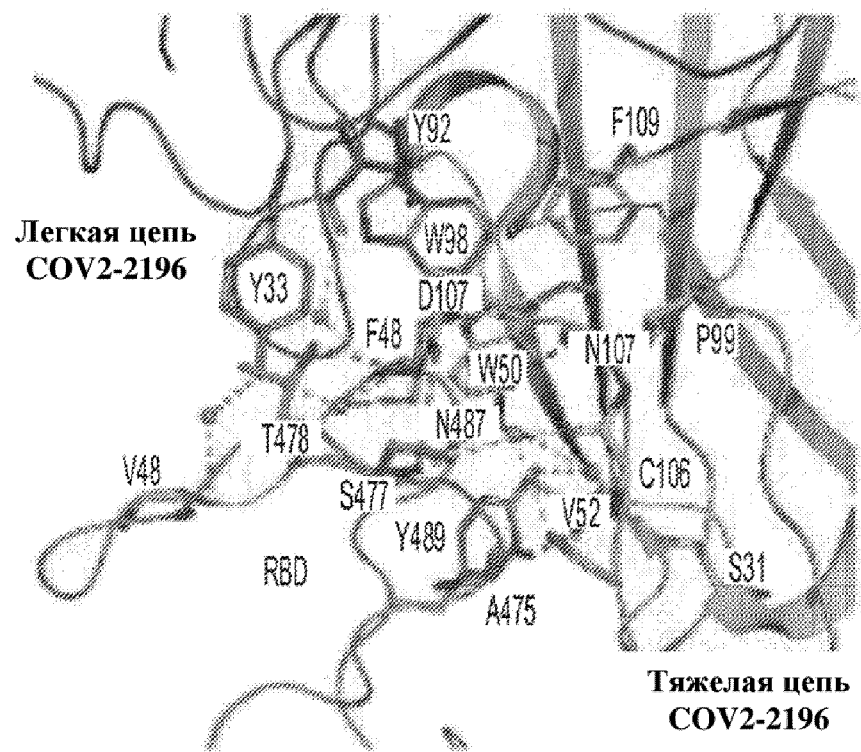


RBD

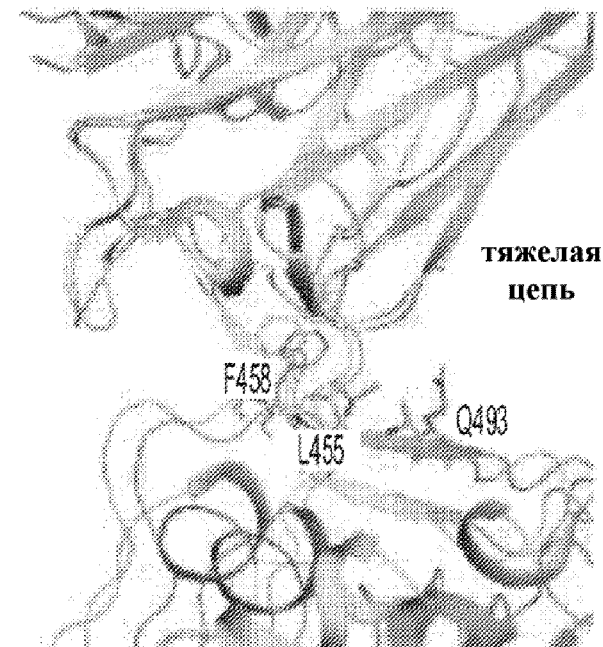
COV2-2196/RBD

S2E12/RBD

ФИГ. 13В

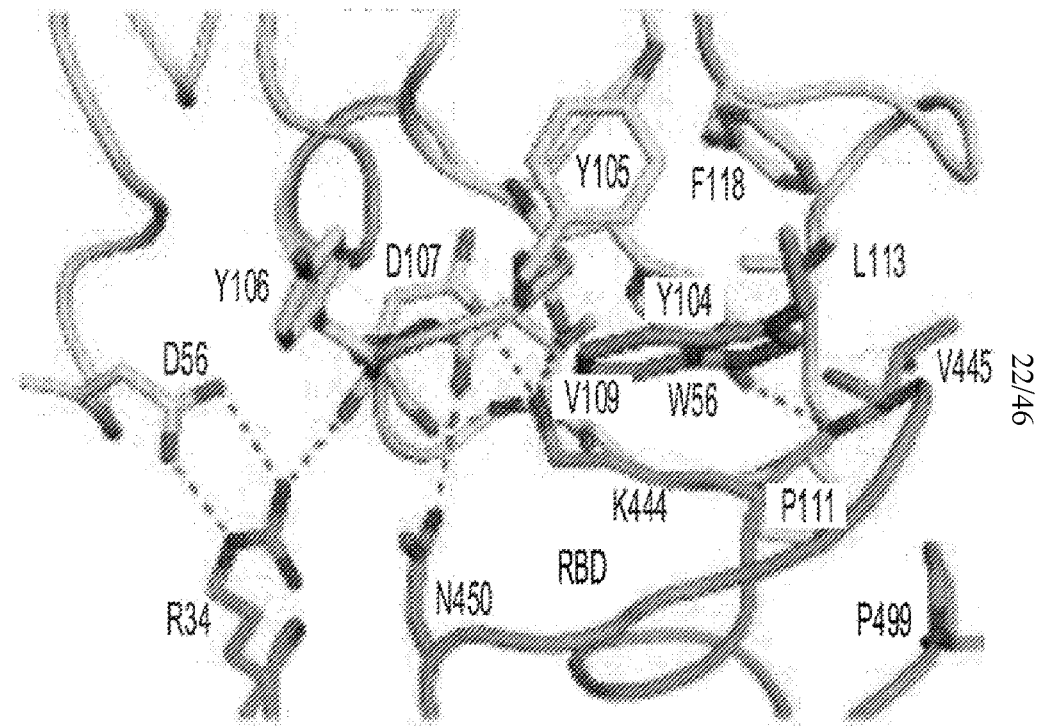


ФИГ. 13С



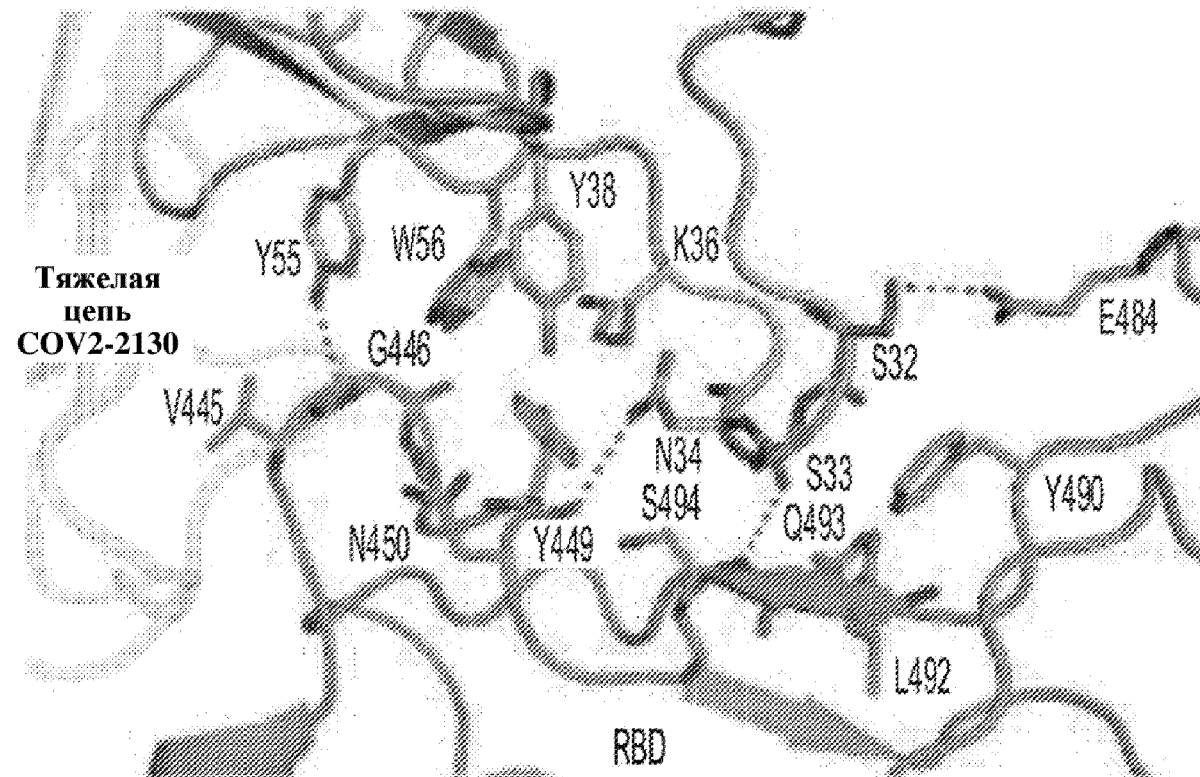
ФИГ. 13D

**Тяжелая цепь
COV2-2130**



ФИГ. 13Е

Легкая цепь
COV2-2130



23/46

ФИГ. 13F



ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



ФИГ. 14С



ФИГ. 14D



ФИГ. 14Е

Тяжелая цепь

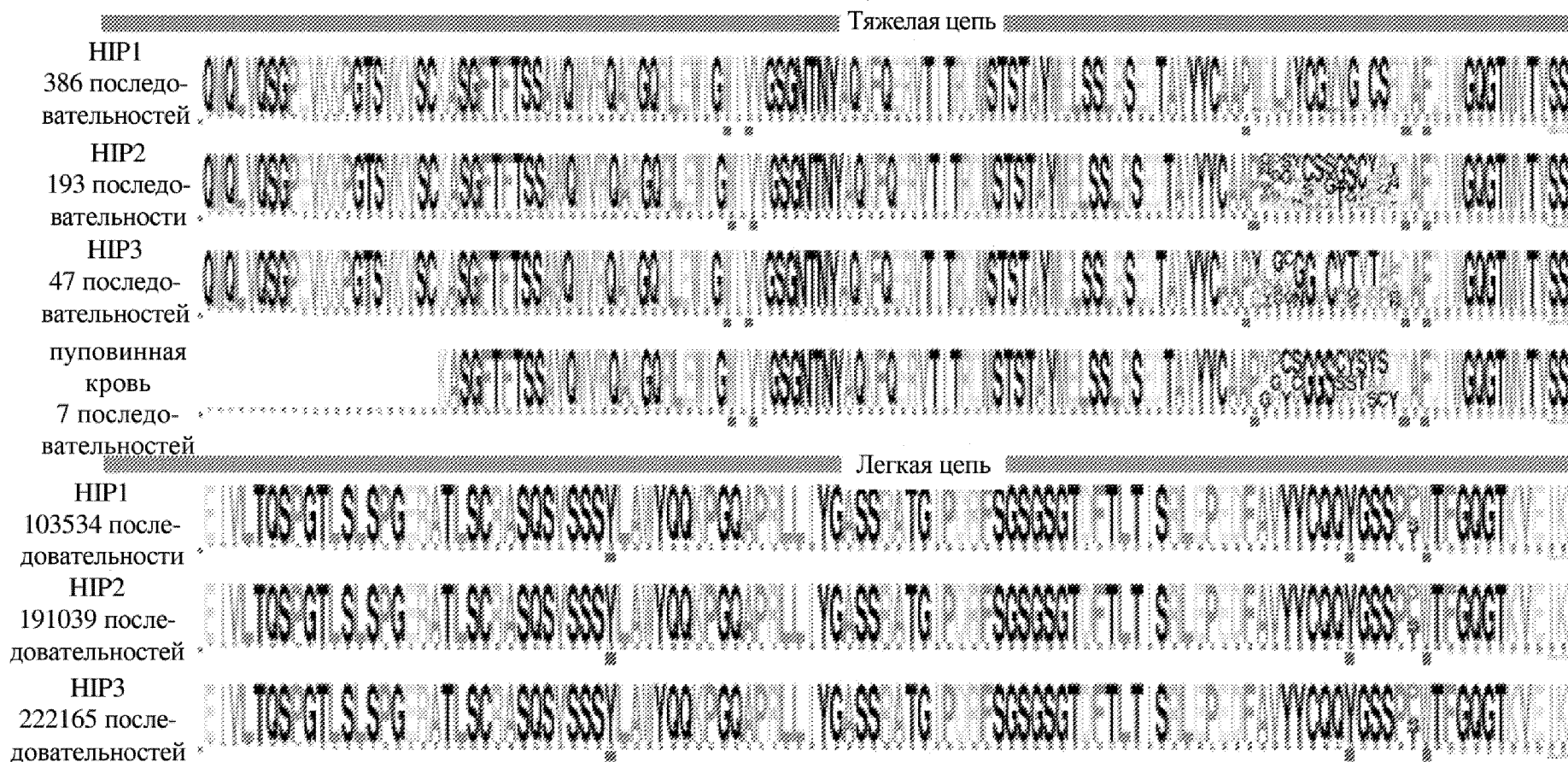
COV2-2196 HC	S2E12 HC
COV2-2381 HC	COV2-2072 HC

Легкая цепь

COV2-2196 LC	S2E12 LC
COV2-2381 LC	COV2-2072 LC

RBD

RBD/COV2-2196	RBD/S2E12
RBD/COV2-2381	RBD/COV2-2072



ФИГ. 15А

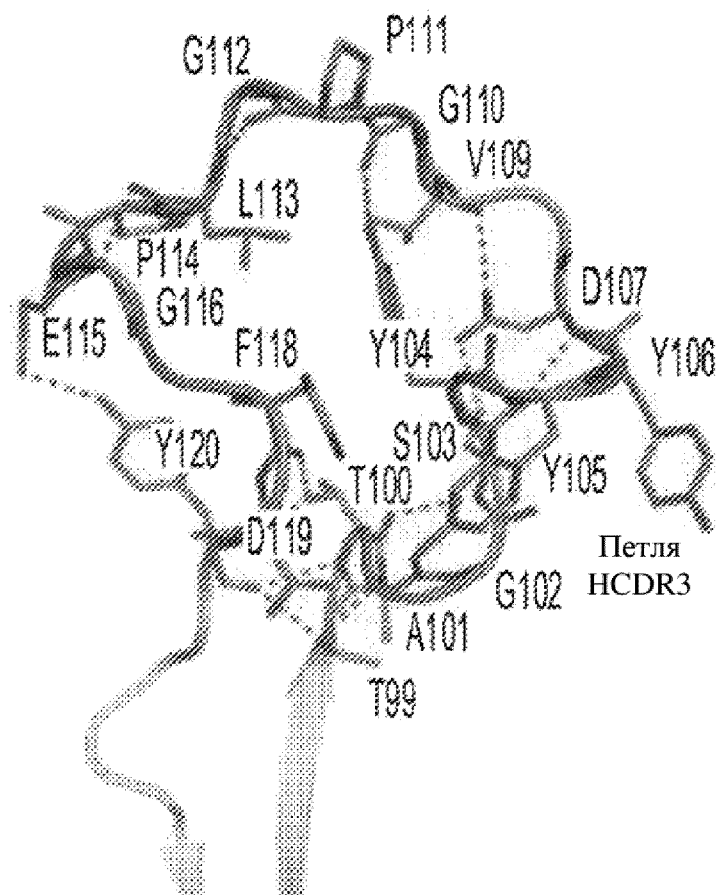
Субъект	Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей легкой цепи	Число последовательностей
---------	---	---------------------------

HIP1	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-PWTFGQGTKVEIK	2323
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	1087
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-LWTFGQGTKVEIK	1086
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-SWTFGQGTKVEIK	601
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTWTFGQGTKVEIK	539

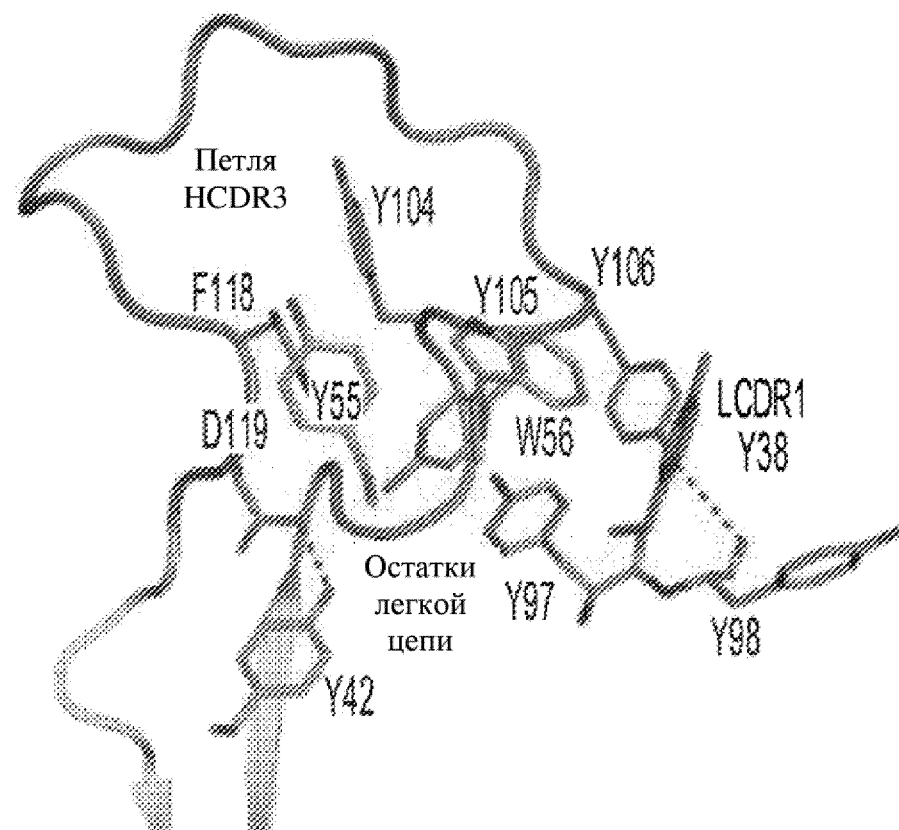
HIP2	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-PWTFGQGTKVEIK	3909
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-LWTFGQGTKVEIK	2205
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	1747
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-SWTFGQGTKVEIK	1246
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTWTFGQGTKVEIK	1230

HIP3	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-PWTFGQGTKVEIK	3908
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-LWTFGQGTKVEIK	1889
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	1809
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-SWTFGQGTKVEIK	1293
	EIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTWTFGQGTKVEIK	953

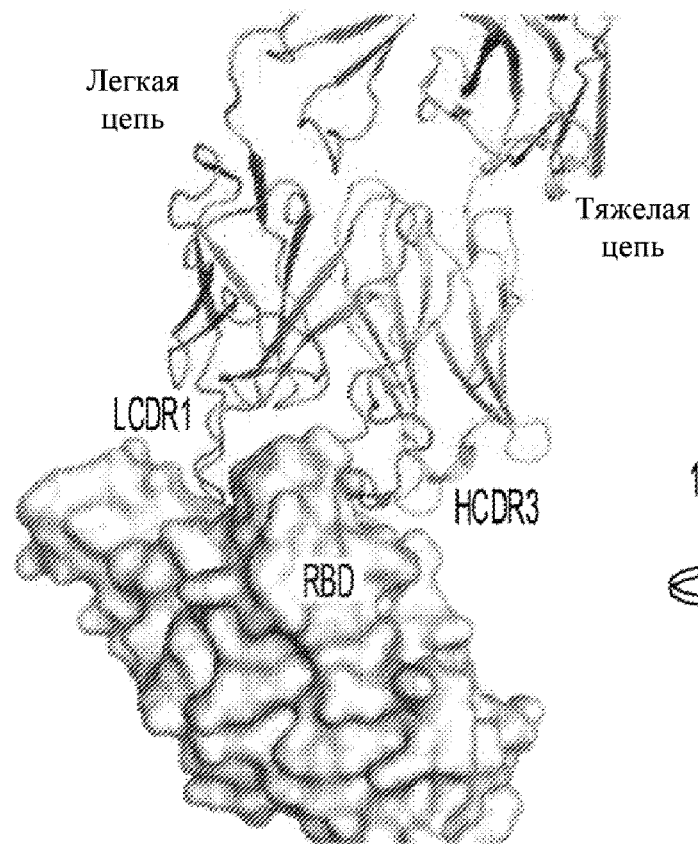
26/46



ФИГ. 16А

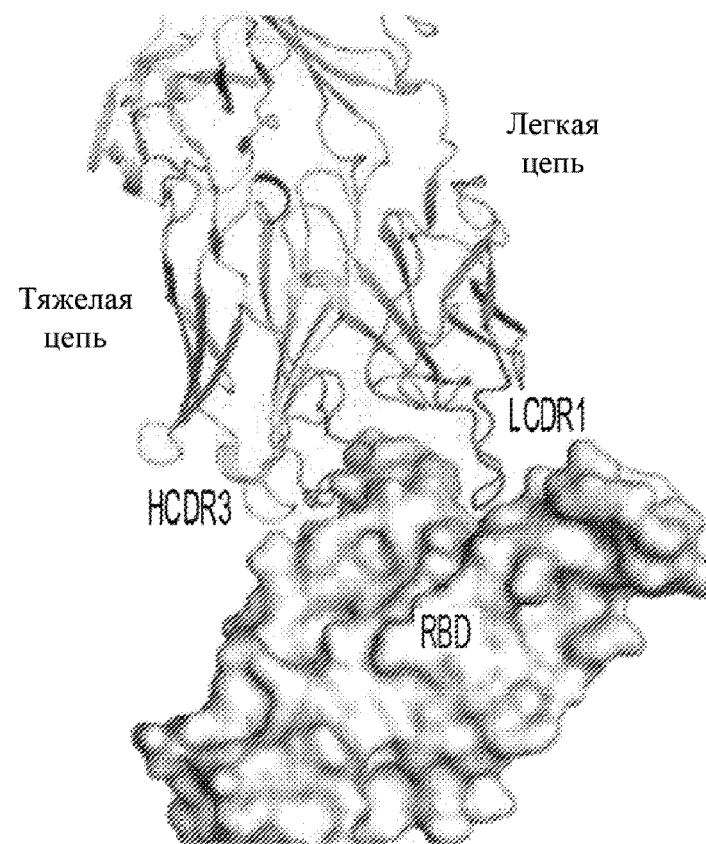


ФИГ. 16В



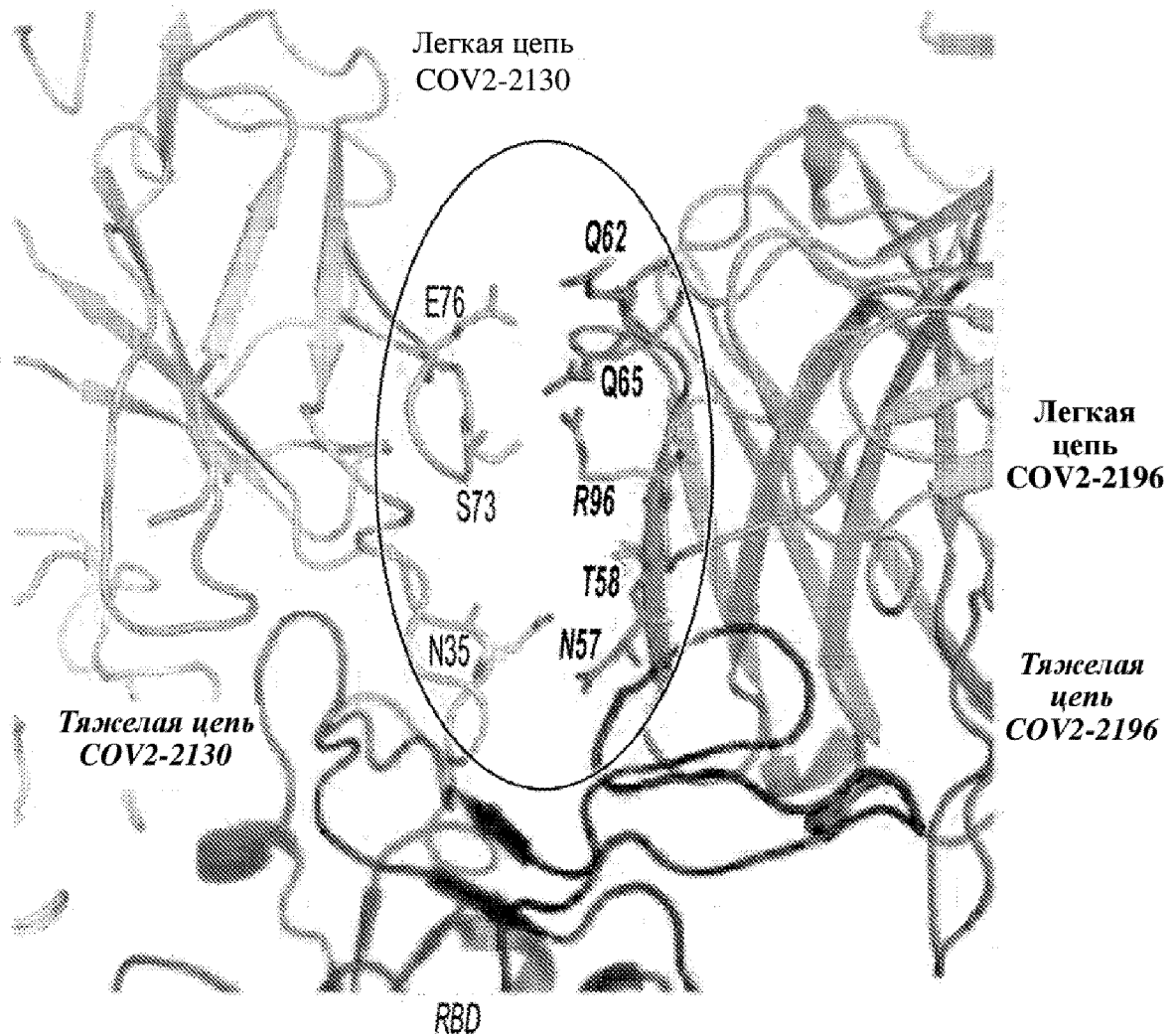
ФИГ. 16C

180°



ФИГ. 16D

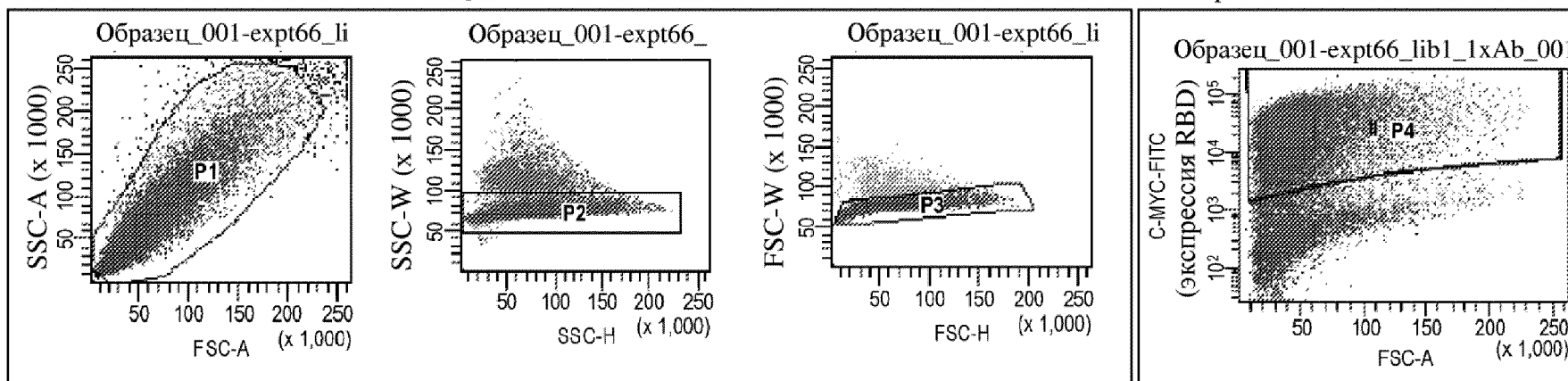
**Взаимодействие Fab COV2-2130 и Fab
COV2-2196 при связывании с RBD**



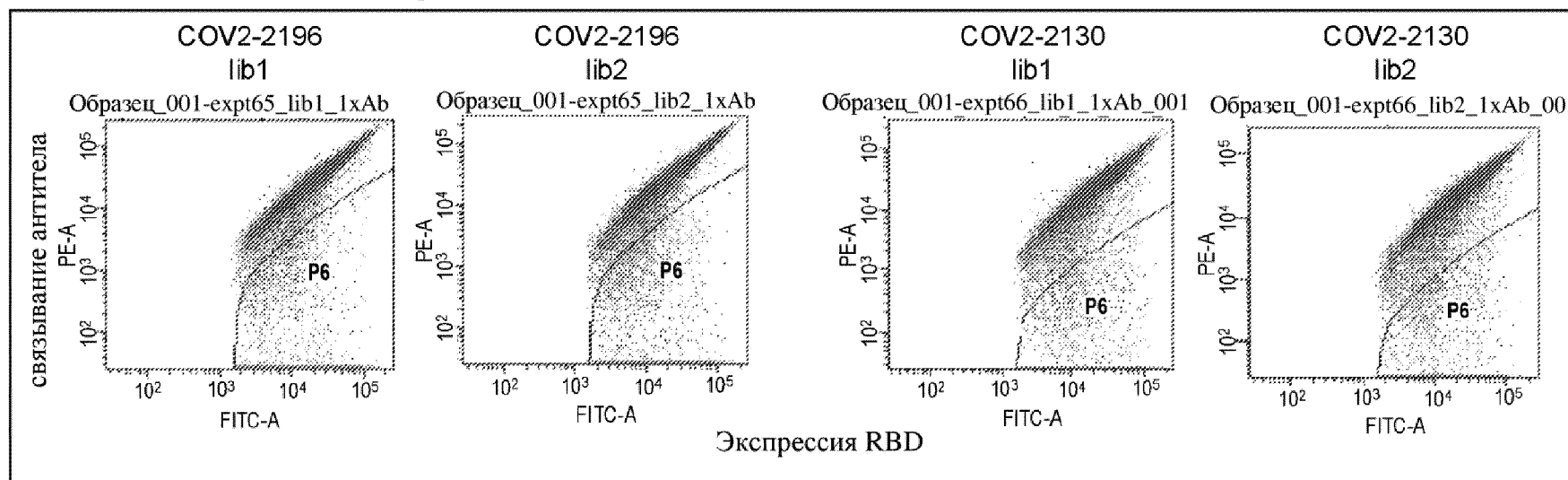
ФИГ. 17

отбор в отношении одиночных клеток

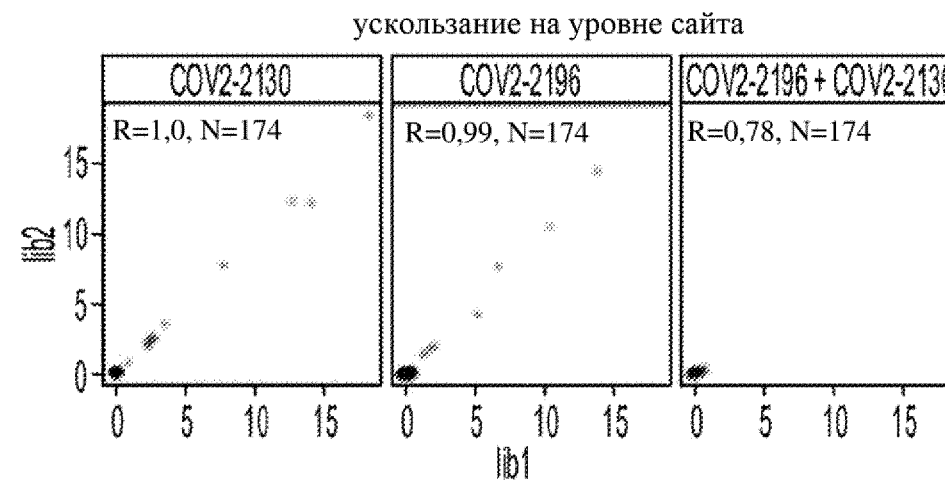
отбор в отношении RBD+ клеток



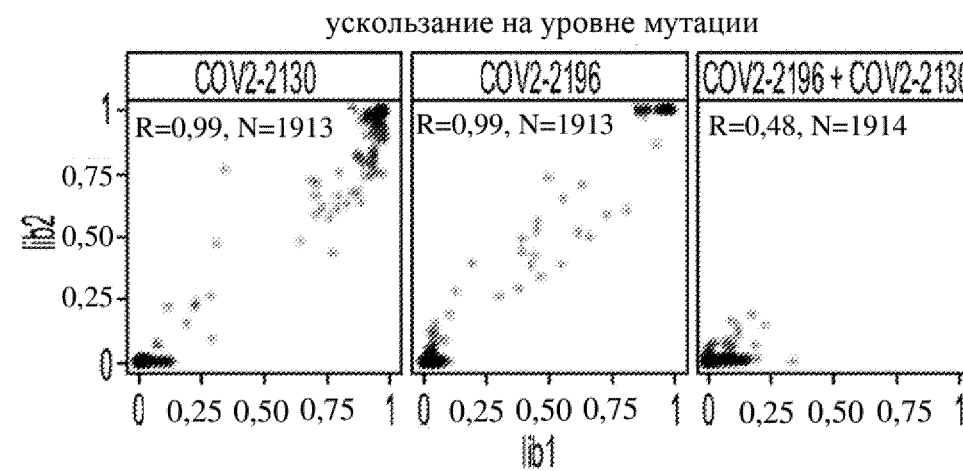
отбор в отношении RBD+ клеток со сниженным связыванием антитела



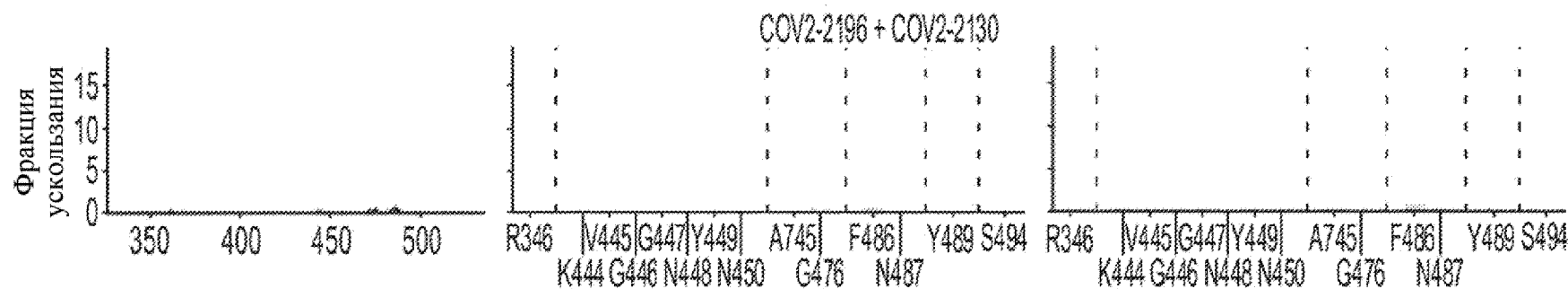
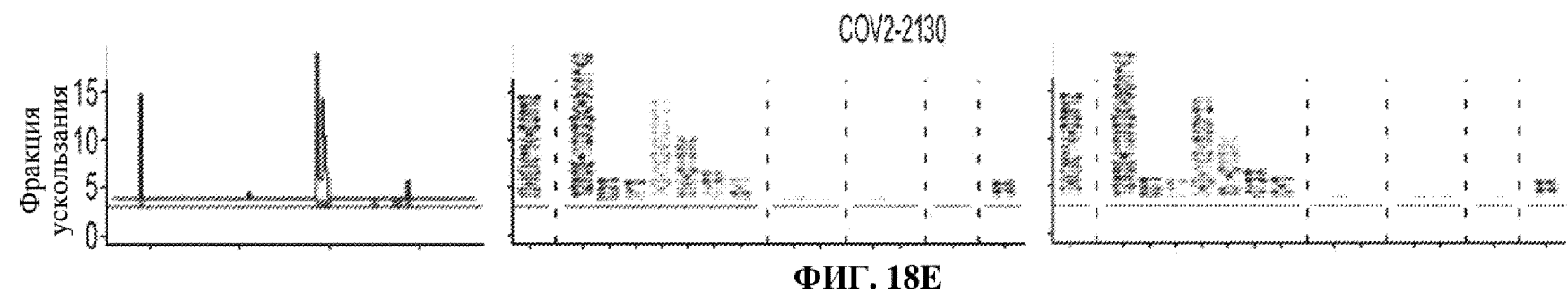
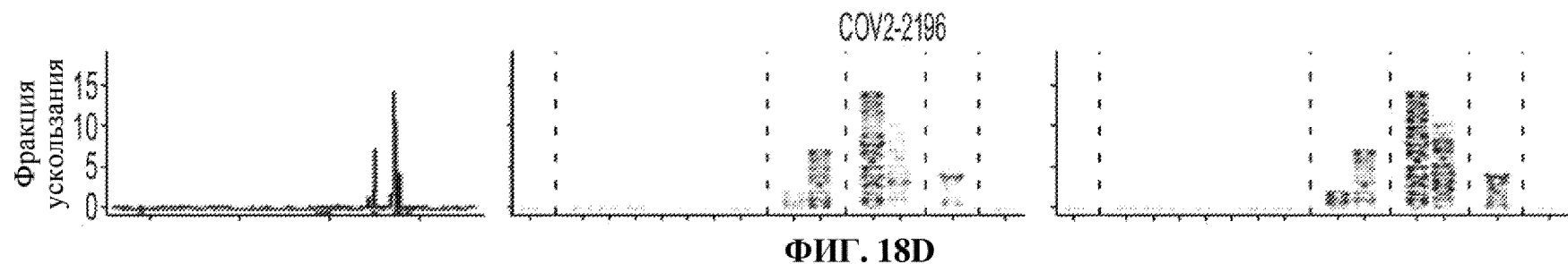
ФИГ. 18А



ФИГ. 18В



ФИГ. 18С



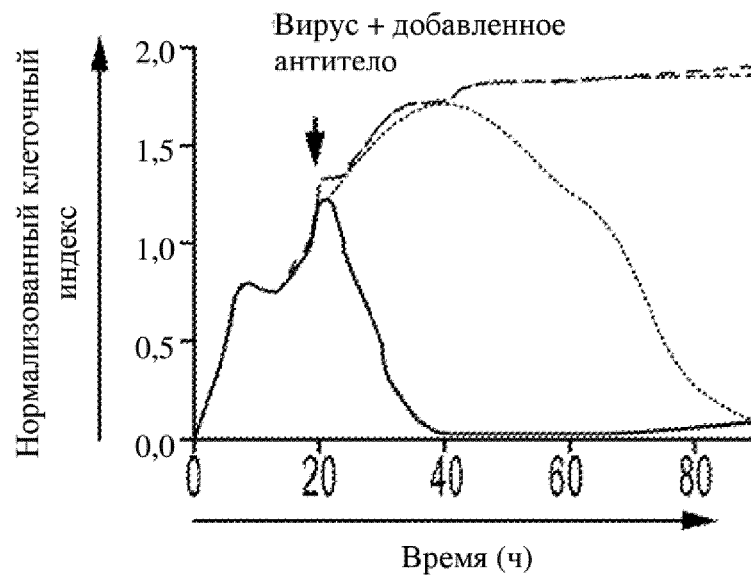
Связывание ACE2

-2,0 1,5 1,0 0,5 0,0

Экспрессия RBD

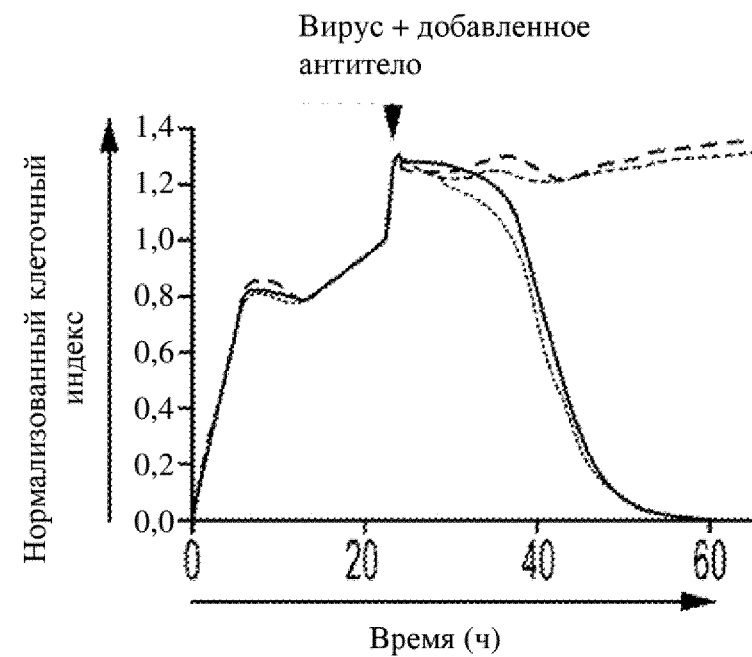
-1,0 -0,8 -0,6 0,4 -0,2 0,0

— Вирус без контроля антитела
 ~ ~ ~ ~ Без инфекционного контроля
 - - - - - Нейтрализация COV2-2130
 Ускользание от COV2-2130

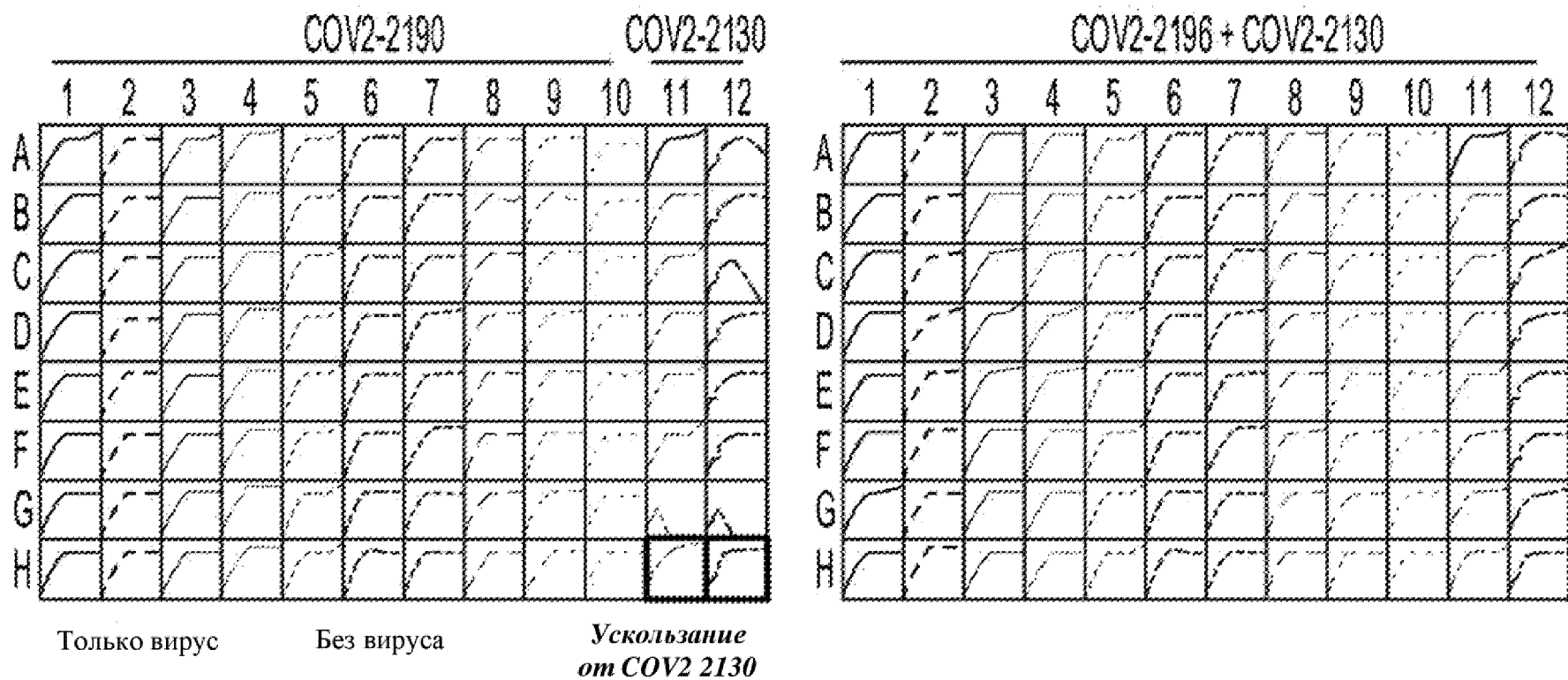


ФИГ. 18G

— Ускользание вируса от COV2-2130 (без антитела)
 - - - ~ Без инфекционного контроля
 - - - - - Ускользание вируса от COV2-2130 + COV2-2196
 Ускользание вируса от COV2-2130 + COV2-2130

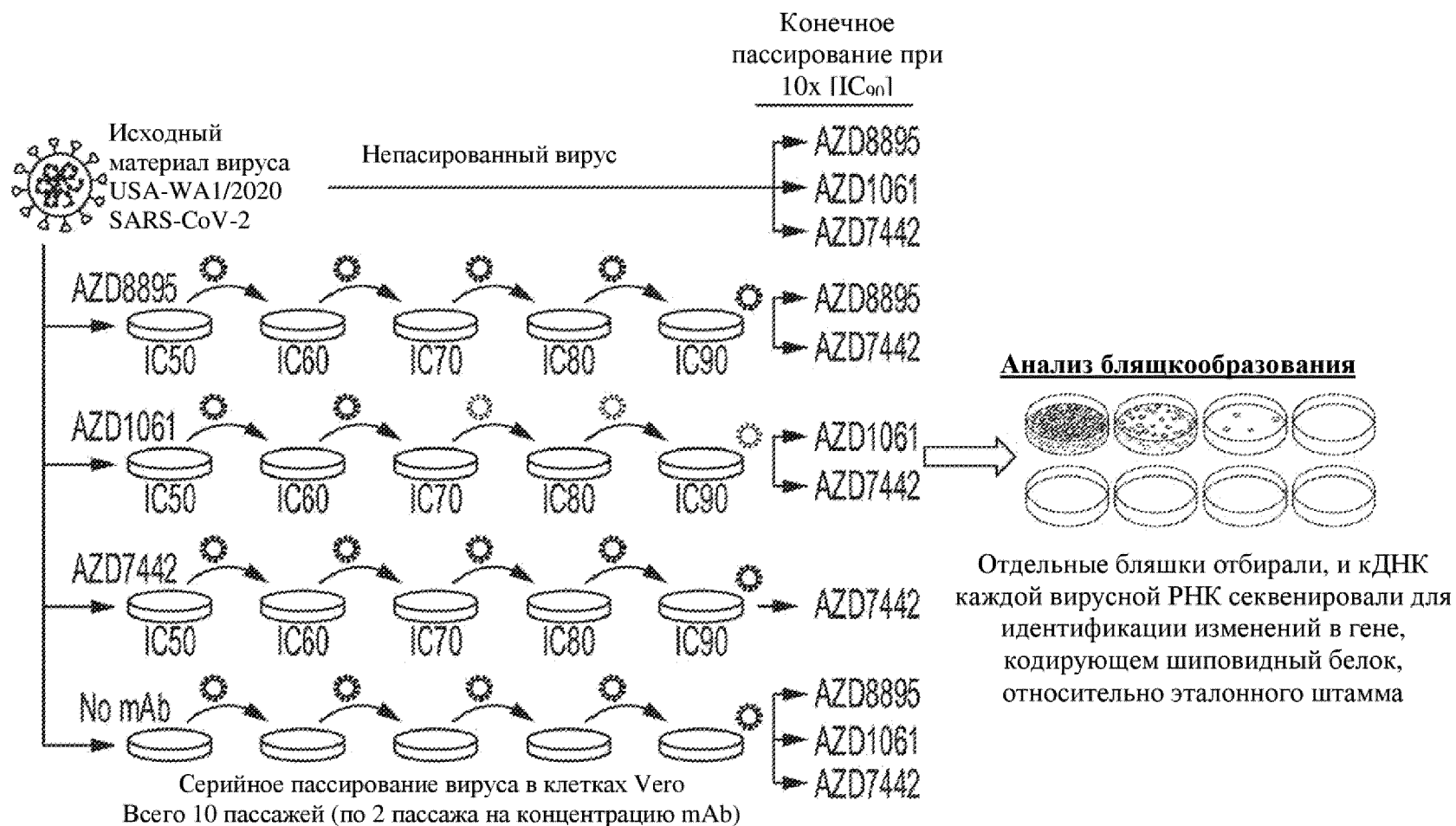


ФИГ. 18H

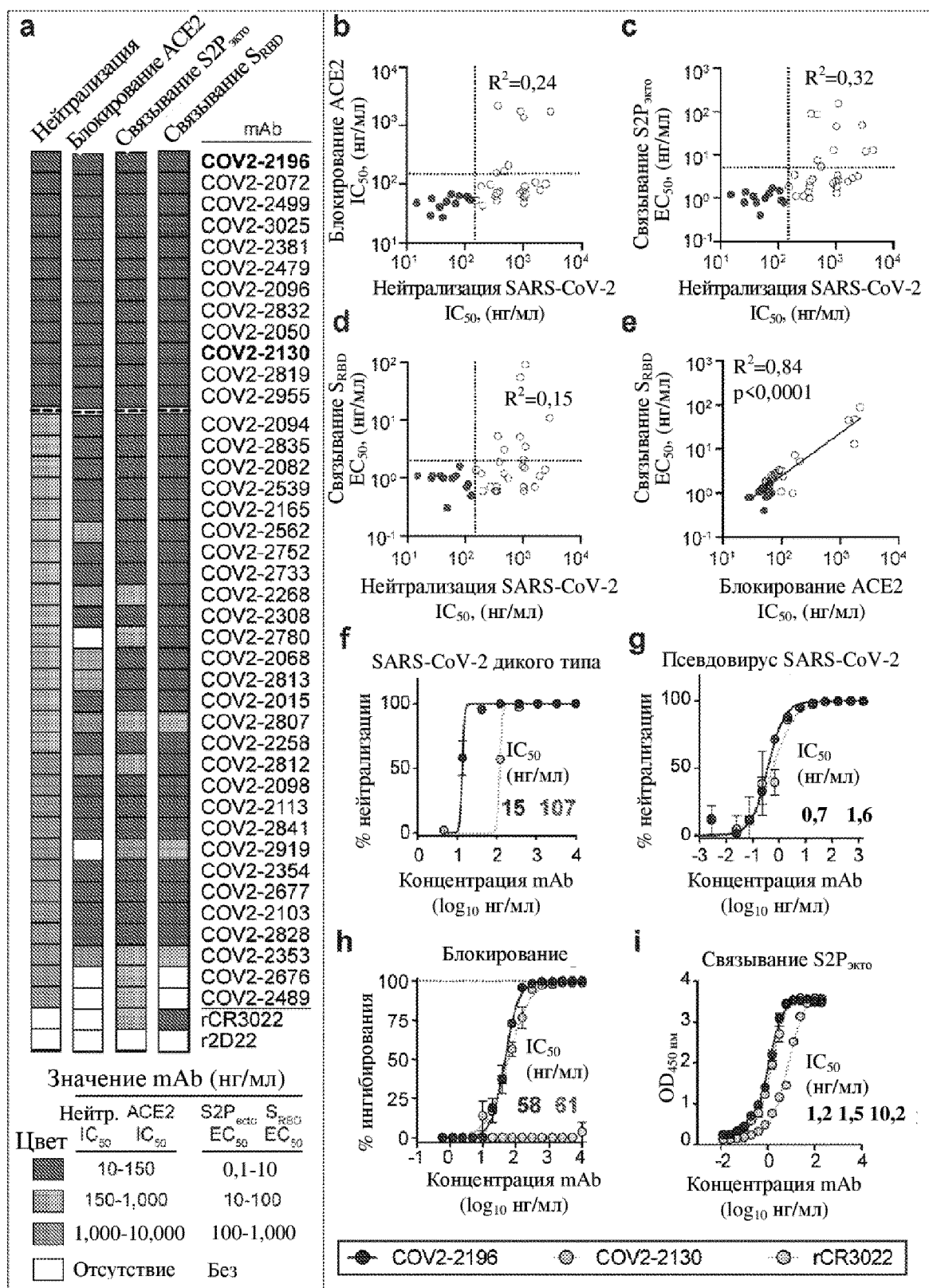


ФИГ. 18I

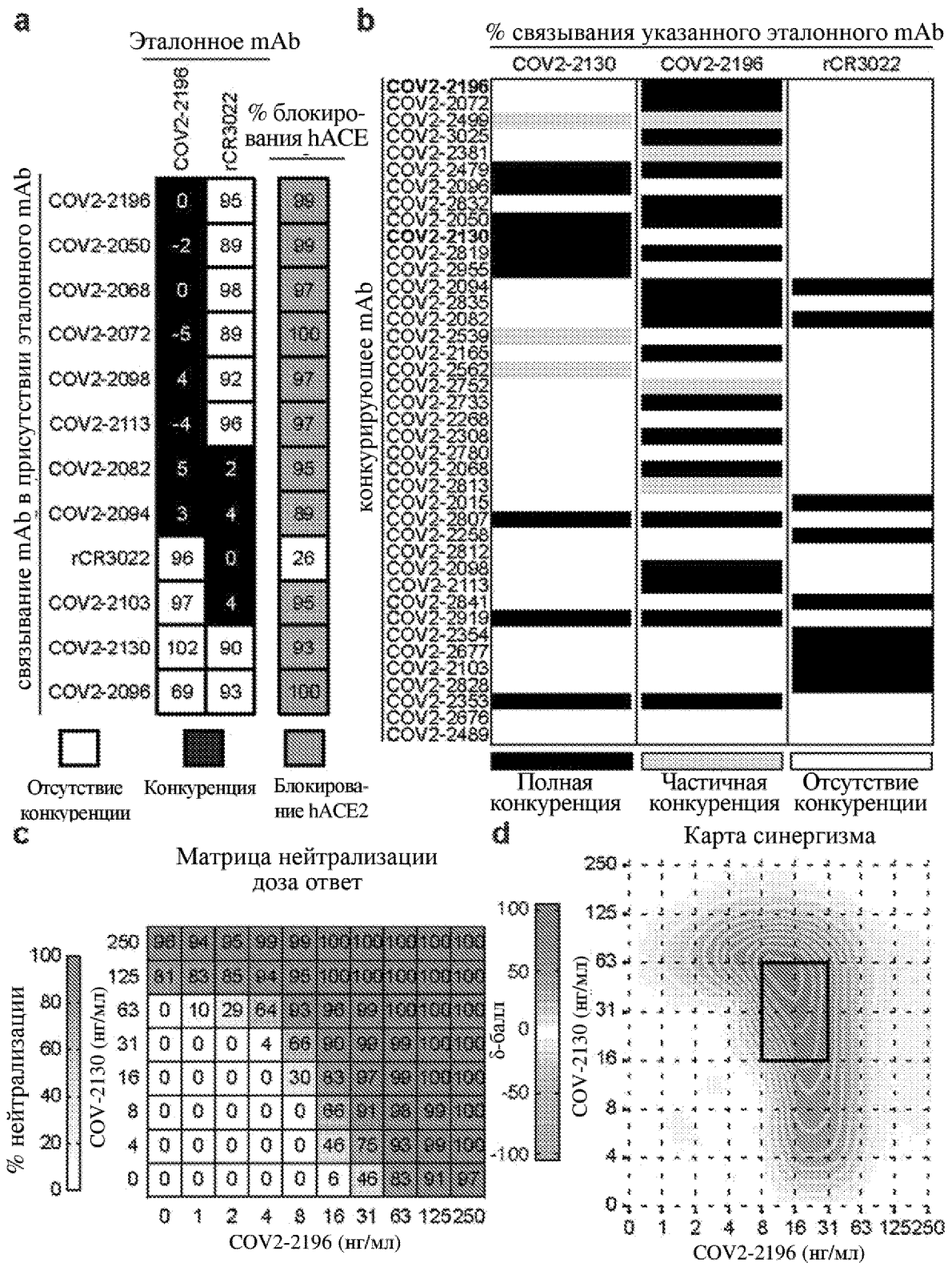
Способ серийного пассирования и тестирования SARS-CoV-2 для отбора устойчивых к mAb
вариантов шиповидного белка



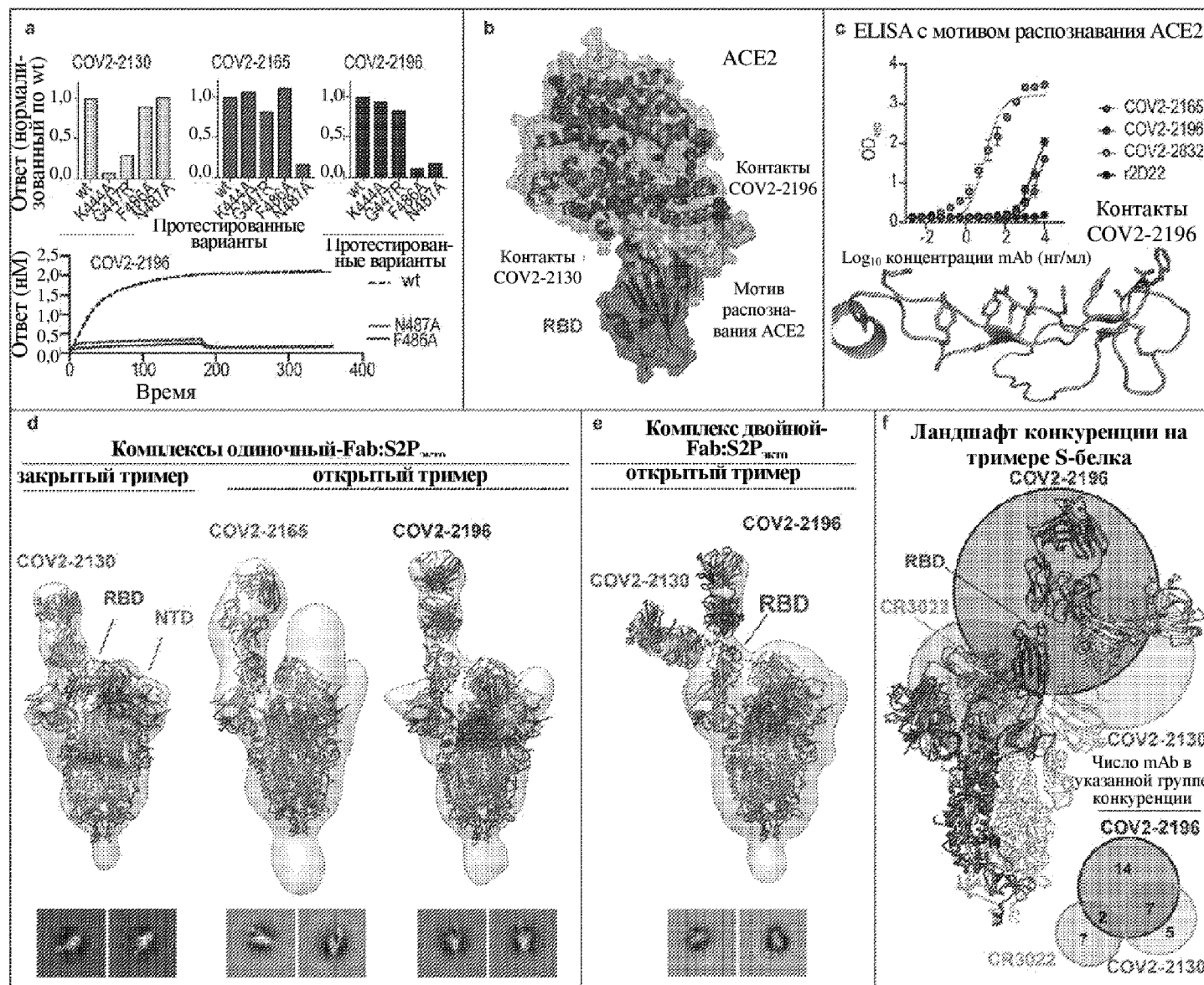
ФИГ. 19



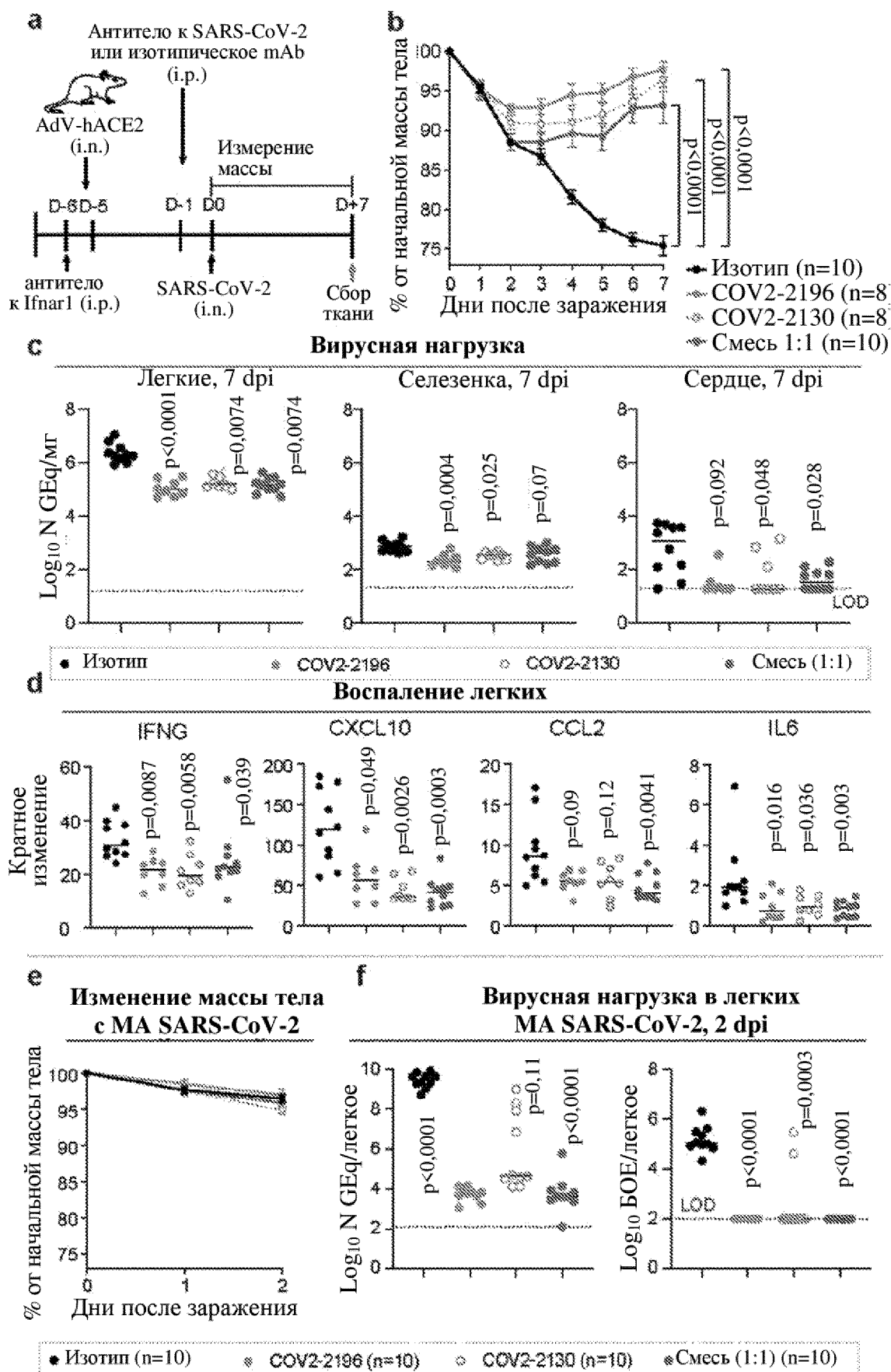
ФИГ. 20



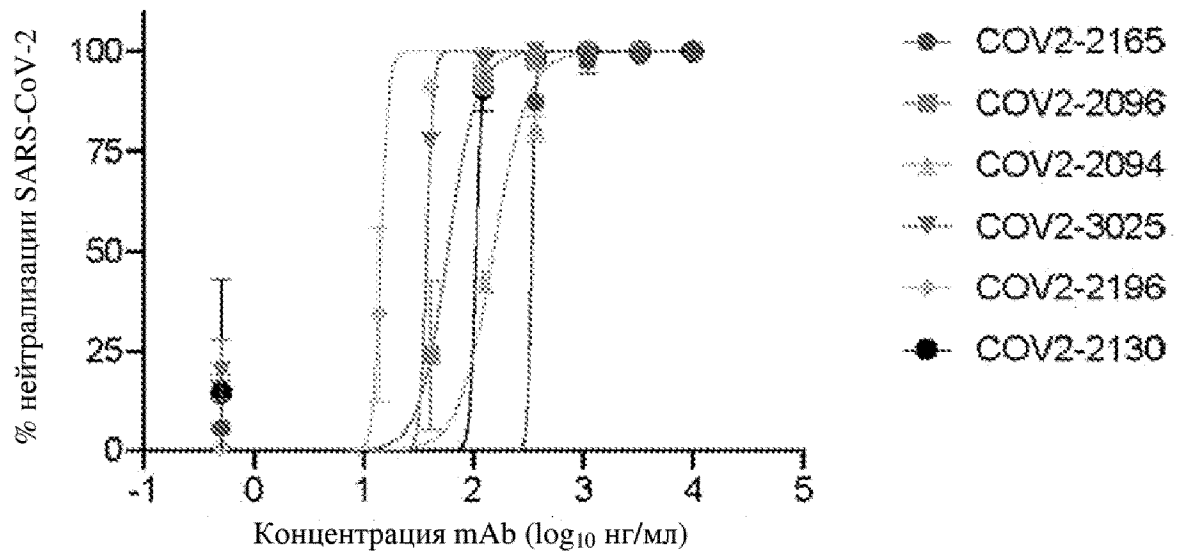
ФИГ. 21



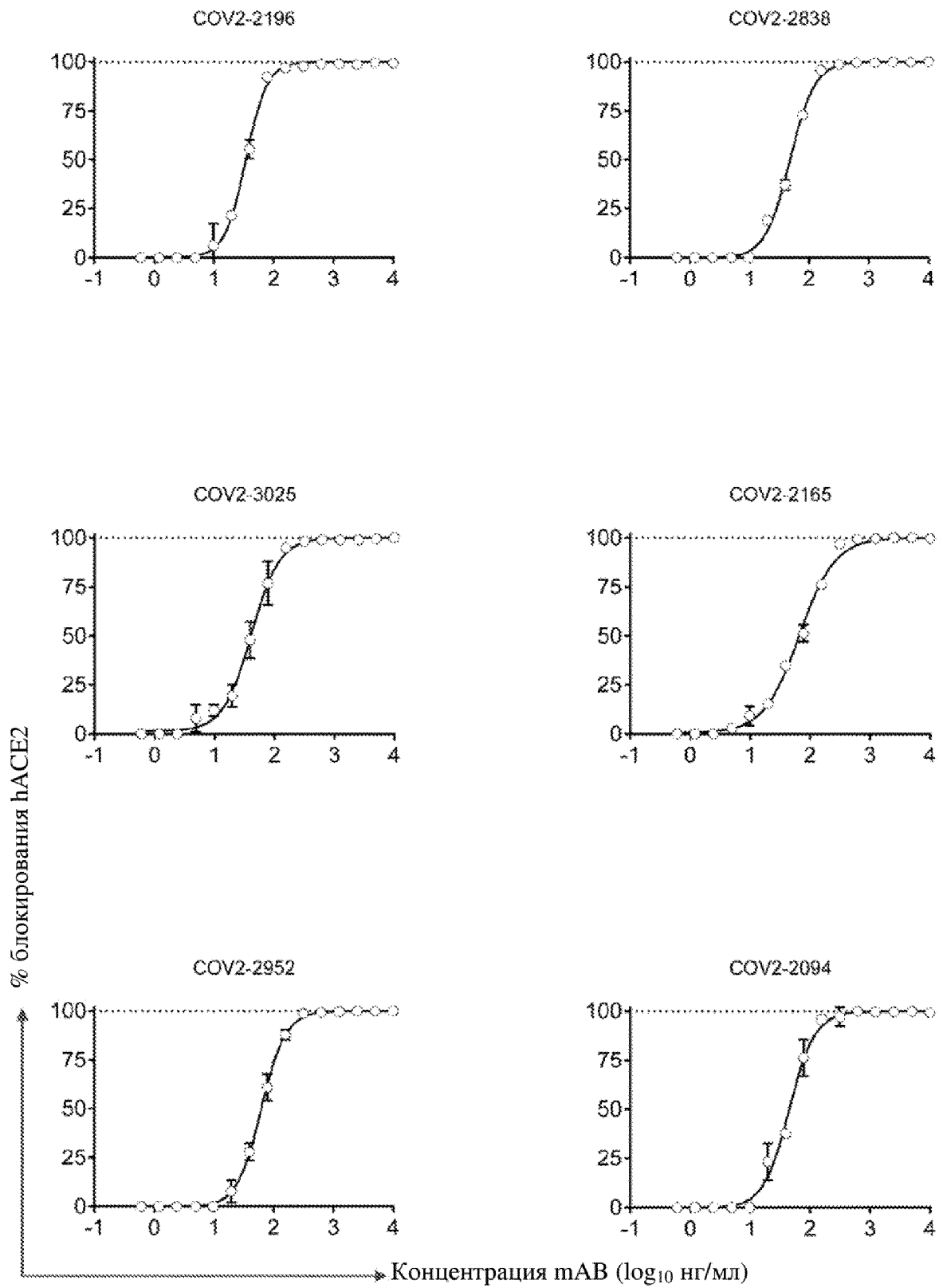
ФИГ. 22



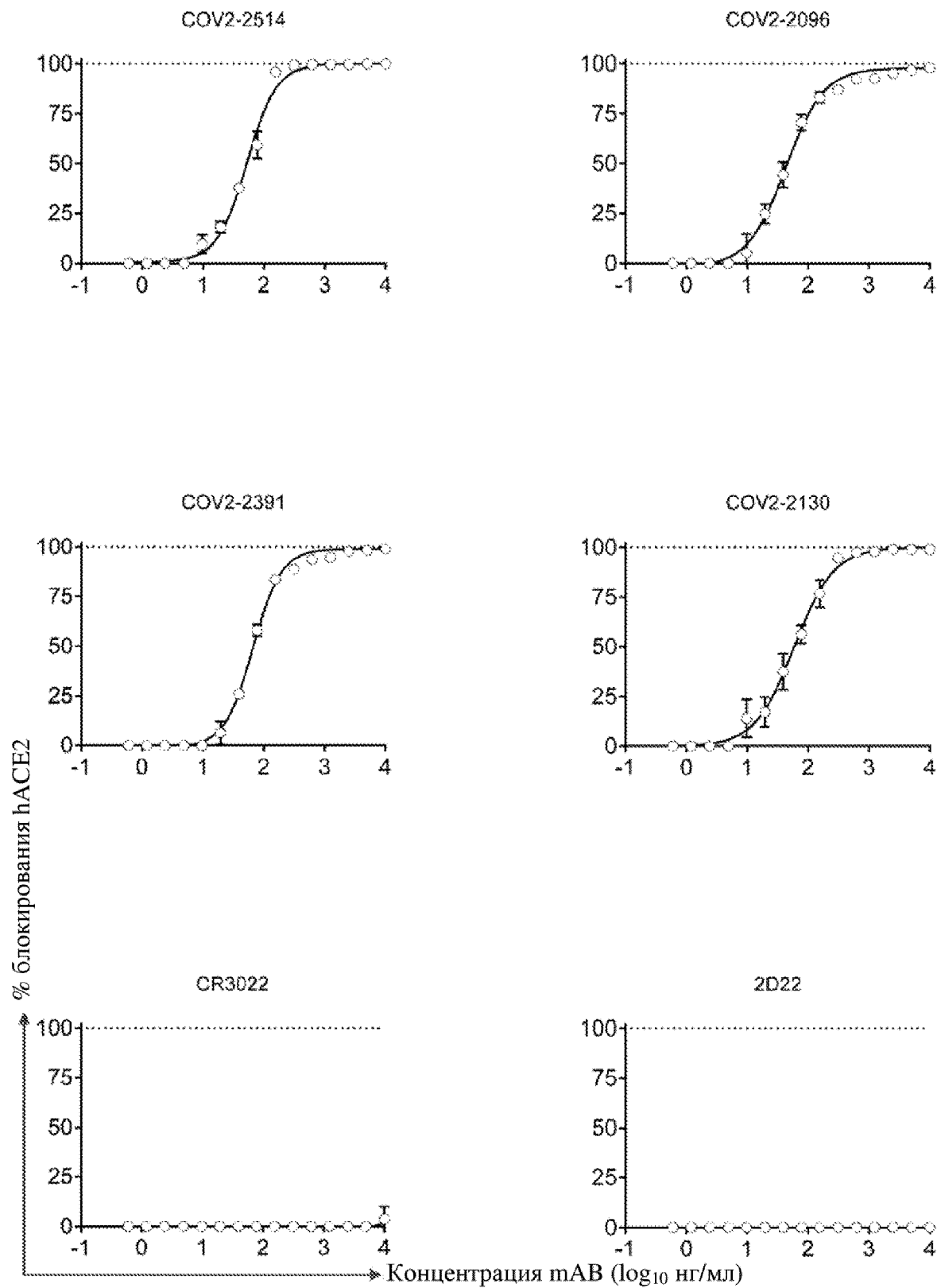
Фиг. 23



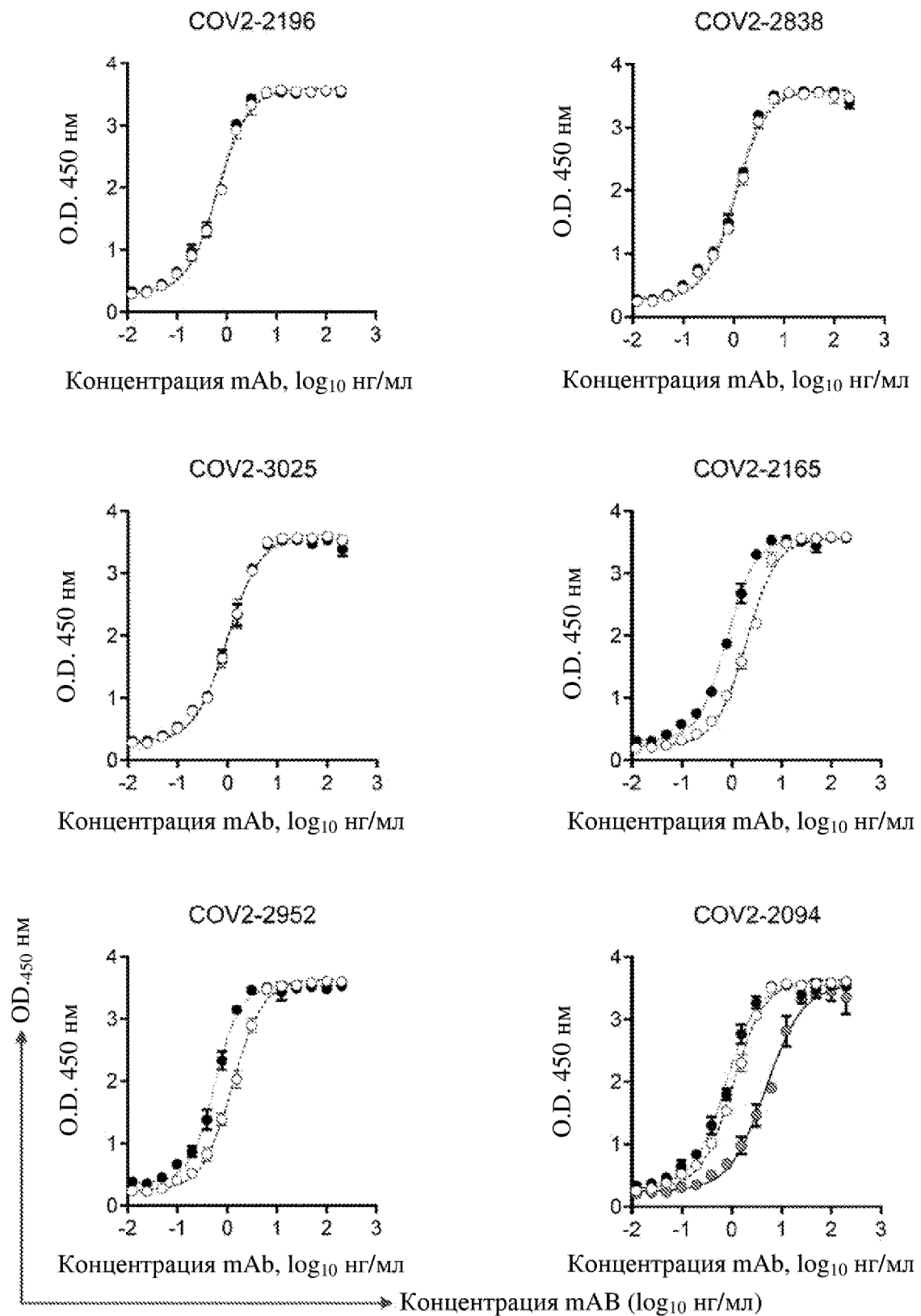
Фиг. 24



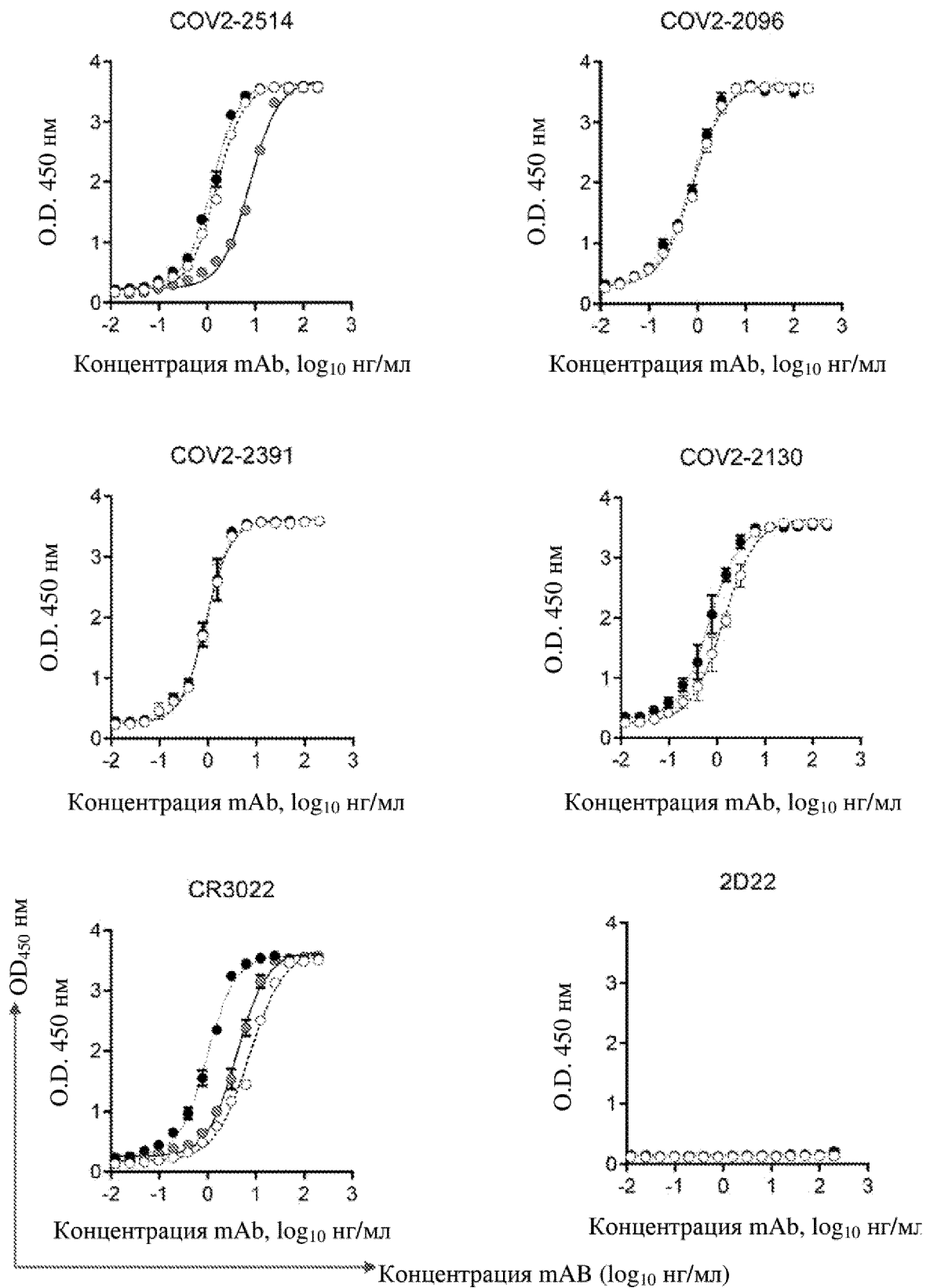
Фиг. 25А



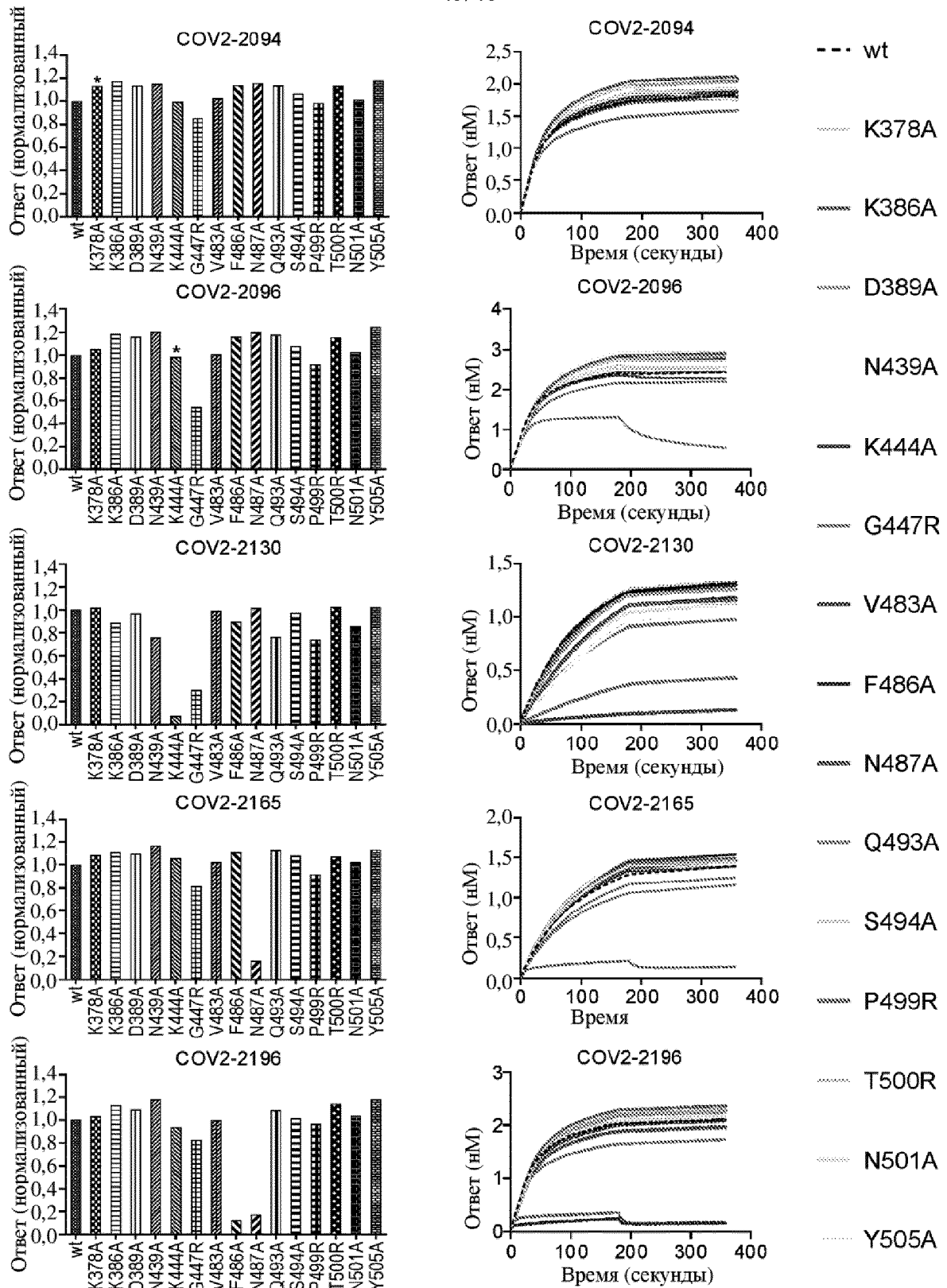
Фиг. 25В



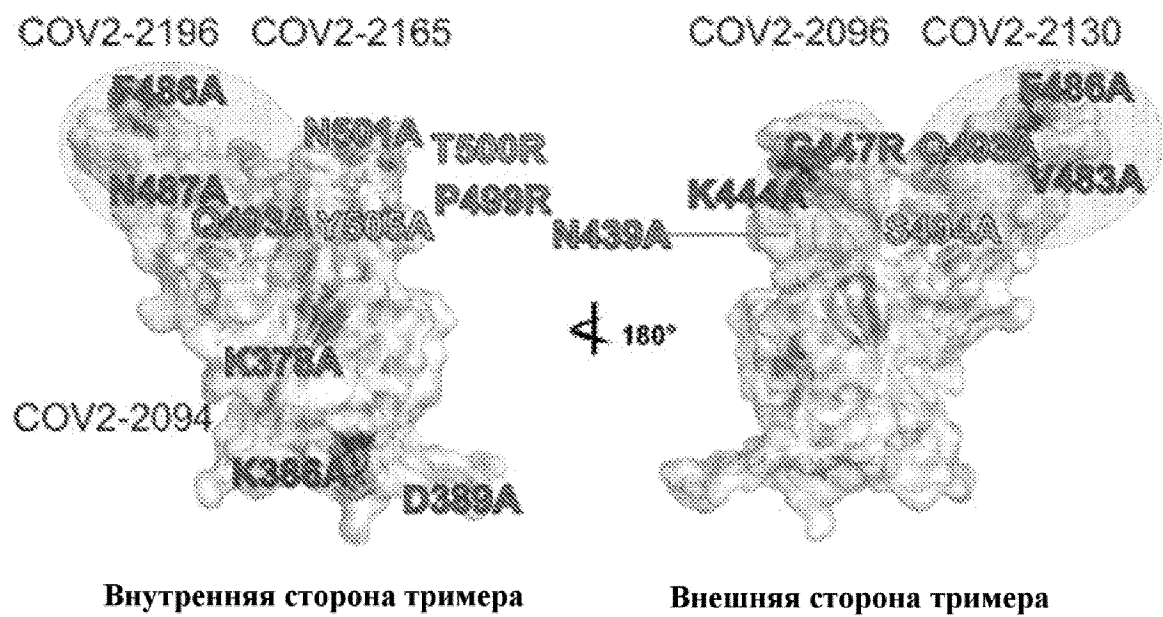
Фиг. 26А



Фиг. 26В



ФИГ. 27А



Фиг. 27В