

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293077 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.15(22) Дата подачи заявки
2021.04.27(51) Int. Cl. *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 35/66 (2015.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) БИБЛИОТЕКИ ВАРИАНТНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ КОРОНАВИРУСА

(31) 63/016,254; 63/034,896; 63/069,665;
63/073,362; 63/104,465; 63/115,568(32) 2020.04.27; 2020.06.04; 2020.08.24;
2020.09.01; 2020.10.22; 2020.11.18

(33) US

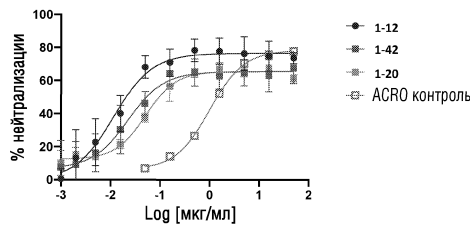
(86) PCT/US2021/029485

(87) WO 2021/222315 2021.11.04

(88) 2021.12.09

(71) Заявитель:
ТВИСТ БАЙОСАЙЕНС
КОРПОРЕЙШН (US)(72) Изобретатель:
Саго Аарон, Лю Цян, Юань Том (US)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предложены способы и композиции, относящиеся к библиотекам оптимизированных антител, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, содержащее модифицированные последовательности. Библиотеки, описанные в настоящем документе, содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела к SARS-CoV-2 или ACE2. Далее в настоящем документе описаны белковые библиотеки, созданные при трансляции библиотек нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе описаны библиотеки клеток, экспрессирующие библиотеки разнообразных нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе.



1-12	1-42	1-20	AGRO контроль
0.01170	0.02293	0.05196	1.011

A1

202293077

202293077

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576504EA/019

БИБЛИОТЕКИ ВАРИАНТНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ КОРОНАВИРУСА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 63/115568, поданной 18 ноября 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/104465, поданной 22 октября 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/073362, поданной 1 сентября 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/069665, поданной 24 августа 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/034896, поданной 4 июня 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/016254, поданной 27 апреля 2020 г., каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Коронавирусы, такие как тяжелый острый респираторный коронавирус 2 (SARS-CoV-2), могут вызывать тяжелые респираторные заболевания. Для лечения и профилактики вирусной инфекции, вызванной такими коронавирусами, как SARS-CoV-2, необходима терапия. Антитела обладают способностью связываться с высокой специфичностью и аффинностью к биологическим мишеням. Однако разработка терапевтических антител является сложной задачей из-за баланса иммунологических эффектов с эффективностью. Таким образом, существует необходимость в разработке композиций и способов оптимизации свойств антител с целью разработки эффективных способов лечения коронавирусных инфекций.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПО ССЫЛКЕ

[0003] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

[0004] В настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, содержащие: множество последовательностей, которые при трансляции кодируют антитела или фрагменты антител, которые связываются с белком SARS-CoV-2 или ACE2, где каждая из последовательностей содержит заданное количество вариантов в пределах CDR относительно входной последовательности, кодирующей антитело, и где библиотека содержит по меньшей мере 50000 вариантов последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых антитела или фрагменты антител связываются с шиповидным гликопротеином, мембранным белком, оболочечным белком, нуклеокапсидным белком или их комбинациями SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых антитела или фрагменты антител связываются с шиповидным гликопротеином. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых антитела

или фрагменты антител связываются с рецептор-связывающим доменом шиповидного гликопротеина. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых библиотека содержит по меньшей мере 100000 вариантов последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере некоторые из последовательностей кодируют легкую цепь антитела. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере некоторые из последовательностей кодируют тяжелую цепь антитела. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых каждая последовательность из множества последовательностей содержит по меньшей мере один вариант в CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых каждая последовательность из множества последовательностей содержит по меньшей мере два варианта в CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере один из вариантов присутствует по меньшей мере у двух индивидуумов. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере один из вариантов присутствует по меньшей мере у трех индивидуумов. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 5 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 25 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 50 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых каждая последовательность из множества последовательностей содержит по меньшей мере один вариант в CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно последовательности зародышевой линии входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых CDR представляет собой CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых CDR представляет собой CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющее по меньшей

мере в 70 раз более высокую аффинность связывания, чем входная последовательность. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющие K_D меньше чем 50 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющие K_D меньше чем 25 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющие K_D меньше чем 10 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющие K_D меньше чем 5 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, где библиотека кодирует последовательность CDR любой из SEQ ID NO: 1-591.

[0005] В настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, содержащие: множество последовательностей, которые при трансляции кодируют антитела или фрагменты антител, которые связываются с коронавирусом или рецептором коронавируса, где каждая из последовательностей содержит заданное количество вариантов в пределах CDR относительно входной последовательности, кодирующей антитело, и где библиотека содержит по меньшей мере 50000 вариантов последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых коронавирус представляет собой SARS-CoV, MERS-CoV, CoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, или HCoV-NKU1. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых рецептором коронавируса является ACE2 или дипептидилпептидаза 4 (DPP4). Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых библиотека содержит по меньшей мере 100000 вариантов последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере некоторые из последовательностей кодируют легкую цепь антитела. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере некоторые из последовательностей кодируют тяжелую цепь антитела. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых каждая последовательность из множества последовательностей содержит по меньшей мере один вариант в CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых каждая последовательность из множества последовательностей содержит по меньшей мере два варианта в CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере один из вариантов присутствует по меньшей мере у двух индивидуумов. Кроме того, в настоящем документе предложены

библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере один из вариантов присутствует по меньшей мере у трех индивидуумов. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 5 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 25 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 50 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых каждая последовательность из множества последовательностей содержит по меньшей мере один вариант в CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно последовательности зародышевой линии входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых CDR представляет собой CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых CDR представляет собой CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющее по меньшей мере в 70 раз более высокую аффинность связывания, чем входная последовательность. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющие K_D меньше чем 50 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющие K_D меньше чем 25 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющие K_D меньше чем 10 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых по меньшей мере одна последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющие K_D меньше чем 5 нМ.

[0006] В настоящем документе предложены антитела, где антитело содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 1-716.

[0007] В настоящем документе предложены антитела, где антитело содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1-716; и где антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное

антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье антитело, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, однодоменное антитело, изолированная определяющая комплементарность область (CDR), диатело, фрагмент антитела, состоящий из единственного мономерного переменного домена, дисульфид-связанные Fv (sdFv), интратело, антиидиотипическое (анти-Id) антитело или его антигенсвязывающие фрагменты ab.

[0008] В настоящем документе предложены способы лечения инфекции SARS-CoV-2, включающие введение антитела, описанного в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят перед воздействием SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 1 неделю перед воздействием SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 1 месяц перед воздействием SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 5 месяцев перед воздействием SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят после воздействия SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят самое большее примерно через 24 часа после воздействия SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят самое большее примерно через 1 неделю после воздействия SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят самое большее примерно через 1 месяц после воздействия SARS-CoV-2.

[0009] В настоящем документе предложены способы лечения индивидуума с инфекцией SARS-CoV-2 антителом, описанным в настоящем документе включающий: (a) получая или получив образец от индивидуума; (b) выполняя или выполнив анализ уровня экспрессии в образце для определения уровней экспрессии антител к SARS-CoV-2; и (c) если образец имеет уровень экспрессии антител к SARS-CoV-2, то введение индивидууму антитела, описанного в настоящем документе, тем самым излечивая инфекцию SARS-CoV-2.

[0010] В настоящем документе предложены способы оптимизации антитела, включающие: (a) предоставление множества полинуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или фрагмент антитела, где антитело или фрагмент антитела получены от субъекта, имеющего SARS-CoV-2; (b) создание библиотеки нуклеиновых кислот, содержащей множество последовательностей, которые при трансляции кодируют антитела или фрагменты антител, которые связывают белок SARS-CoV-2 или ACE2, где каждая из последовательностей содержит заданное количество вариантов CDR относительно входной последовательности, которая кодирует антитело; где библиотека содержит по меньшей мере 50000 вариантов последовательностей; и (c) синтез по меньшей мере 50000 вариантов последовательностей. Кроме того, в настоящем документе

предложены способы, где библиотека антител содержит по меньшей мере 100000 последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где способ дополнительно включает обогащение подмножества вариантных последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где способ дополнительно включает экспрессию антитела или фрагментов антител, соответствующих вариантным последовательностям. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где полинуклеотидная последовательность представляет собой последовательность мышинового, человеческого или химерного антитела. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где каждая последовательность из множества вариантных последовательностей содержит по меньшей мере один вариант в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где каждая последовательность из множества вариантных последовательностей содержит по меньшей мере два варианта в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где по меньшей мере одна транскрибируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 5 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где по меньшей мере одна транскрибируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 25 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где по меньшей мере одна транскрибируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 50 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где каждая последовательность содержит по меньшей мере один вариант в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно последовательности зародышевой линии входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где библиотека нуклеиновых кислот имеет теоретическое разнообразие по меньшей мере 10^{10} последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где библиотека нуклеиновых кислот имеет теоретическое разнообразие по меньшей мере 10^{12} последовательности.

[0011] В настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, содержащие переменный домен, область тяжелой цепи (VH) и переменный домен, область легкой цепи (VL), где VH содержит определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где VL содержит определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282; (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена любой из SEQ ID NO: 37-72 или 283-348; (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена любой из SEQ ID NO: 73-108 или 349-414; (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена любой из SEQ

последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 310; (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 376; (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 437; (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 496; и (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 555. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена SEQ ID NO: 270; (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 336; (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 402; (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 461; (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 520; и (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 579. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где антитело или фрагмент антитела связывается с гликопротеином спайка. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где антитело или фрагмент антитела связывается с рецептор-связывающим доменом гликопротеина спайка. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где антитело или фрагмент антитела имеет K_D меньше чем 50 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где антитело или фрагмент антитела имеет K_D меньше чем 25 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где антитело или фрагмент антитела имеет K_D меньше чем 10 нМ. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где антитело или фрагмент антитела имеет K_D меньше чем 5 нМ.

[0012] В настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, содержащие переменный домен, область тяжелой цепи (VH), и переменный домен, область легкой цепи (VL), где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 592-657, и где VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 658-716. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 594, и где VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 660. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 595, и где VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 661. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 598, и где VL содержит аминокислотную

последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 664. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 603, и где VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 669. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 615, и где VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 680. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 631, и где VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 691. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела или фрагменты антител, где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 645, и где VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 704. Кроме того, в настоящем документе предложены антитела, где антитело содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 1-716; и где антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье антитело, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, однодоменное антитело, изолированная определяющая комплементарность область (CDR), диатело, фрагмент антитела, состоящий из единственного мономерного переменного домена, дисульфид-связанные Fv (sdFv), интратело, антиидиотипическое (анти-Id) антитело или его антигенсвязывающие фрагменты ab.

[0013] В настоящем документе предложены композиции нуклеиновых кислот, содержащие: а) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный домен, область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 592-657; б) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный домен, область легкой цепи (VL) по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 658-716; и эксципиент.

[0014] В настоящем документе предложены способы лечения инфекции SARS-CoV-2, включающий введение антитела или фрагмента антитела, описанные в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят перед воздействием SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 1 неделю перед воздействием

SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 1 месяц перед воздействием SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 5 месяцев перед воздействием SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят после воздействия SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят самое большее примерно через 24 часа после воздействия SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят самое большее примерно через 1 неделю после воздействия SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где антитело вводят самое большее примерно через 1 месяц после воздействия SARS-CoV-2.

[0015] В настоящем документе предложены способы лечения индивидуума с инфекцией SARS-CoV-2 антителом или фрагментом антитела, описанные в настоящем документе, включающий: а) получая или получив образец от индивидуума; б) выполняя или выполнив анализ уровня экспрессии в образце для определения уровней экспрессии антител к SARS-CoV-2; и если образец имеет уровень экспрессии антител к SARS-CoV-2, то введение индивидууму антитела или фрагмента антитела, описанные в настоящем документе, тем самым излечивая инфекцию SARS-CoV-2.

[0016] В настоящем документе предложены способы оптимизации антитела, включающие: а) предоставление множества полинуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или фрагмент антитела, где антитело или фрагмент антитела получены от субъекта, имеющего SARS-CoV-2; б) создание библиотеки нуклеиновых кислот, содержащей множество последовательностей, которые при трансляции кодируют антитела или фрагменты антител, которые связывают белок SARS-CoV-2 или ACE2, где каждая из последовательностей содержит заданное количество вариантов CDR относительно входной последовательности, которая кодирует антитело; где библиотека содержит по меньшей мере 50000 вариантов последовательностей; и с) синтез по меньшей мере 50000 вариантов последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где библиотека антител содержит по меньшей мере 100000 последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где способ дополнительно включает обогащение подмножества вариантных последовательностей. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где способ дополнительно включает экспрессию антитела или фрагментов антител, соответствующих вариантным последовательностям. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где полинуклеотидная последовательность представляет собой последовательность мышинового, человеческого или химерного антитела. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где каждая последовательность из множества вариантных последовательностей содержит по меньшей мере один вариант в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где каждая последовательность из множества вариантных

последовательностей содержит по меньшей мере два варианта в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 5 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 25 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 50 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где каждая последовательность содержит по меньшей мере один вариант в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно последовательности зародышевой линии входной последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где библиотека нуклеиновых кислот имеет теоретическое разнообразие по меньшей мере 10^{10} последовательности. Кроме того, в настоящем документе предложены способы, где библиотека нуклеиновых кислот имеет теоретическое разнообразие по меньшей мере 10^{12} последовательности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0017] На **фигуре 1** показан рабочий процесс оптимизации антител.

[0018] На **фигуре 2** представлена схема стадий, демонстрирующая пример рабочего процесса синтеза генов, описанных в настоящем документе.

[0019] На **фигуре 3** проиллюстрирован пример компьютерной системы.

[0020] На **фигуре 4** представлена блок-схема, иллюстрирующая архитектуру компьютерной системы.

[0021] На **фигуре 5** представлена схема, демонстрирующая сеть, сконфигурированную для объединения ряда компьютерных систем, ряда сотовых телефонов и помощников по работе с персональными данными, а также сетевого хранилища (NAS).

[0022] На **фигуре 6** представлена блок-схема многопроцессорной компьютерной системы с совместно используемым пространством виртуальной адресной памяти.

[0023] На **фигуре 7** представлена схема рабочего процесса пэннинга.

[0024] На **фигурах 8А-8В** представлены графики данных пэннинга раунда 4 для антитела 1.

[0025] На **фигурах 8С-8D** представлены графики данных пэннинга раунда 4 для антитела 2.

[0026] На **фигурах 9А-9В** представлены графики данных пэннинга раунда 4 для антитела 3.

[0027] На **фигурах 9C-9D** представлены графики данных пэннинга раунда 4 для антитела 4.

[0028] На **фигуре 10** показаны графики связывания ACE2 с антителами к вариантам SARS-CoV-2.

[0029] На **фигурах 11A-11B** представлены графики данных аффинности для вариантных антител к SARS-CoV-2.

[0030] На **фигуре 12** представлен график связывания вариантных антител к SARS-CoV-2 с белком S1.

[0031] На **фигуре 13A** представлен график конкурентных ELISA для SARS-CoV-2 и ACE2 из первого набора.

[0032] На **фигуре 13B** представлен график конкурентных ELISA для SARS-CoV-2 и ACE2 из первого набора, показывающий варианты антитела к SARS-CoV-2.

[0033] На **фигурах 14A-14B** представлены графики из первого набора (**ФИГ. 14A**) и второго набора (**ФИГ. 14B**), показывающие варианты антитела к ACE2.

[0034] На **фигурах 14C-14D** представлены графики вариантных антител к SARS-CoV-2 в анализах нейтрализации.

[0035] На **фигуре 15** представлен график ингибирования SARS-CoV-2 и ACE2.

[0036] На **фигурах 16A-16B** представлены графики вариантных антител к SARS-CoV-2 при ингибировании VERO E6, измеренном с помощью FACS.

[0037] На **фигуре 17A** представлен график вариантных антител к SARS-CoV-2 при ингибировании VERO E6, измеренном с помощью FACS в сравнении с CR3022.

[0038] На **фигурах 17B-17C** представлены графики аффинности вариантных антител к SARS-CoV-2, определенные путем покрытия планшетов для ELISA шиповидным гликопротеином S1 SARS-CoV-2 (**ФИГ. 17B**) или тримером белка S (**ФИГ. 17C**).

[0039] На **фигуре 17D** представлен график средней интенсивности флуоресценции (MFI), построенный для каждого разведения вариантного антитела к SARS-CoV-2.

[0040] На **фигурах 18A-18C** представлены графики средней интенсивности флуоресценции (MFI), построенный для каждого разведения вариантного антитела к SARS-CoV-2.

[0041] На **фигурах 19A-19B** представлены графики кинетики антител для вариантов 2-5, 2-2 и 2-6 (**ФИГ. 19A**) и варианты 1-12, 1-42, 1-20 и 1-19 (**ФИГ. 19B**).

[0042] На **фигуре 19C** представлен график процента нейтрализации для вариантов 1-12, 1-42 и 1-20.

[0043] На **фигуре 19D** представлен график процента нейтрализации для вариантов 1-12, 1-42 и 1-20 с использованием живого вируса.

[0044] На **фигурах 20A-20D** представлены графики вариантных антител, нейтрализующих живой вирус.

[0045] На **фигуре 20E** представлен график вариантных антител, нейтрализующих живой вирус FRNT.

[0046] На **фигуре 20F-20I** показаны данные вариантных антител, нейтрализующих живой вирус PRNT.

[0047] На **фигуре 21A** показан график изменения массы в процентах (ось Y) в зависимости от дня после инъекции (PI, ось X) для положительного контроля реконвалесцентной плазмы и отрицательного контроля Mab c7d11.

[0048] На **фигуре 21B** показан график изменения массы в процентах (ось Y) в зависимости от дня после инъекции (PI, ось X) для вариантного антитела 6-63.

[0049] На **фигуре 21C** показан график изменения массы в процентах (ось Y) в зависимости от дня после инъекции (PI, ось X) для вариантного антитела 6-3.

[0050] На **фигуре 21D** показан график изменения массы в процентах (ось Y) в зависимости от дня после инъекции (PI, ось X) для вариантного антитела 6-36.

[0051] На **фигуре 21E** показаны графики процентного изменения массы (ось Y) в зависимости от дня после инъекции (PI, ось X) в зависимости от дозы.

[0052] На **фигуре 21F** показаны графики процентного изменения массы (ось Y) в зависимости от дня после инъекции (PI, ось X) в зависимости от дозы для вариантных антител 2-3, 2-63 и 1-20.

[0053] На **фигуре 21G** показан график данных анализа бляшек для обнаружения инфекционного вируса в легких на 9-й день. Указанные антитела вводили в день -1. Легкие отбирали на 9-й день, правую долю гомогенизировали, осветляли и супернатанты определяли количественно путем титрования бляшек. Значения для отдельных хомяков показаны в виде символов. Белые символы означают, что инфекционный вирус не обнаружен. Среднее геометрическое PFU/грамм показано в виде столбцов. Предел анализа показан пунктирной линией.

[0054] На **фигуре 21H** показан график данных гибридизации *in situ* (ISH) для обнаружения инфицированных клеток в легких на 9-й день. Указанные антитела вводили в день -1. Анализировали по три животных на группу. Значения для отдельных хомяков показаны в виде символов. Средние баллы ISH показаны в виде столбцов.

[0055] На **фигуре 21I** показан график данных кумулятивных показателей воспаления и отека для легких на 9-й день. Указанные антитела вводили в день -1. Анализировали по три животных на группу. Совокупные баллы патологии для отдельных хомяков показаны в виде символов. Средние баллы показаны в виде полос.

[0056] На **фигуре 22A** показан график положительного контроля рAb в анализе нейтрализации.

[0057] На **фигуре 22B** показан график нейтрализации антител 6-63, 6-3, и 1-12 в штамме VSV-SARS B.135.

[0058] На **фигуре 23A** показан график положительного контроля в анализе нейтрализации.

[0059] На **фигурах 23B-23C** показаны графики нейтрализации антителами, описанными в настоящем документе.

[0060] На **фигуре 24А** показаны графики изменения массы. Животных подвергали иммуносупрессии, а затем подвергали воздействию вируса SARS-CoV-2, штамм WA1, в день 0. На верхнем графике показаны данные контрольной группы, получавшей коктейль в день -1 (D-1, группа А). Группа была с ослабленным иммунитетом, но не подвергалась воздействию вируса (СУР контроль, группа I). Отрицательный контроль представляет собой моноклональный IgG (группа H). Коктейль вводили в указанный день после воздействия (группы В-G; средний и нижний графики). Стрелки указывают на день введения антител. Символы означают \pm SEM. Статистические различия площади под кривой (АОС) показаны справа от каждой линии. * обозначает значение $p < 0,05$, ns=не значимо.

[0061] На **фигуре 24В** показан график данных из **ФИГ. 24А**, построенных на одном графике.

[0062] На **фигуре 24С** показан график инфицирования вирусом легких в день 14. Анализы бляшек проводили на гомогенатах легких на 14-й день. Рассчитывали и наносили на график единицы образования бляшек (PFU) на грамм ткани. Предел анализа показан пунктирной линией. Столбцы представляют среднее геометрическое для каждой группы. ID группы указан в скобках. Белые символы означают, что инфекционный вирус не обнаружен. СУР=циклофосфамид; Neg=отрицательный; Cont=контроль.

[0063] На **фигуре 24D** показан график инфекционного вируса в легких необработанных контрольных хомячков. Животных, получавших СУР, подвергали воздействию 1000 1000 rfu вируса интраназальным путем в день 0. Группы из четырех животных подвергали эвтаназии и собирали легкие в указанные дни. Нанесены единицы образования бляшек (PFU) на грамм легочной ткани. Показаны средние геометрические титры и стандартное отклонение.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0064] В настоящем раскрытии используются, если не указано иное, традиционные методы молекулярной биологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно интерпретируется специалистом в данной области техники.

[0065] Определения

[0066] В данном описании различные варианты осуществления изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема любых вариантов осуществления изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона с точностью до десятых долей нижнего предела, если из контекста явно не следует иное. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, должно рассматриваться как имеющее конкретно раскрытые поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2

до 6, от 3 до 6 и т. д а также отдельные значения в этом диапазоне, например, 1,1, 2, 2,3, 5 и 5,9. Это применимо независимо от ширины диапазона. Верхний и нижний пределы этих промежуточных диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны, и они также охватываются изобретением с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. В тех случаях, когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в изобретение, если из контекста явно не следует иное.

[0067] Терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения какого-либо варианта осуществления изобретения. Как используется в настоящем документе, формы единственного числа предназначены также для включения форм множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Кроме того, следует понимать, что термины «содержит» и/или «содержащий» при использовании в данном описании определяют наличие заявленных признаков, целых чисел, стадий, процессов, элементов и/или компонентов, но не исключают наличия или добавление одного или нескольких других признаков, целых чисел, стадий, процессов, элементов, компонентов и/или их групп. Как используется в настоящем документе, термин «и/или» включает любые и все комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов.

[0068] Если специально не указано или не очевидно из контекста, как используется в настоящем документе, термин «около» в отношении числа или диапазона чисел понимается как означающий указанное количество и числа +/- 10% от них или на 10% ниже нижнего указанного предела и на 10% выше указанного верхнего предела для значений, указанных для диапазона.

[0069] Если специально не указано иное, как используется в настоящем документе, термин «нуклеиновая кислота» включает двух- или трехцепочечные нуклеиновые кислоты, а также одноцепочечные молекулы. В двух- или трехцепочечных нуклеиновых кислотах цепи нуклеиновой кислоты не обязательно должны быть созкстенсивными (то есть двухцепочечная нуклеиновая кислота не обязательно должна быть двухцепочечной по всей длине обеих цепей). Последовательности нуклеиновых кислот, если они предоставлены, перечислены в направлении от 5' к 3', если не указано иное. Описанные в настоящем документе способы обеспечивают получение выделенных нуклеиновых кислот. Описанные в настоящем документе способы дополнительно обеспечивают получение выделенных и очищенных нуклеиновых кислот. «Нуклеиновая кислота», как упоминается в данном документе, может содержать в длину по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или более 200 оснований. Кроме того, в настоящем документе предложены способы синтеза любого количества полипептидных сегментов, кодирующих нуклеотидные последовательности, включая последовательности, кодирующие нерибосомные пептиды (NRP), последовательности, кодирующие модули нерибосомных пептид-синтаз (NRPS) и синтетические варианты,

полипептидные сегменты других модульных белков, таких как антитела, полипептидные сегменты из других белковых семейств, включая некодирующие DNA или RNA, такие как регуляторные последовательности, например, промоторы, транскрипционные факторы, энхансеры, siRNA, shRNA, RNAi, miRNA, малая ядрышковая RNA, полученная из microRNA, или любые представляющие интерес функциональные или структурные единицы DNA или RNA. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, межгенная DNA, локус(локусы), определенный в результате анализа сцепления, экзоны, интроны, матричная RNA (mRNA), транспортная RNA, рибосомальная RNA, короткая интерферирующая RNA (siRNA), короткошпичечная RNA (shRNA), микро-RNA (miRNA), малая ядрышковая RNA, рибозимы, комплементарная DNA (cDNA), являющаяся DNA-представленностью mRNA, обычно получаемая путем обратной транскрипции матричной RNA (mRNA) или путем амплификации; молекулы DNA, полученные синтетическим путем или путем амплификации, геномная DNA, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная DNA любой последовательности, выделенная RNA любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. cDNA, кодирующая указанный в настоящем документе ген или фрагмент гена, может содержать по меньшей мере одну область, кодирующую экзонные последовательности без промежуточной интронной последовательности в геномной эквивалентной последовательности. cDNA, описанная в настоящем документе, может быть получена путем синтеза de novo.

[0070] Библиотека оптимизации антител для коронавируса

[0071] В настоящем документе предложены способы, композиции и системы для оптимизации антител к коронавирусу. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела оптимизированы для SARS-CoV, MERS-CoV, CoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 или HCoV-NKU1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела оптимизированы для SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела оптимизированы для рецептора, который связывается с коронавирусом. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептором коронавируса является ACE2 или дипептидилпептидаза 4 (DPP4). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела оптимизированы на основе взаимодействий между коронавирусом и рецептором, который связывает коронавирус. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела оптимизированы для ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела оптимизированы на основе взаимодействия между SARS-CoV-2 и ACE2.

[0072] Антитела в некоторых случаях оптимизируются путем создания библиотек *in-silico*, содержащих варианты последовательности исходной последовательности антитела (**ФИГ. 1**). Входные последовательности **100** в некоторых случаях модифицируют *in silico* **102** с помощью одной или нескольких мутаций или вариантов для создания библиотек оптимизированных последовательностей **103**. В некоторых случаях такие

библиотеки синтезируют, клонируют в векторы экспрессии, а продукты трансляции (антитела) оценивают на активность. В некоторых случаях фрагменты последовательностей синтезируются и впоследствии собираются. В некоторых случаях для отображения и обогащения желаемыми антителами, например, при фаговом отображении, используются векторы экспрессии. Давление отбора, используемое во время обогащения, в некоторых случаях включает, но этим не ограничивается, аффинность связывания, токсичность, иммунологическую толерантность, стабильность, конкуренцию рецептор-лиганд или способность к развитию. Такие векторы экспрессии позволяют выбирать антитела с определенными свойствами («пэннинг»), а последующее распространение или амплификация таких последовательности обогащает библиотеку этими последовательности. Раунды пэннинга могут повторяться любое количество раз, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более чем 7 раундов. Секвенирование в одном или нескольких раундах в некоторых случаях используется для определения того, какие последовательности **105** были обогащены в библиотеке.

[0073] В настоящем документе описаны способы и системы проектирования библиотек *in-silico*. Например, в качестве входных данных используется последовательность антитела или фрагмента антитела. В некоторых случаях последовательность антител, используемая в качестве исходных данных, представляет собой последовательность антител или фрагментов антител, которые связывают SARS-CoV-2. В некоторых случаях вход представляет собой последовательность антитела или фрагмента антитела, которая связывает белок SARS-CoV-2. В некоторых случаях белок представляет собой шиповидный гликопротеин, мембранный белок, оболочечный белок, нуклеокапсидный белок или их комбинации. В некоторых случаях белок представляет собой шиповидный гликопротеин SARS-CoV-2. В некоторых случаях белок представляет собой рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2. В некоторых случаях входная последовательность представляет собой последовательность антитела или фрагмента антитела, которая связывает ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2). В некоторых случаях входная последовательность представляет собой последовательность антитела или фрагмента антитела, которая связывает внеклеточный домен ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2).

[0074] База данных **102**, содержащая известные мутации или варианты одного или нескольких вирусов, запрашивается **101**, и создается библиотека **103** последовательностей, содержащих комбинации этих мутаций или вариантов. В некоторых случаях база данных содержит известные мутации или варианты SARS-CoV-подобных коронавирусов, SARS-CoV-2, SARS-CoV или их комбинации. В некоторых случаях база данных содержит известные мутации или варианты спайкового белка SARS-CoV-подобных коронавирусов, SARS-CoV-2, SARS-CoV или их комбинации. В некоторых случаях база данных содержит известные мутации или варианты рецептор-связывающего домена SARS-CoV-подобных коронавирусов, SARS-CoV-2, SARS-CoV или их комбинации. В некоторых случаях база

данных содержит мутации или варианты белка SARS-CoV-подобных коронавирусов, SARS-CoV-2, SARS-CoV или их комбинации, которые связываются с ACE2.

[0075] В некоторых случаях входная последовательность представляет собой последовательность тяжелой цепи антитела или фрагмента, которая связывает SARS-CoV-подобные коронавирусы, SARS-CoV-2, SARS-CoV или их комбинации. В некоторых случаях входная последовательность представляет собой последовательность легкой цепи антитела или фрагмента, которая связывает SARS-CoV-подобные коронавирусы, SARS-CoV-2, SARS-CoV или их комбинации. В некоторых случаях последовательность тяжелой цепи содержит переменные области CDR. В некоторых случаях последовательность легкой цепи содержит переменные области CDR. В некоторых случаях известные мутации или варианты CDR используются для построения библиотеки последовательностей. Фильтры **104**, или критерии исключения, используются в некоторых случаях для выбора определенных типов вариантов членов библиотеки последовательностей. Например, последовательности, имеющие мутацию или вариант, добавляются, если минимальное количество организмов в базе данных имеет мутацию или вариант. В некоторых случаях для включения в базу данных указываются дополнительные CDR. В некоторых случаях определенные мутации или варианты или комбинации мутаций или вариантов исключаются из библиотеки (например, известные иммуногенные сайты, структурные сайты и т. д.). В некоторых случаях определенные сайты во входной последовательности систематически заменены гистидином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой или их комбинациями. В некоторых случаях указано максимальное или минимальное количество мутаций или вариантов, разрешенных для каждой области антитела. Мутации или варианты в некоторых случаях описаны относительно входной последовательности или соответствующей последовательности зародышевой линии входной последовательности. Например, последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более чем 16 мутаций или вариантов относительно входной последовательности. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или не более чем 18 мутаций или вариантов относительно входной последовательности. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или около 18 мутаций или вариантов относительно входной последовательности. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности в первой области CDR. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности во второй области CDR. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности в третьей области CDR. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные

оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности в первой области CDR тяжелой цепи. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности во второй области CDR тяжелой цепи. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности в третьей области CDR тяжелой цепи. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности в первой области CDR легкой цепи. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности во второй области CDR легкой цепи. В некоторых случаях последовательности, сгенерированные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов относительно входной последовательности в третьей области CDR легкой цепи. В некоторых случаях первая область CDR представляет собой CDR1. В некоторых случаях вторая область CDR представляет собой CDR2. В некоторых случаях третья область CDR представляет собой CDR3. Библиотеки антител *in-silico* в некоторых случаях синтезируют, собирают и обогащают желаемыми последовательностями.

[0076] Для создания последовательностей в библиотеке также могут быть модифицированы последовательности зародышевой линии, соответствующие входной последовательности. Например, последовательности, созданные способами оптимизации, описанными в настоящем документе, содержат по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более чем 16 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или не более чем 18 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или около 18 мутаций или вариантов относительно последовательности зародышевой линии.

[0077] В настоящем документе предложены способы, системы и композиции для оптимизации антител, где входная последовательность содержит мутации или варианты в области антитела. Примеры областей антитела включают, но этим не ограничиваются, определяющую комплементарность область (CDR), переменный домен или константный домен. В некоторых случаях CDR представляет собой CDR1, CDR2, или CDR3. В некоторых случаях CDR представляет собой домен тяжелой цепи, включая, но этим не ограничиваясь, CDRH1, CDRH2 и CDRH3. В некоторых случаях CDR представляет собой домен легкой цепи, включая, но этим не ограничиваясь, CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В некоторых случаях переменный домен представляет собой переменный домен легкой цепи (VL) или переменный домен тяжелой цепи (VH). В некоторых случаях домен VL содержит каппа- или лямбда-цепи. В некоторых случаях константный домен представляет

собой константный домен легкой цепи (CL) или константный домен тяжелой цепи (CH). В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии в первой области CDR. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии во второй области CDR. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии в третьей области CDR. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии в первой области CDR тяжелой цепи. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии во второй области CDR тяжелой цепи. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии в третьей области CDR тяжелой цепи. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии в первой области CDR легкой цепи. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии во второй области CDR легкой цепи. В некоторых случаях последовательности, созданные оптимизацией, содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии в третьей области CDR легкой цепи. В некоторых случаях первая область CDR представляет собой CDR1. В некоторых случаях вторая область CDR представляет собой CDR2. В некоторых случаях третья область CDR представляет собой CDR3.

[0078] *Библиотеки VHH*

[0079] В настоящем документе предложены способы, композиции и системы для получения антител или фрагментов антител. В некоторых случаях антитела или фрагменты антител представляют собой однодоменные антитела. Способы, композиции и системы, описанные в настоящем документе для оптимизации антител, включают подход, основанный на соотношении вариантов, который отражает природное разнообразие последовательностей антител. В некоторых случаях библиотеки оптимизированных антител содержат варианты последовательности антител. В некоторых случаях конструируют варианты последовательности антител, содержащие варианты участки CDR. В некоторых случаях варианты последовательности антител, содержащие варианты участки CDR, создают путем перетасовки природных последовательностей CDR в каркасе ламы, гуманизованном или химерном каркасе. В некоторых случаях такие библиотеки синтезируют, клонируют в векторы экспрессии, а продукты трансляции (антитела) оценивают на активность. В некоторых случаях фрагменты последовательностей синтезируются и впоследствии собираются. В некоторых случаях для отображения и

обогащения желаемыми антителами, например, при фаговом отображении, используются векторы экспрессии. В некоторых случаях фаговый вектор представляет собой фагемидный вектор Fab. Давление отбора, используемое во время обогащения, в некоторых случаях включает, но этим не ограничивается, аффинность связывания, токсичность, иммунологическую толерантность, стабильность, конкуренцию рецептор-лиганд или способность к развитию. Такие векторы экспрессии позволяют выбирать антитела с определенными свойствами («пэннинг»), а последующее распространение или амплификация таких последовательности обогащает библиотеку этими последовательности. Раунды пэннинга могут повторяться любое количество раз, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более чем 7 раундов. В некоторых случаях каждый раунд пэннинга включает несколько промывок. В некоторых случаях каждый раунд пэннинга включает по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более чем 16 промывок.

[0080] В настоящем документе описаны способы и системы проектирования библиотек *in-silico*. Библиотеки, описанные в настоящем документе, в некоторых случаях созданы на основе базы данных, содержащей множество последовательностей антител. В некоторых случаях база данных содержит множество вариантных последовательностей антител против различных мишеней. В некоторых случаях база данных содержит по меньшей мере 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более чем 5000 последовательностей антител. Примером базы данных является база данных iCAN. В некоторых случаях база данных содержит последовательности рецепторов наивных В-клеток и В-клеток памяти. В некоторых случаях последовательности рецепторов наивных В-клеток и В-клеток памяти представляют собой последовательности человека, мыши или примата. В некоторых случаях последовательности рецепторов наивных В-клеток и В-клеток памяти представляют собой последовательности человека. В некоторых случаях базу данных анализируют на наличие специфических вариаций положений. В некоторых случаях антитела, описанные в настоящем документе, содержат позиционно-специфические вариации в областях CDR. В некоторых случаях области CDR содержат несколько сайтов для вариаций.

[0081] В настоящем документе описаны библиотеки, содержащие вариации в области CDR. В некоторых случаях CDR представляет собой CDR1, CDR2 или CDR3 варибельной тяжелой цепи. В некоторых случаях CDR представляет собой CDR1, CDR2 или CDR3 варибельной легкой цепи. В некоторых случаях библиотеки содержат несколько вариантов, кодирующих CDR1, CDR2 или CDR3. В некоторых случаях библиотеки, описанные в настоящем документе, кодируют по меньшей мере 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1200, 1500, 1700, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более чем 5000 последовательностей CDR1. В некоторых случаях библиотеки, описанные в настоящем документе, кодируют по меньшей мере 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1200, 1500, 1700, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более чем 5000 последовательностей CDR2. В некоторых случаях библиотеки, описанные в настоящем документе, кодируют по меньшей

мере 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1200, 1500, 1700, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более чем 5000 последовательностей CDR3. Библиотеки антител *in-silico* в некоторых случаях синтезируют, собирают и обогащают желаемыми последовательностями.

[0082] В некоторых случаях после синтеза вариантов CDR1, вариантов CDR2 и вариантов CDR3 для создания разнообразной библиотеки перемешивают варианты CDR1, варианты CDR2 и варианты CDR3. В некоторых случаях разнообразие библиотек, созданных способами, описанными в настоящем документе, имеет теоретическое разнообразие по меньшей мере или около 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} , 10^{17} , 10^{18} или более чем 10^{18} последовательности. В некоторых случаях библиотека имеет конечное библиотечное разнообразие по меньшей мере или около 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} , 10^{17} , 10^{18} или более чем 10^{18} последовательности.

[0083] Последовательности зародышевой линии, соответствующие вариантной последовательности, также могут быть модифицированы для создания последовательностей в библиотеке. Например, последовательности, полученные способами, описанными в настоящем документе, содержат по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более чем 16 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии. В некоторых случаях созданные последовательности содержат не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или не более чем 18 мутаций или вариантов последовательности зародышевой линии. В некоторых случаях созданные последовательности содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или около 18 мутаций или вариантов относительно последовательности зародышевой линии.

[0084] Библиотеки антител к коронавирусу

[0085] В настоящем документе предложены библиотеки, созданные с помощью способов оптимизации антител, описанных в настоящем документе. Антитела, описанные в настоящем документе приводят к улучшению функциональной активности, структурной стабильности, экспрессии, специфичности или их комбинации.

[0086] В настоящем документе предложены способы и композиции, относящиеся к библиотекам связывания SARS-CoV-2, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело к SARS-CoV-2. Кроме того, в настоящем документе предложены способы и композиции, относящиеся к библиотекам связывания ACE2, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело к ACE2. Такие способы и композиции в некоторых случаях создаются способами и системами оптимизации антител, описанными в настоящем документе. Библиотеки, описанные в настоящем документе, могут быть дополнительно изменены для предоставления библиотек вариантов, содержащих нуклеиновые кислоты, каждая из которых кодирует заранее определенный вариант по меньшей мере одной предварительно определенной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. Далее в настоящем документе описаны библиотеки белков, которые могут быть созданы при трансляции библиотек нуклеиновых кислот. В некоторых случаях библиотеки нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, переносят в клетки для создания библиотеки

клеток. Также в настоящем документе предусмотрены последующие приложения для библиотек, синтезированных с использованием способов, описанных в настоящем документе. Последующие приложения включают идентификацию вариантов последовательностей нуклеиновых кислот или белков с усиленными биологически значимыми функциями, например, повышенной стабильностью, аффинностью, связыванием, функциональной активностью, а также для лечения или профилактики инфекции, вызванной коронавирусом, таким как SARS-CoV-2.

[0087] В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность любой из SEQ ID NO: 1-716. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 1-716. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 1-716. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 1-716. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 1-716.

[0088] В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность CDRH1 любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDRH1 любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности CDRH1 любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности CDRH1 любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности CDRH1 любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность CDRH2 любой из SEQ ID NO: 37-72 или 283-348. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDRH2 любой из SEQ ID NO: 37-72 или 283-348. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична

последовательности CDRL2 любой из SEQ ID NO: 145-180 или 415-473. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности CDRL2 любой из SEQ ID NO: 145-180 или 415-473. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности CDRL2 любой из SEQ ID NO: 145-180 или 415-473. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность CDRL3 любой из SEQ ID NO: 181-216, 442-456, или 532-546. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности CDRL3 любой из SEQ ID NO: 181-216 или 533-591. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности CDRL3 любой из SEQ ID NO: 181-216 или 533-591. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности CDRL3 любой из SEQ ID NO: 181-216 или 533-591. В некоторых случаях антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, содержат последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности CDRL3 любой из SEQ ID NO: 181-216 или 533-591.

[0090] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или фрагмент антитела содержат переменный домен, область тяжелой цепи (VH) и переменный домен, область легкой цепи (VL), где VH содержит определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где VL содержит определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282; (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена любой из SEQ ID NO: 37-72 или 283-348; (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена любой из SEQ ID NO: 73-108 или 349-414; (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена любой из SEQ ID NO: 109-144 или 415-473; (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена любой из SEQ ID NO: 145-180 или 415-473; и (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена любой из SEQ ID NO: 181-216 или 533-591. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или фрагмент антитела содержат переменный домен, область тяжелой цепи (VH) и переменный домен, область легкой цепи (VL), где VH содержит определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где VL содержит определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где (a) аминокислотная последовательность CDRH1 на по меньшей мере или около 80%, 85%, 90%, или 95% идентична любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282; (b) аминокислотная последовательность CDRH2 на по меньшей мере или около 80%, 85%, 90%, или 95% идентична любой из SEQ ID NO: 37-72 или 283-348; (c) аминокислотная

последовательность CDRH3 на по меньшей мере или около 80%, 85%, 90%, или 95% идентична любой из SEQ ID NO: 73-108 или 349-414; (d) аминокислотная последовательность CDRL1 на по меньшей мере или около 80%, 85%, 90%, или 95% идентична любой из SEQ ID NO: 109-144 или 415-473; (e) аминокислотная последовательность CDRL2 на по меньшей мере или около 80%, 85%, 90%, или 95% идентична любой из SEQ ID NO: 145-180 или 415-473; и (f) аминокислотная последовательность CDRL3 на по меньшей мере или около 80%, 85%, 90%, или 95% идентична любой из SEQ ID NO: 181-216 или 533-591.

[0091] В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления изобретения описаны антитела или фрагменты антител, содержащие переменный домен, область тяжелой цепи (VH) и переменный домен, область легкой цепи (VL), где VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 592-657, и где VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 658-716. В некоторых случаях антитела или фрагменты антител содержат VH на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 592-657, и VL на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 658-716.

[0092] Термин «идентичность последовательности» означает, что две полинуклеотидные последовательности идентичны (то есть по нуклеотидам) в пределах окна сравнения. Термин «процент идентичности последовательности» рассчитывают путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определяя количество положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, А, Т, С, G, U или I) происходит в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих позиций, разделив количество совпадающих позиций на общее количество позиций в окне сравнения (то есть размер окна) и умножив результат на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности.

[0093] Термин «гомология» или «сходство» между двумя белками определяется путем сравнения аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных заменителей одной белковой последовательности со второй белковой последовательностью. Сходство можно определить с помощью процедур, которые хорошо известны в данной области, например, с помощью программы BLAST (базовый инструмент локального поиска выравнивания в Национальном центре биологической информации).

[0094] В настоящем документе предложены библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела к SARS-CoV-2. Антитела, описанные в настоящем документе, обеспечивают повышенную стабильность для ряда кодирующих последовательностей связывающего домена SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях

последовательности, кодирующие связывающий домен, определяются взаимодействием между SARS-CoV-2 и ACE2.

[0095] Последовательности связывающих доменов, основанные на поверхностных взаимодействиях между SARS-CoV-2 и ACE2, анализируют с использованием различных способов. Например, выполнен многовидовой расчетный анализ. В некоторых случаях проводится структурный анализ. В некоторых случаях выполняется анализ последовательности. Анализ последовательности может быть выполнен с использованием базы данных, известной в данной области техники. Неограничивающие примеры баз данных включают, но этим не ограничиваются, NCBI BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu/), UniProt (www.uniprot.org/) и IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (guidetopharmacology.org/).

[0096] В настоящем документе описаны связывающие домены SARS-CoV-2 или ACE2, разработанные на основе анализа последовательностей среди различных организмов. Например, анализ последовательности проводится для выявления гомологичных последовательностей в разных организмах. Типичные организмы включают, но этим не ограничиваются, мышь, крысу, лошадь, овцу, корову, примата (например, шимпанзе, бабуина, гориллу, орангутанга, обезьяну), собаку, кошку, свинью, осла, кролика, рыбу, муху и человека. В некоторых случаях гомологичные последовательности идентифицируются в одном и том же организме у разных индивидуумов.

[0097] После идентификации доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 могут быть созданы библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 содержат последовательности доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2, разработанные на основе конформационных взаимодействий лигандов, взаимодействий пептидных лигандов, взаимодействий низкомолекулярных лигандов, внеклеточных доменов SARS-CoV-2 или ACE2 или антител, нацеленных на SARS-CoV-2 или ACE2. Библиотеки доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 могут быть транслированы для создания белковых библиотек. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 транслируются для создания пептидных библиотек, библиотек иммуноглобулинов, их производных или их комбинаций. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 транслируются для создания библиотек белков, которые дополнительно модифицируются для создания библиотек пептидомиметиков. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 транслируются для создания библиотек белков, которые используются для создания небольших молекул.

[0098] Способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотек доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержащих нуклеиновые кислоты, каждая из которых кодирует заданный вариант по меньшей мере одной заданной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях заданная эталонная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой

кислоты, кодирующую белок, а библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации по крайней мере одного кодона, так что множество различных вариантов одного остатка в последующем белке, кодируемом синтезированной нуклеиновой кислотой, генерируются стандартными процессами трансляции. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 содержат различные нуклеиновые кислоты, коллективно кодирующие вариации в нескольких положениях. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариацию по меньшей мере одного кодона в домене связывания SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации нескольких кодонов в связывающем домене SARS-CoV-2 или ACE2. Примерное количество кодонов для вариации включает, но этим не ограничиваются, по меньшей мере или около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 225, 250, 275, 300 или более чем 300 кодонов.

[0099] Способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотек, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2, где библиотеки содержат последовательности, кодирующие вариации длины связывающих доменов SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях библиотека содержит последовательности, кодирующие вариации длины на по меньшей мере или около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 225, 250, 275, 300 или более чем 300 кодонов меньше по сравнению с заданной эталонной последовательностью. В некоторых случаях библиотека содержит последовательности, кодирующие вариации длины на по меньшей мере или около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 или более чем 300 кодонов больше по сравнению с заданной эталонной последовательностью.

[00100] После идентификации доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 могут быть разработаны и синтезированы антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2. После идентификации доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 можно разработать и синтезировать антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2, обеспечивают контакт с SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2, обеспечивают высокоаффинное связывание с SARS-CoV-2 или ACE2. Примеры аминокислотных последовательностей доменов связывания SARS-CoV-2 или ACE2 включают любую из SEQ ID NO: 1-716.

[00101] В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет аффинность связывания (например, K_D) с SARS-CoV-2 менее чем 1 нМ, менее чем 1,2 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 5 нМ, менее чем 10 нМ, менее чем 11 нМ, менее чем 13,5 нМ, менее чем 15 нМ, менее чем 20 нМ, менее чем 25 нМ или менее чем 30 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 1 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 1,2 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 2 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 5 нМ. В некоторых случаях

антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 10 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 13,5 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 15 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 20 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 25 нМ. В некоторых случаях антитело SARS-CoV-2 имеет K_D менее чем 30 нМ.

[00102] В некоторых случаях антитело ACE2 имеет аффинность связывания (например, K_D) с ACE2 менее чем 1 нМ, менее чем 1,2 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 5 нМ, менее чем 10 нМ, менее чем 11 нМ, менее чем 13,5 нМ, менее чем 15 нМ, менее чем 20 нМ, менее чем 25 нМ или менее чем 30 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 1 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 1,2 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 2 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 5 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 10 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 13,5 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 15 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 20 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 25 нМ. В некоторых случаях антитело ACE2 имеет K_D менее чем 30 нМ.

[00103] В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 является агонистом. В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 является антагонистом. В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 является аллостерическим модулятором. В некоторых случаях аллостерический модулятор является отрицательным аллостерическим модулятором. В некоторых случаях аллостерический модулятор является положительным аллостерическим модулятором. В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 вызывает агонистические, антагонистические или аллостерические эффекты при концентрации по меньшей мере или около 1 нМ, 2 нМ, 4 нМ, 6 нМ, 8 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ, 120 нМ, 140 нМ, 160 нМ, 180 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ, 1000 нМ или более чем 1000 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 является отрицательным аллостерическим модулятором. В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 является отрицательным аллостерическим модулятором в концентрации по меньшей мере или около 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 нМ, 2 нМ, 4 нМ, 6 нМ, 8 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ или более чем 100 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 является отрицательным аллостерическим модулятором в диапазоне концентраций от около 0,001 до около 100, 0,01 до около 90, от около 0,1 до около 80, 1 до около 50, от около 10 до около 40 нМ или около 1 до около 10 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 имеет EC_{50} или IC_{50} по меньшей мере или около 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,9, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более чем 6 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин SARS-CoV-2 или ACE2 имеет EC_{50} или IC_{50} по меньшей мере или около 1 нМ, 2 нМ, 4 нМ, 6 нМ, 8 нМ,

10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ или более чем 100 нМ.

[00104] В некоторых случаях аффинность антител к SARS-CoV-2 или ACE2, полученных способами, описанными в настоящем документе, составляет по меньшей мере или около 1,5-кратное, 2,0-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 20-кратное, 30-кратное, 40-кратное, 50-кратное, 60-кратное, 70-кратное, 80-кратное, 90-кратное, 100-кратное, 200-кратное или более чем 200-кратное улучшение аффинности связывания по сравнению с антителом-компаратором. В некоторых случаях антитела к SARS-CoV-2 или ACE2, полученные способами, описанными в настоящем документе, составляет по меньшей мере или около 1,5-кратное, 2,0-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 20-кратное, 30-кратное, 40-кратное, 50-кратное, 60-кратное, 70-кратное, 80-кратное, 90-кратное, 100-кратное, 200-кратное или более чем 200-кратное улучшение функции по сравнению с антителом-компаратором. В некоторых случаях антитело-компаратор представляет собой антитело со сходной структурой, последовательностью или антигеном-мишенью.

[00105] В настоящем документе предложены библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, содержащие связывающие домены SARS-CoV-2 или ACE2, содержащие вариации типа домена, длины домена или вариации остатков. В некоторых случаях домен представляет собой область антитела, содержащую домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2. Например, область представляет собой домен VH, CDRH3 или VL. В некоторых случаях домен представляет собой связывающий домен SARS-CoV-2 или ACE2.

[00106] Способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотеки нуклеиновых кислот, связывающих SARS-CoV-2 или ACE2, каждая из которых кодирует заданный вариант по меньшей мере одной заданной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях заданная эталонная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, а библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации по крайней мере одного кодона, так что множество различных вариантов одного остатка в последующем белке, кодируемом синтезированной нуклеиновой кислотой, генерируются стандартными процессами трансляции. В некоторых случаях библиотека связывания SARS-CoV-2 или ACE2 содержит различные нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие вариации в нескольких положениях. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариацию по меньшей мере одного кодона домена VH или VL. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариацию по меньшей мере одного кодона в домене связывания SARS-CoV-2 или ACE2. Например, изменяется по крайней мере один кодон домена связывания SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации нескольких кодонов домена VH или VL. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации нескольких кодонов в связывающем домене SARS-CoV-2 или ACE2.

Примерное количество кодонов для вариации включает, но этим не ограничиваются, по меньшей мере или около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 225, 250, 275, 300 или более чем 300 кодонов.

[00107] Способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2 нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует заранее определенный вариант по крайней мере одной заранее определенной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, где библиотека связывания SARS-CoV-2 или ACE2 содержит последовательности, кодирующие изменение длины домена. В некоторых случаях домен представляет собой домен VH или VL. В некоторых случаях домен представляет собой домен, связывающий SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях библиотека содержит последовательности, кодирующие вариации длины на по меньшей мере или около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 225, 250, 275, 300 или более чем 300 кодонов меньше по сравнению с заданной эталонной последовательностью. В некоторых случаях библиотека содержит последовательности, кодирующие вариации длины на по меньшей мере или около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 или более чем 300 кодонов больше по сравнению с заданной эталонной последовательностью.

[00108] В настоящем документе предложены библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2, где связывающие библиотеки SARS-CoV-2 или ACE2 синтезированы с различным количеством фрагментов. В некоторых случаях фрагменты содержат домен VH или VL. В некоторых случаях библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2 синтезируются по меньшей мере или примерно из 2 фрагментов, 3 фрагментов, 4 фрагментов, 5 фрагментов или более 5 фрагментов. Длина каждого из фрагментов нуклеиновой кислоты или средняя длина синтезированных нуклеиновых кислот может составлять по меньшей мере или около 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600 или более чем 600 пар оснований. В некоторых случаях длина составляет около 50 to 600, 75 to 575, 100 to 550, 125 to 525, 150 to 500, 175 to 475, 200 to 450, 225 to 425, 250 to 400, 275 to 375, или 300 to 350 пар оснований.

[00109] Библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, содержащие связывающие домены SARS-CoV-2 или ACE2, описанные в настоящем документе, содержат аминокислоты различной длины при трансляции. В некоторых случаях длина каждого из аминокислотных фрагментов или средняя длина синтезированной аминокислоты может составлять по меньшей мере или около 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 или более чем 150 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислоты составляет около от 15 до 150, от 20 до 145, от 25 до 140, от 30 до 135, от 35 до 130, от 40 до 125, от 45 до 120, от 50 до 115, от 55 до 110, от 60 до 110, от 65 до 105, от

70 до 100 или 75 to 95 аминокислоты. В некоторых случаях длина аминокислоты составляет около 22 до около 75 аминокислот.

[00110] Библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержащие синтезированные de novo варианты последовательности, кодирующие антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержат ряд вариантов последовательностей. В некоторых случаях ряд вариантов последовательностей синтезируется de novo для CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL, VH или их комбинации. В некоторых случаях ряд вариантов последовательностей синтезируется de novo для элемента каркасного участка 1 (FW1), элемента каркасного участка 2 (FW2), элемента каркасного участка 3 (FW3) или элемента каркасного участка 4 (FW4). В некоторых случаях ряд вариантов последовательностей синтезируется de novo для связывающего домена SARS-CoV-2 или ACE2. Количество вариантов последовательностей может составлять по меньшей мере или около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более чем 500 последовательностей. В некоторых случаях количество вариантов последовательностей составляет около 10 to 300, 25 to 275, 50 to 250, 75 to 225, 100 to 200 или 125 to 150 последовательности.

[00111] Библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержащие синтезированные de novo варианты последовательности, кодирующие антитела, содержащие связывающие домены SARS-CoV-2 или ACE2, содержат улучшенное разнообразие. В некоторых случаях варианты включают варианты созревания аффинности. Альтернативно или в комбинации, варианты включают варианты в других областях антитела, включая, но этим не ограничиваясь, CDRH1, CDRH2, CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В некоторых случаях количество вариантов библиотек связывания SARS-CoV-2 или ACE2 составляет по меньше или около 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или более чем 10^{14} неидентичных последовательностей.

[00112] После синтеза библиотек связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2, библиотеки можно использовать для скрининга и анализа. Например, библиотеки анализируются на предмет возможности отображения и панорамирования библиотек. В некоторых случаях отображаемость оценивается с помощью выбираемого тега. Примеры меток включают, но не ограничиваются ими, радиоактивную метку, флуоресцентную метку, фермент, хемилюминесцентную метку, колориметрическую метку, аффинную метку или другие метки или метки, известные в данной области. В некоторых случаях меткой является гистидин, полигистидин, тус, гемагглютинин (HA) или FLAG. Например, библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2 содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2 с несколькими метками, такими как GFP, FLAG и Lucy, а также штрих-кодом DNA. В некоторых случаях библиотеки анализируют путем секвенирования с использованием различных методов, включая, помимо прочего, секвенирование одной молекулы в реальном

времени (SMRT), секвенирование по Полони, секвенирование путем лигирования, секвенирование с обратимым терминатором, секвенирование с обнаружением протонов, секвенирование с ионным полупроводником, секвенирование с нанопорами, электронное секвенирование, пиросеквенирование, секвенирование Максама-Гилберта, секвенирование с обрывом цепи (например, по Сэнгеру), секвенирование +S или секвенирование путем синтеза.

[00113] Как используется в документе, термин «антитело» будет пониматься как включающий белки, имеющие характерную двухцепочечную Y-образную форму типичной молекулы антитела, а также один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры антител включают, но этим не ограничиваются, моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизованное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье антитело, одноцепочечные Fv (scFv) (включая фрагменты, в которых VL и VH соединены с использованием рекомбинантных методов с помощью синтетического или природного линкера, что позволяет сделать их в виде единой белковой цепи, в котором области VL и VH спариваются с образованием моновалентных молекул, включая одноцепочечные Fab и scFab), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab (включая моновалентные фрагменты, содержащие домены VL, VH, CL и CH1), фрагмент F(ab')₂ (включая двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области), фрагмент Fd (включая фрагменты, содержащие фрагмент VH и CH1), фрагмент Fv (включая фрагменты, содержащие домены VL и VH одного плеча антитела), однодоменное антитело (dAb или sdAb) (включая фрагменты, содержащие домен VH), изолированную определяющую комплементарность область (CDR), диатело (включая фрагменты, содержащие бивалентные димеры, такие как два домена VL и VH, связанные друг с другом и распознающие два разных антигена), фрагмент антитела, состоящий из единственного мономерного переменного домена, дисульфид-связанные Fv (sdFv), интратело, антиидиотипическое (анти-Id) антитело или его антигенсвязывающие фрагменты ab. В некоторых случаях библиотеки, описанные в настоящем документе, содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, где антитело представляет собой Fv-антитело, включая Fv-антитела, состоящие из минимального фрагмента антитела, который содержит полный сайт распознавания антигена и антигенсвязывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fv-антитело состоит из димера одной тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации, и три гиперпеременных области каждого переменного домена взаимодействуют, определяя антигенсвязывающий сайт на поверхности димера VH-VL. В некоторых вариантах осуществления изобретения шесть гиперпеременных областей придают антигенсвязывающую специфичность антителу. В некоторых вариантах осуществления изобретения один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три гиперпеременных участка, специфичных в отношении

антигена, включая однодоменные антитела, выделенные из верблюдовых животных, содержащие один переменный домен тяжелой цепи, такие как V_{HH}-антитела или нанотела), обладает способностью распознавать и связывать антиген. В некоторых случаях библиотеки, описанные в настоящем документе, содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, где антитело представляет собой одноцепочечный F_v или scF_v, включая фрагменты антител, содержащие V_H, V_L или оба домена V_H и V_L, при этом оба домена присутствуют в одной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения Полипептид F_v дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, позволяющий scF_v образовывать желаемую структуру для связывания антигена. В некоторых случаях scF_v связан с F_c-фрагментом или V_{HH} связан с F_c-фрагментом (включая минитела). В некоторых случаях антитело содержит молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулина, например, молекулы, которые содержат сайт связывания антигена. Молекулы иммуноглобулина относятся к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4, IgA 1 и IgA 2) или подклассу.

[00114] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой поливалентное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой моновалентное, двухвалентное или поливалентное антитело. В некоторых случаях антитело является моноспецифическим, биспецифическим или мультиспецифическим. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является моновалентным моноспецифическим, моновалентным биспецифическим, моновалентным мультиспецифическим, двухвалентным моноспецифическим, двухвалентным биспецифическим, двухвалентным мультиспецифическим, поливалентным моноспецифическим, поливалентным биспецифическим, поливалентным мультиспецифическим. В некоторых случаях антитело является гомодимерным, гетеродимерным или гетеротримерным.

[00115] В некоторых вариантах осуществления изобретения библиотеки содержат иммуноглобулины, адаптированные к видам предполагаемой терапевтической мишени. Как правило, эти способы включают «маммализацию» и включают способы переноса информации о связывании антигена донора на менее иммуногенный акцептор антитела млекопитающего для получения полезных терапевтических средств. В некоторых случаях млекопитающее представляет собой мышь, крысу, лошадь, овцу, корову, примата (например, шимпанзе, бабуина, гориллу, орангутанга, обезьяну), собаку, кошку, свинью, осла, кролика и человека. В некоторых случаях в настоящем документе предложены библиотеки и способы фелинизации и канинизации антител.

[00116] «Гуманизированные» формы нечеловеческих антител могут представлять собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого антитела. Гуманизированное антитело обычно представляет собой человеческое антитело (реципиентное антитело), в котором остатки из одного или нескольких CDR заменены остатками из одного или нескольких CDR

нечеловеческого антитела (донорное антитело). Донорное антитело может представлять собой любое подходящее нечеловеческое антитело, такое как мышинное, крысиное, кроличье, куриное или нечеловеческое антитело примата, имеющее желаемую специфичность, аффинность или биологический эффект. В некоторых случаях выбранные остатки каркасной области антитела-реципиента заменяют соответствующими остатками каркасной области донорного антитела. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не обнаруживаются ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. В некоторых случаях эти модификации вносятся для дальнейшего улучшения характеристик антител.

[00117] «Канинизация» может включать способ переноса информации о связывании несобачьего антигена от донорного антитела к менее иммуногенному собачьему антителу-акцептору для создания методов лечения, применимых в качестве терапевтических средств для собак. В некоторых случаях канинизированные формы несобачьих антител, представленные в настоящем документе, представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из несобачьих антител. В некоторых случаях канинизированные антитела представляют собой последовательности собачьего антитела («акцепторное» или «реципиентное» антитело), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области несобачьих видов («донорское» антитело), такого как мышь, крыса, кролик, кошка, собака, коза, курица, крупный рогатый скот, лошадь, лама, верблюд, одногорбые верблюды, акулы, приматы, не являющиеся человеком, человеческие, гуманизированные, рекомбинантные последовательности или сконструированные последовательности, обладающие желаемыми свойствами. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) собачьего антитела заменены соответствующими остатками FR, не относящимися к собачьему. В некоторых случаях канинизированные антитела включают остатки, которые не обнаружены в реципиентном антителе или в донорном антителе. В некоторых случаях эти модификации вносятся для дальнейшего улучшения характеристик антител. Канинизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc) собачьего антитела.

[00118] «Фелинизация» может включать способ переноса информации о связывании антигена, отличного от кошачьего, с донорного антитела на менее иммуногенный акцептор кошачьего антитела для разработки методов лечения, применимых в качестве терапевтических средств для кошек. В некоторых случаях представленные в настоящем документе фелинизированные формы некошачьих антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из некошачьих антител. В некоторых случаях фелинизированные антитела представляют собой последовательности кошачьих антител («акцепторное» или «реципиентное» антитело), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области не-кошачьего вида («донорское» антитело), такого как мышь, крыса, кролик, кошка, собака, коза, курица, крупный рогатый скот, лошадь, лама, верблюд,

одногогорбые верблюды, акулы, приматы, не являющиеся человеком, человеческие, гуманизированные, рекомбинантные последовательности или сконструированные последовательности, обладающие желаемыми свойствами. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) кошачьего антитела заменены соответствующими остатками FR, не относящимися к кошачьим. В некоторых случаях фелинизированные антитела включают остатки, которых нет в реципиентном антителе или в донорном антителе. В некоторых случаях эти модификации вносятся для дальнейшего улучшения характеристик антител. Фелинизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc) фелинизирующего антитела.

[00119] Способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для оптимизации библиотек, кодирующих неиммуноглобулин. В некоторых случаях библиотеки содержат миметики антител. Примеры миметиков антител включают, но не ограничиваются ими, антикарины, аффилины, молекулы аффител, аффимеры, аффитины, альфатела, авимеры, атримеры, DARPiны, финомеры, белки на основе домена Кунитца, монотела, антикарины, ноттины, белки на основе белков с повторами броненосца и бициклические пептид.

[00120] Библиотеки, описанные в настоящем документе, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, содержат вариации по меньшей мере в одной области антитела. Примеры областей антитела для вариации включают, но этим не ограничиваются, определяющую комплементарность область (CDR), переменный домен или константный домен. В некоторых случаях CDR представляет собой CDR1, CDR2 или CDR3. В некоторых случаях CDR представляет собой домен тяжелой цепи, включая, но этим не ограничиваясь, CDRH1, CDRH2 и CDRH3. В некоторых случаях CDR представляет собой домен легкой цепи, включая, но этим не ограничиваясь, CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В некоторых случаях переменный домен представляет собой переменный домен легкой цепи (VL) или переменный домен тяжелой цепи (VH). В некоторых случаях домен VL содержит каппа-или лямбда-цепи. В некоторых случаях константный домен представляет собой константный домен легкой цепи (CL) или константный домен тяжелой цепи (CH).

[00121] Способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотек, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, где каждая нуклеиновая кислота кодирует заранее определенный вариант по меньшей мере одной предварительно определенной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях заданная эталонная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, а библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации по крайней мере одного кодона, так что множество различных вариантов одного остатка в последующем белке, кодируемом синтезированной нуклеиновой кислотой, генерируются стандартными процессами трансляции. В некоторых случаях библиотека антител содержит различные нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие вариации в нескольких положениях. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариацию по меньшей

мере одного кодона домена CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL или VH. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации нескольких кодонов домена CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL или VH. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации нескольких кодонов элемента каркасного участка 1 (FW1), элемента каркасного участка 2 (FW2), элемента каркасного участка 3 (FW3) или элемента каркасного участка 4 (FW4). Примерное количество кодонов для вариации включает, но этим не ограничиваются, по меньшей мере или около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 225, 250, 275, 300 или более чем 300 кодонов.

[00122] В некоторых случаях по меньшей мере одна область антитела для вариации относится к семейству V-генов тяжелой цепи, семейству D-генов тяжелой цепи, семейству J-генов тяжелой цепи, семейству V-генов легкой цепи или семейству J-генов легкой цепи. В некоторых случаях семейство V-генов легкой цепи включает ген иммуноглобулина каппа (IGK) или ген иммуноглобулина лямбда (IGL). Примеры областей антитела для вариации включают, но этим не ограничиваются, IGHV1-18, IGHV1-69, IGHV1-8, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30/33m, IGHV3-28, IGHV1-69, IGHV3-74, IGHV4-39, IGHV4-59/61, IGKV1-39, IGKV1-9, IGKV2-28, IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV4-1, IGLV1-51, IGLV2-14, IGLV1-40 и IGLV3-1. В некоторых случаях ген представляет собой IGHV1-69, IGHV3-30, IGHV3-23, IGHV3, IGHV1-46, IGHV3-7, IGHV1 или IGHV1-8. В некоторых случаях ген представляет собой IGHV1-69 и IGHV3-30. В некоторых случаях область антитела для вариации представляет собой IGHJ3, IGHJ6, IGHJ, IGHJ4, IGHJ5, IGHJ2 или IGH1. В некоторых случаях область антитела для вариации представляет собой IGHJ3, IGHJ6, IGHJ или IGHJ4. В некоторых случаях по меньшей мере одна область антитела для вариации представляет собой IGHV1-69, IGHV3-23, IGKV3-20, IGKV1-39 или их комбинации. В некоторых случаях по меньшей мере одна область антитела для вариации представляет собой IGHV1-69 и IGKV3-20. В некоторых случаях по меньшей мере одна область антитела для вариации представляет собой IGHV1-69 и IGKV1-39. В некоторых случаях по меньшей мере одна область антитела для вариации представляет собой IGHV3-23 и IGKV3-20. В некоторых случаях по меньшей мере одна область антитела для вариации представляет собой IGHV3-23 и IGKV1-39.

[00123] В настоящем документе предложены библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, где библиотеки синтезируют с различным количеством фрагментов. В некоторых случаях фрагменты содержат Домен CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL или VH. В некоторых случаях фрагменты содержат элемент каркасного участка 1 (FW1), элемент каркасного участка 2 (FW2), элемент каркасного участка 3 (FW3) или элемент каркасного участка 4 (FW4). В некоторых случаях библиотеки антител синтезируются по меньшей мере или примерно из 2 фрагментов, 3 фрагментов, 4 фрагментов, 5 фрагментов или более 5 фрагментов. Длина каждого из фрагментов нуклеиновой кислоты или средняя длина синтезированных нуклеиновых кислот может составлять по меньшей мере или около 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300,

325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600 или более чем 600 пар оснований. В некоторых случаях длина составляет около от 50 до 600, от 75 до 575, от 100 до 550, от 125 до 525, от 150 до 500, от 175 до 475, от 200 до 450, от 225 до 425, от 250 до 400, от 275 до 375 или от 300 до 350 пар оснований.

[00124] Библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, описанные в настоящем документе, содержат аминокислоты различной длины при трансляции. В некоторых случаях длина каждого из аминокислотных фрагментов или средняя длина синтезированной аминокислоты может составлять по меньшей мере или около 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 или более чем 150 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислоты составляет около от 15 до 150, от 20 до 145, от 25 до 140, от 30 до 135, от 35 до 130, от 40 до 125, от 45 до 120, от 50 до 115, от 55 до 110, от 60 до 110, от 65 до 105, от 70 до 100 или от 75 до 95 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислоты составляет около 22 аминокислоты до около 75 аминокислот. В некоторых случаях антитела содержат по меньшей мере или около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или более чем 5000 аминокислот.

[00125] Ряд вариантных последовательностей для по меньшей мере одной области антитела для вариации синтезируют *de novo* с использованием способов, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях ряд вариантных последовательностей синтезируется *de novo* для CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL, VH или их комбинации. В некоторых случаях ряд вариантных последовательностей синтезируется *de novo* для элемента каркасного участка 1 (FW1), элемента каркасного участка 2 (FW2), элемента каркасного участка 3 (FW3) или элемента каркасного участка 4 (FW4). Количество вариантных последовательностей может составлять по меньшей мере или около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более чем 500 последовательностей. В некоторых случаях ряд вариантных последовательностей на по меньшей мере или около 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 или более чем 8000 последовательностей. В некоторых случаях количество вариантных последовательностей составляет около от 10 до 500, от 25 до 475, от 50 до 450, от 75 до 425, от 100 до 400, от 125 до 375, от 150 до 350, от 175 до 325, от 200 до 300, от 225 до 375, от 250 до 350 или от 275 до 325 последовательностей.

[00126] Вариант последовательности по меньшей мере одной области антитела в некоторых случаях различаются по длине или последовательности. В некоторых случаях по меньшей мере одна область, которая синтезируется *de novo*, предназначена для CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL, VH или их комбинации. В некоторых случаях по меньшей мере одна область, которая синтезируется *de novo*, предназначена для элемента каркасного участка 1 (FW1), элемента каркасного участка 2 (FW2), элемента каркасного участка 3 (FW3) или элемента каркасного участка 4 (FW4). В некоторых случаях вариантная последовательность содержит по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более чем 50 вариантов нуклеотидов или аминокислот по сравнению с диким типом. В некоторых случаях вариантная последовательность содержит по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 дополнительных нуклеотидов или аминокислот в качестве по сравнению с диким типом. В некоторых случаях вариантная последовательность содержит по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 меньше нуклеотидов или аминокислот, как по сравнению с диким типом. В некоторых случаях библиотеки содержат по меньшей мере или около 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} или более чем 10^{10} вариантов.

[00127] После синтеза библиотек антител библиотеки антител можно использовать для скрининга и анализа. Например, антитело библиотеки анализируются на предмет возможности отображения и панорамирования библиотек. В некоторых случаях отображаемость оценивается с помощью выбираемого тега. Примеры меток включают, но не ограничиваются ими, радиоактивную метку, флуоресцентную метку, фермент, хемилюминесцентную метку, колориметрическую метку, аффинную метку или другие метки или метки, известные в данной области. В некоторых случаях меткой является гистидин, полигистидин, тус, гемагглютинин (НА) или FLAG. В некоторых случаях антитело библиотеки анализируют путем секвенирования с использованием различных методов, включая, помимо прочего, секвенирование одной молекулы в реальном времени (SMRT), секвенирование по Полони, секвенирование путем лигирования, секвенирование с обратимым терминатором, секвенирование с обнаружением протонов, секвенирование с ионным полупроводником, секвенирование с нанопорами, электронное секвенирование, пиросеквенирование, секвенирование Максама-Гилберта, секвенирование с обрывом цепи (например, по Сэнгеру), секвенирование +S или секвенирование путем синтеза. В некоторых случаях библиотеки антител отображаются на поверхности клетки или фага. В некоторых случаях библиотеки антител обогащают последовательностями с желаемой активностью с помощью фагового дисплея.

[00128] В некоторых случаях библиотеки антител анализируют на функциональную активность, структурную стабильность (например, термостабильность или рН-стабильность), экспрессию, специфичность или их комбинацию. В некоторых случаях библиотеки антител анализируют на наличие антител, способных к укладке. В некоторых случаях область антитела анализируют на функциональную активность, структурную стабильность, экспрессию, специфичность, укладку или их комбинацию. Например, область VH или область VL анализируют на функциональную активность, структурную стабильность, экспрессию, специфичность, укладку или их комбинацию.

[00129] В некоторых случаях аффинность антител или IgG, полученных способами, описанными в настоящем документе, составляет по меньшей мере или около 1,5-кратное, 2,0-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 20-кратное, 30-кратное, 40-кратное, 50-кратное, 60-кратное, 70-кратное, 80-кратное, 90-кратное, 100-кратное, 200-кратное или более чем 200-кратное улучшение аффинности связывания по сравнению с антителом-компаратором. В

некоторых случаях аффинность антител или IgG, полученных способами, описанными в настоящем документе, составляет по меньшей мере или около 1,5-кратное, 2,0-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 20-кратное, 30-кратное, 40-кратное, 50-кратное, 60-кратное, 70-кратное, 80-кратное, 90-кратное, 100-кратное, 200-кратное или более чем 200-кратное улучшение функции по сравнению с антителом-компаратором. В некоторых случаях антитело-компаратор представляет собой антитело со сходной структурой, последовательностью или антигеном-мишенью.

[00130] *Системы экспрессии*

[00131] В настоящем документе предложены библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, содержащее связывающие домены, где библиотеки обладают улучшенной специфичностью, стабильностью, экспрессией, укладкой или последующей активностью. В некоторых случаях библиотеки, описанные в настоящем документе, используются для скрининга и анализа.

[00132] В настоящем документе предложены библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, содержащее связывающие домены, где библиотеки нуклеиновых кислот используются для скрининга и анализа. В некоторых случаях скрининг и анализ включают анализы *in vitro*, *in vivo*, или *ex vivo*. Клетки для скрининга включают первичные клетки, взятые у живых субъектов, или клеточные линии. Клетки могут происходить от прокариот (например, бактерий и грибов) или эукариот (например, животных и растений). Примеры клеток животных включают, без ограничения, клетки мыши, кролика, примата и насекомого. В некоторых случаях клетки для скрининга включают клеточную линию, включая, но этим не ограничиваясь, клеточную линию яичника китайского хомячка (СНО), клеточную линию эмбриональной почки человека (НЕК) или клеточную линию почки детеныша хомячка (ВНК). В некоторых случаях библиотеки нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, также могут быть доставлены в многоклеточный организм. Примеры многоклеточных организмов включают, без ограничения, растение, мышь, кролика, примата и насекомое.

[00133] Библиотеки нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, могут подвергаться скринингу на различные фармакологические или фармакокинетические свойства. В некоторых случаях библиотеки подвергают скринингу с использованием анализов *in vitro*, анализов *in vivo* или анализов *ex vivo*. Например, проверяемые *in vitro* фармакологические или фармакокинетические свойства включают, но не ограничиваются ими, аффинность связывания, специфичность связывания и авидность связывания. Типичные фармакологические или фармакокинетические свойства *in vivo* библиотек, описанных в настоящем документе, которые подвергаются скринингу, включают, но этим не ограничиваются, терапевтическую эффективность, активность, свойства доклинической токсичности, свойства клинической эффективности, свойства клинической токсичности, иммуногенность, активность и свойства клинической безопасности.

[00134] В настоящем документе предложены библиотеки нуклеиновых кислот, в которых библиотеки нуклеиновых кислот могут быть экспрессированы в векторе. Векторы

экспрессии для встраивания библиотек нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, могут включать эукариотические или прокариотические векторы экспрессии. Примеры векторов экспрессии включают, без ограничения, векторы экспрессии млекопитающих: pSF-CMV-NEO-NH2-PPT-3XFLAG, pSF-CMV-NEO-COOH-3XFLAG, pSF-CMV-PURO-NH2-GST-TEV, pSF-OXB20-COOH-TEV-FLAG(R)-6His, pCEP4 pDEST27, pSF-CMV-Ub-KrYFP, pSF-CMV-FMDV-daGFP, вектор pEF1a-mCherry-N1, вектор pEF1a-tdTomato, pSF-CMV-FMDV-Hygro, pSF-CMV-PGK-Puro, pMCP-tag(m) и pSF-CMV-PURO-NH2-CMYC; бактериальные векторы экспрессии: pSF-OXB20-BetaGal, pSF-OXB20-Fluc, pSF-OXB20 и pSF-Tac; растительные векторы экспрессии: pRI 101-AN DNA и pCambia2301; и дрожжевые векторы экспрессии: pTYB21 и pKLAC2 и векторы насекомых: pAc5,1/V5-His A и pDEST8. В некоторых случаях вектор представляет собой pсDNA3 или pсDNA3.1.

[00135] В настоящем документе описаны библиотеки нуклеиновых кислот, которые экспрессируются в векторе для создания конструкции, содержащей антитело. В некоторых случаях размер конструкции варьируется. В некоторых случаях конструкция содержит по меньшей мере или около 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 2000, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800, 4000, 4200, 4400, 4600, 4800, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, или более чем 10000 оснований. В некоторых случаях конструкция включает диапазон от около 300 до 1000, от 300 до 2000, от 300 до 3000, от 300 до 4000, от 300 до 5000, от 300 до 6000, от 300 до 7000, от 300 до 8000, от 300 до 9000, от 300 до 10000, от 1000 до 2000, от 1000 до 3000, от 1000 до 4000, от 1000 до 5000, от 1000 до 6000, от 1000 до 7000, от 1000 до 8000, от 1000 до 9000, от 1000 до 10000, от 2000 до 3000, от 2000 до 4000, от 2000 до 5000, от 2000 до 6000, от 2000 до 7000, от 2000 до 8000, от 2000 до 9000, от 2000 до 10000, от 3000 до 4000, от 3000 до 5000, от 3000 до 6000, от 3000 до 7000, от 3000 до 8000, от 3000 до 9000, от 3000 до 10000, от 4000 до 5000, от 4000 до 6000, от 4000 до 7000, от 4000 до 8000, от 4000 до 9000, от 4000 до 10000, от 5000 до 6000, от 5000 до 7000, от 5000 до 8000, от 5000 до 9000, от 5000 до 10000, от 6000 до 7000, от 6000 до 8000, от 6000 до 9000, от 6000 до 10000, от 7000 до 8000, от 7000 до 9000, от 7000 до 10000, от 8000 до 9000, от 8000 до 10000 или от 9000 до 10000 оснований.

[00136] В настоящем документе предложены библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, где библиотеки нуклеиновых кислот экспрессируются в клетке. В некоторых случаях библиотеки синтезируют для экспрессии репортерного гена. Примеры репортерных генов включают, но этим не ограничиваются, ацетогидроксикислотную синтазу (AHAS), щелочную фосфатазу (AP), бета-галактозидазу (LacZ), бета-глюкуронидазу (GUS), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), лазурный флуоресцентный белок, цитриновый флуоресцентный белок, оранжевый флуоресцентный белок, вишневый флуоресцентный белок, бирюзовый флуоресцентный белок, синий флуоресцентный белок, пероксидазу хрена (HRP), люциферазу (Luc), нопалинсинтазу

(NOS), октопинсинтазу (OCS), люциферазу и их производные. Способы определения модуляции репортерного гена хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, флуорометрические методы (например, флуоресцентная спектроскопия, сортировка активированных флуоресценцией клеток (FACS), флуоресцентная микроскопия) и определение устойчивости к антибиотикам.

[00137] Заболевания и расстройства

[00138] В настоящем документе предложены библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, содержащие домены связывания SARS-CoV-2 или ACE2, которые могут оказывать терапевтическое действие. В некоторых случаях библиотеки связывания SARS-CoV-2 или ACE2 при трансляции дают белок, который используется для лечения заболевания или расстройства. В некоторых случаях белок представляет собой иммуноглобулин. В некоторых случаях белок представляет собой пептидомиметик. В некоторых случаях заболевание или расстройство представляет собой вирусную инфекцию, вызванную SARS-CoV-2. В некоторых случаях заболевание или расстройство представляет собой респираторное заболевание или расстройство, вызванное SARS-CoV-2.

[00139] Библиотеки вариантных антител SARS-CoV-2 или ACE2, описанные в настоящем документе, могут быть использованы при лечении SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения библиотеки вариантных антител SARS-CoV-2 или ACE2 используются для лечения или предотвращения симптомов SARS-CoV-2. Эти симптомы включают, но этим не ограничиваются, лихорадку, озноб, кашель, усталость, головные боли, потерю вкуса, потерю обоняния, тошноту, рвоту, мышечную слабость, проблемы со сном, тревогу и депрессию. В некоторых вариантах осуществления изобретения библиотеки вариантных антител SARS-CoV-2 или ACE2 используются для лечения субъекта, имеющего симптомы в течение продолжительного периода времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта наблюдаются симптомы в течение длительного периода времени после отрицательного результата теста на SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта наблюдаются симптомы в течение длительного периода времени, включая по меньшей мере 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год или более чем 1 год.

[00140] В некоторых случаях субъектом является млекопитающее. В некоторых случаях субъектом является мышь, кролик, собака или человек. Субъекты, которых лечат описанными здесь способами, могут быть младенцами, взрослыми или детьми. Фармацевтические композиции, содержащие антитела или фрагменты антител, описанные в настоящем документе, можно вводить внутривенно или подкожно. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, включающие последовательность CDRH1 любой из SEQ ID NO: 217-266, 1495-1635, или 2059-2238. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе,

включающие последовательность CDRH2 любой из SEQ ID NO: 267-316, 1636-1776, или 2239-2418 В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, включающие последовательность CDRH3 любой из SEQ ID NO: 317-366, 1777-1917, или 2419-2598. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, включающие переменный домен, область тяжелой цепи (VH) и переменный домен, область легкой цепи (VL), где VH содержит определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где VL содержит определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282; (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена любой из SEQ ID NO: 37-72 или 283-348; (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена любой из SEQ ID NO: 73-108 или 349-414; (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена любой из SEQ ID NO: 109-144 или 415-473; (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена любой из SEQ ID NO: 145-180 или 415-473; и (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена любой из SEQ ID NO: 181-216 или 533-591. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, включающие а VH на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 592-657, и VL на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 658-716. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, включающие переменный домен тяжелой цепи на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 1918-2058, 2599-2778 и 3095-3173.

[00141] Антитела к SARS-CoV-2 или ACE2, описанные в настоящем документе, могут обеспечивать иммунитет после воздействия антител к SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела SARS-CoV-2 или ACE2, описанные в настоящем документе, используются для пассивной иммунизации субъекта. В некоторых случаях субъект активно иммунизируется после воздействия антител к SARS-CoV-2 или ACE2 с последующим воздействием SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к SARS-CoV-2 или ACE2 получены от субъекта, который выздоровел от SARS-CoV-2.

[00142] В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунитет возникает по меньшей мере через примерно 30 минут, 1 час, 5 часов, 10 часов, 16 часов, 20 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели или более чем 2 недели после воздействия антител SARS-CoV-2 или ACE2. В некоторых случаях иммунитет сохраняется по меньшей мере примерно 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3

недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет или более чем 5 лет после воздействия антител SARS-CoV-2 или ACE2.

[00143] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект получает антитела SARS-CoV-2 или ACE2 перед воздействием SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект получает антитела SARS-CoV-2 или ACE2 по меньшей мере примерно 30 минут, 1 час, 4 часа, 8 часов, 12 часа, 16 часов, 20 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет или более чем 5 лет перед воздействием SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект получает антитела SARS-CoV-2 или ACE2 после воздействия SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект получает антитела SARS-CoV-2 или ACE2 по меньшей мере примерно 30 минут, 1 час, 4 часа, 8 часов, 12 часа, 16 часов, 20 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет или более чем 5 лет после воздействия SARS-CoV-2.

[00144] Антитела к SARS-CoV-2 или ACE2, описанные в настоящем документе, могут быть введены различными путями. Введение может, в зависимости от вводимой композиции, например, быть пероральным, легочным, внутривенным, внутривентральным, внутримышечным, внутривагинальным, подкожным или чрескожным.

[00145] В настоящем документе описаны композиции или фармацевтические композиции, включающие антитела к SARS-CoV-2 или ACE2 или фрагмент антитела, которые содержат различные дозы антител или фрагментов антител. В некоторых случаях дозировка находится в диапазоне от около 1 до 25 мг/кг, от около 1 до 50 мг/кг, от около 1 до 80 мг/кг, от около 1 до около 100 мг/кг, от около 5 до около 100 мг/кг, от около 5 до около 80 мг/кг, от около 5 до около 60 мг/кг, от около 5 до около 50 мг/кг или от около 5 до около 500 мг/кг, которые можно вводить однократно или многократно. В некоторых случаях дозу вводят в количестве около 0,01 мг/кг, около 0,05 мг/кг, около 0,10 мг/кг, около 0,25 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг, около 40 мг/кг, около 45 мг/кг, около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, около 95 мг/кг, около 100 мг/кг, около 105 мг/кг, около 110 мг/кг, около 115 мг/кг, около 120, около 125, около 130, около 135, около 140, около 145, около 150, около 155, около 160, около 165, около 170, около 175, около 180, около 185, около 190, около 195, около 200, около 205, около 210, около 215, около 220, около 225, около 230, около 240, около 250, около 260, около 270, около 275, около 280, около 290, около 300, около 310, около 320, около 330, около 340, около 350, около 360 мг/кг, около 370 мг/кг, около 380 мг/кг, около 390 мг/кг, около 400 мг/кг, 410 мг/кг, около

420 мг/кг, около 430 мг/кг, около 440 мг/кг, около 450 мг/кг, около 460 мг/кг, около 470 мг/кг, около 480 мг/кг, около 490 мг/кг или около 500 мг/кг.

[00146] Антитела к SARS-CoV-2 или ACE2 или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления изобретения облегчают тяжесть заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела SARS-CoV-2 или ACE2 или фрагмент антитела облегчают тяжесть заболевания при уровне дозы около 0,01 мг/кг, около 0,05 мг/кг, около 0,10 мг/кг, около 0,25 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг или около 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела SARS-CoV-2 или ACE2 или фрагмент антитела облегчают тяжесть заболевания при уровне дозы около 1 мг/кг, около 5 мг/кг или около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжесть заболевания определяется процентной потерей веса. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела SARS-CoV-2 или ACE2 или фрагмент антитела защищают от потери веса при уровне дозы около 0,01 мг/кг, около 0,05 мг/кг, около 0,10 мг/кг, около 0,25 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг или около 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела SARS-CoV-2 или ACE2 или фрагмент антитела защищают от потери веса при уровне дозы около 1 мг/кг, около 5 мг/кг или около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к SARS-CoV-2 или ACE2 или фрагмент антитела.

[00147] Библиотеки вариантов

[00148] Вариация кодона

[00149] Библиотеки вариантных последовательностей нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, могут содержать множество нуклеиновых кислот, где каждая нуклеиновая кислота кодирует вариантную последовательность кодона по сравнению с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях каждая нуклеиновая кислота первой популяции нуклеиновых кислот содержит вариант в одном сайте варианта. В некоторых случаях первая популяция нуклеиновых кислот содержит множество вариантов в одном вариантном сайте, так что первая популяция нуклеиновых кислот содержит более одного варианта в одном и том же вариантном сайте. Первая популяция нуклеиновых кислот может содержать нуклеиновые кислоты, коллективно кодирующие несколько вариантов кодонов в одном и том же вариантном сайте. Первая популяция нуклеиновых кислот может содержать нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие до 19 или более кодонов в одном и том же положении. Первая популяция нуклеиновых кислот может содержать нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие до 60 различных триплетов в одном и том же положении, или первая популяция нуклеиновых кислот может содержать нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие до 61 различных триплетов кодонов в одном и том же положении. Каждый вариант может кодировать кодон, который приводит к другой аминокислоте во время трансляции. В **таблице 1** представлен список всех возможных кодонов (и репрезентативной аминокислоты) для вариантного сайта.

Таблица 1. Список кодонов и аминокислот

Аминокислоты	Одно буквенный код	Трёх буквенный код	Кодоны					
Аланин	A	Ala	GC A	GC C	GC G	GCT		
Цистеин	C	Cys	TG C	TGT				
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GA C	GAT				
Глутаминовая кислота	E	Glu	GA A	GAG				
Фенилаланин	F	Phe	TTC	TTT				
Глицин	G	Gly	GG A	GG C	GG G	GGT		
Гистидин	H	His	CA C	CAT				
Изолейцин	I	Iso	AT A	AT C	ATT			
Лизин	K	Lys	AA A	AAG				
Лейцин	L	Leu	TT A	TT G	CT A	CT C	CT G	CTT
Метионин	M	Met	ATG					
Аспарагин	N	Asn	AA C	AAT				
Пролин	P	Pro	CC A	CC C	CC G	CCT		
Глутамин	Q	Gln	CA A	CAG				
Аргинин	R	Arg	AG A	AG G	CG A	CG C	CG G	CG T
Серин	S	Ser	AG C	AG T	TC A	TC C	TC G	TCT

Треонин	T	Thr	AC A	AC C	AC G	ACT
Валин	V	Val	GT A	GT C	GT G	GTT
Триптофан	W	Trp	TGG			
Тирозин	Y	Tyr	TA C	TAT		

[00150] Популяция нуклеиновых кислот может включать различные нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие до 20 вариаций кодонов в нескольких положениях. В таких случаях каждая нуклеиновая кислота в популяции содержит вариации для кодонов более чем в одном положении в одной и той же нуклеиновой кислоте. В некоторых случаях каждая нуклеиновая кислота в популяции содержит вариации для кодонов в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более значениях кодонов в одной нуклеиновой кислоте. В некоторых случаях каждая вариантная длинная нуклеиновая кислота содержит вариации для кодонов в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более значениях кодонов в одной длинной нуклеиновой кислоте. В некоторых случаях популяция вариантных нуклеиновых кислот содержит вариации для кодонов в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более значениях кодонов в одной нуклеиновой кислоте. В некоторых случаях популяция вариантных нуклеиновых кислот содержит вариации для кодонов *in* по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более значениях кодонов в одной длинной нуклеиновой кислоте.

[00151] Высокопараллельный синтез нуклеиновых кислот

[00152] В настоящем документе предложен платформенный подход, использующий миниатюризацию, распараллеливание и вертикальную интеграцию сквозного процесса от синтеза полинуклеотидов до сборки генов в нанолунках на кремнии для создания революционной платформы синтеза. Устройства, описанные в настоящем документе, при той же занимаемой площади, что и 96-луночный планшет, обеспечивают платформу для синтеза кремния, способную увеличить производительность в 1000 или более раз по сравнению с традиционными методами синтеза с получением примерно до 1000000 или более полинуклеотидов или 10000 или более генов в одном высокопараллельном цикле.

[00153] С появлением секвенирования следующего поколения геномные данные с высоким разрешением стали важным фактором для исследований, которые углубляются в биологические роли различных генов как в нормальной биологии, так и в патогенезе заболеваний. В основе этого исследования лежит центральная догма молекулярной биологии и концепция «остаточного переноса последовательной информации». Геномная информация, закодированная в DNA, транскрибируется в сообщение, которое затем транслируется в белок, являющийся активным продуктом данного биологического пути.

[00154] Еще одна интересная область исследований связана с открытием, разработкой и производством терапевтических молекул, ориентированных на высокоспецифичную клеточную мишень. В основе конвейеров разработки целевых терапевтических средств лежат библиотеки последовательностей DNA с высоким разнообразием. Варианты генов используются для экспрессии белков в цикле проектирования, построения и тестирования белковой инженерии, который идеально завершается оптимизированным геном для высокой экспрессии белка с высокой аффинностью к его терапевтической мишени. В качестве примера можно рассмотреть связывающий карман рецептора. Возможность одновременного тестирования всех перестановок последовательностей всех остатков в связывающем кармане позволит провести тщательное исследование, увеличивая шансы на успех. Мутагенез с насыщением, при котором исследователь пытается создать все возможные мутации или варианты в определенном месте внутри рецептора, представляет собой один из подходов к этой проблеме развития. Несмотря на то, что это дорого, требует много времени и труда, он позволяет внедрить каждый вариант в каждую позицию. Напротив, комбинаторный мутагенез, при котором несколько выбранных позиций или короткий участок DNA могут быть сильно модифицированы, создает неполный репертуар вариантов с предвзятым представлением.

[00155] Чтобы ускорить процесс разработки лекарств, библиотека с желаемыми вариантами, доступными с предполагаемой частотой в правильном месте, доступном для тестирования, другими словами, прецизионная библиотека, позволяет снизить затраты, а также время выполнения скрининга. В настоящем документе предложены способы синтеза библиотек синтетических вариантов нуклеиновых кислот, которые обеспечивают точное введение каждого предполагаемого варианта с желаемой частотой. Для конечного пользователя это означает возможность не только тщательной выборки пространства последовательностей, но и возможность эффективно запрашивать эти гипотезы, сокращая затраты и время проверки. Полногеномное редактирование может выявить важные пути, библиотеки, в которых каждый вариант и перестановку последовательности можно протестировать на предмет оптимальной функциональности, и могут быть использованы тысячи генов для реконструкции целых путей и геномов, чтобы реконструировать биологические системы для открытия лекарств.

[00156] В первом примере само лекарство может быть оптимизировано с использованием способов, описанных в настоящем документе. Например, для улучшения определенной функции антитела разрабатывают и синтезируют вариантную полинуклеотидную библиотеку, кодирующую часть антитела. Библиотека вариантов нуклеиновых кислот для антитела затем может быть создана способами, описанными в настоящем документе (например, мутагенез PCR с последующей вставкой в вектор). Затем антитело экспрессируют в производственной клеточной линии и подвергают скринингу на повышенную активность. Примеры скрининга включают изучение модуляции аффинности связывания с антигеном, стабильности или эффекторной функции (например, ADCC,

комплемента или апоптоза). Типичные области для оптимизации антитела включают, без ограничения, Fc-область, Fab-область, переменную область Fab-области, константную область Fab-области, переменную область тяжелой цепи или легкой цепи (V_H или V_L) и специфические определяющие комплементарность области (CDR) V_H или V_L .

[00157] Библиотеки нуклеиновых кислот, синтезированные способами, описанными в настоящем документе, могут быть экспрессированы в различных клетках, связанных с болезненным состоянием. Клетки, связанные с болезненным состоянием, включают клеточные линии, образцы тканей, первичные клетки субъекта, культивируемые клетки субъекта или клетки в модельной системе. Примеры модельных систем включают, без ограничения, растительные и животные модели болезненного состояния.

[00158] Для идентификации вариантной молекулы, связанной с предотвращением, уменьшением или лечением болезненного состояния, вариантная библиотека нуклеиновых кислот, описанная в настоящем документе, экспрессируется в клетке, связанной с болезненным состоянием, или в клетке, в которой болезненное состояние может быть индуцировано. В некоторых случаях агент используется для индуцирования болезненного состояния в клетках. Примеры инструментов для индукции болезненного состояния включают, без ограничения, систему рекомбинации Cre/Lox, индукцию воспаления LPS и стрептозотоцин для индуцирования гипогликемии. Клетки, связанные с болезненным состоянием, могут быть клетками из модельной системы или культивируемыми клетками, а также клетками субъекта, имеющего конкретное болезненное состояние. Примеры болезненных состояний включают бактериальное, грибковое, вирусное, аутоиммунное или пролиферативное заболевание (например, рак). В некоторых случаях библиотеку вариантных нуклеиновых кислот экспрессируют в модельной системе, клеточной линии или первичных клетках, полученных от субъекта, и подвергают скринингу на наличие изменений по меньшей мере в одной клеточной активности. Примеры клеточной активности включают, без ограничения, пролиферацию, прогрессирование цикла, гибель клеток, адгезию, миграцию, репродукцию, передачу клеточных сигналов, выработку энергии, использование кислорода, метаболическую активность и старение, реакцию на повреждение свободными радикалами или любую их комбинацию.

[00159] Подложки

[00160] Устройства, используемые в качестве поверхности для синтеза полинуклеотидов, могут быть в форме подложек, которые включают, без ограничения, гомогенные матричные поверхности, узорчатые матричные поверхности, каналы, гранулы, гели и тому подобное. В настоящем документе предложены подложки, содержащие множество кластеров, где каждый кластер содержит множество локусов, поддерживающих присоединение и синтез полинуклеотидов. В некоторых случаях подложки содержат однородную матричную поверхность. Например, поверхность однородного массива представляет собой однородную пластину. Термин «локус», как используется в документе, относится к дискретному участку в структуре, который обеспечивает поддержку полинуклеотидов, кодирующих одну заданную последовательность, простирающуюся от

поверхности. В некоторых случаях локус находится на двумерной поверхности, например, по существу плоской поверхности. В некоторых случаях локус находится на трехмерной поверхности, например, лунка, микролунка, канал, или столб. В некоторых случаях поверхность локуса содержит материал, который активно функционализирован для присоединения по меньшей мере к одному нуклеотиду для синтеза полинуклеотидов или предпочтительно к популяции идентичных нуклеотидов для синтеза популяции полинуклеотидов. В некоторых случаях полинуклеотид относится к популяции полинуклеотидов, кодирующих одну и ту же последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях поверхность подложки включает одну или множество поверхностей подложки. Средняя частота ошибок для полинуклеотидов, синтезированных в описанной в настоящем документе библиотеке с использованием предоставленных систем и способов, часто составляет менее чем 1 из 1000, менее чем около 1 из 2000, менее чем около 1 из 3000 или реже без исправления ошибок.

[00161] В настоящем документе предложены поверхности, поддерживающие параллельный синтез множества полинуклеотидов, имеющих разные заданные последовательности в адресуемых местах на общей подложке. В некоторых случаях подложка поддерживает синтез более чем 50 100 200 400 600 800 1000 1200 1400 1600 1800 2000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 1200000, 1400000, 1600000, 1800000, 2000000, 2500000, 3000000, 3500000, 4000000, 4500000, 5000000, 10000000 или более неидентичных полинуклеотидов. В некоторых случаях поверхности обеспечивают поддержку синтеза более чем 50 100 200 400 600 800 1000 1200 1400 1600 1800 2000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 1200000, 1400000, 1600000, 1800000, 2000000, 2500000, 3000000, 3500000, 4000000, 4500000, 5000000, 10000000 или более полинуклеотидов, кодирующих отдельные последовательности. В некоторых случаях по меньшей мере часть полинуклеотидов имеет идентичную последовательность или предназначена для синтеза с идентичной последовательностью. В некоторых случаях подложка обеспечивает поверхностную среду для роста полинуклеотидов, имеющих по меньшей мере 80, 90, 100, 120, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 оснований или более.

[00162] В настоящем документе предложены способы синтеза полинуклеотидов на различных локусах субстрата, где каждый локус поддерживает синтез популяции полинуклеотидов. В некоторых случаях каждый локус поддерживает синтез популяции полинуклеотидов, имеющих другую последовательность, чем популяция полинуклеотидов, выращенных на другом локусе. В некоторых случаях каждая полинуклеотидная последовательность синтезируется с избыточностью 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более по разным локусам в одном и том же кластере локусов на поверхности для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях локусы субстрата расположены во множестве кластеров. В некоторых случаях подложка содержит по меньшей мере 10, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 20000,

30000, 40000, 50000 или более кластеров. В некоторых случаях подложка содержит более чем 2000, 5000, 10000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 1100000, 1200000, 1300000, 1400000, 1500000, 1600000, 1700000, 1800000, 1900000, 2000000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 1200000, 1400000, 1600000, 1800000, 2000000, 2500000, 3000000, 3500000, 4000000, 4500000, 5000000 или 10000000 или более различных локусов. В некоторых случаях подложка содержит около 10000 различных локусов. Количество локусов в пределах одного кластера в разных случаях неодинаково. В некоторых случаях каждый кластер включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 150, 200, 300, 400, 500 или более локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 50-500 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 100-200 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 100-150 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 109, 121, 130 или 137 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 19, 20, 61, 64 или более локусов. Альтернативно или в комбинации синтез полинуклеотидов происходит на поверхности гомогенной матрицы.

[00163] В некоторых случаях количество различных полинуклеотидов, синтезированных на подложке, зависит от количества различных локусов, доступных в подложке. В некоторых случаях плотность локусов в кластере или на поверхности подложки составляет по меньшей мере или около 1, 10, 25, 50, 65, 75, 100, 130, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 1000 или более локусов на мм^2 . В некоторых случаях подложка содержит 10-500, 25-400, 50-500, 100-500, 150-500, 10-250, 50-250, 10-200 или 50-200 мм^2 . В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних локусов внутри кластера или поверхности составляет около 10-500, около 10-200 или около 10-100 $\mu\text{м}$. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних локусов больше чем около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 $\mu\text{м}$. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних локусов составляет менее чем около 200, 150, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 $\mu\text{м}$. В некоторых случаях каждый локус имеет ширину около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 $\mu\text{м}$. В некоторых случаях каждый локус имеет ширину около 0,5-100, 0,5-50, 10-75 или 0,5-50 $\mu\text{м}$.

[00164] В некоторых случаях плотность кластеров в подложке составляет по меньшей мере или около 1 кластера на 100 мм^2 , 1 кластер на 10 мм^2 , 1 кластер на 5 мм^2 , 1 кластер на 4 мм^2 , 1 кластер на 3 мм^2 , 1 кластер на 2 мм^2 , 1 кластер на 1 мм^2 , 2 кластера на 1 мм^2 , 3 кластера на 1 мм^2 , 4 кластера на 1 мм^2 , 5 кластеров на 1 мм^2 , 10 кластеров на 1 мм^2 , 50 кластеров на 1 мм^2 или более. В некоторых случаях подложка содержит от около 1 кластера на 10 мм^2 до около 10 кластеров на 1 мм^2 . В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров составляет по меньшей мере или около 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 или 5000 $\mu\text{м}$. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров находится в диапазоне около 50-100, 50-200, 50-300, 50-500 и 100-2000 $\mu\text{м}$. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров находится в диапазоне около 0,05-50, 0,05-10, 0,05-5, 0,05-4, 0,05-3, 0,05-2, 0,1-10, 0,2-10, 0,3-10, 0,4-10,

0,5-10, 0,5-5 или 0,5-2 мм. В некоторых случаях каждый кластер имеет поперечное сечение от около 0,5 до около 2, от около 0,5 до около 1 или от около 1 до около 2 мм. В некоторых случаях каждый кластер имеет поперечное сечение около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 мм. В некоторых случаях каждый кластер имеет внутреннее поперечное сечение около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,15, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 мм.

[00165] В некоторых случаях подложка имеет размер стандартного 96-луночного планшета, например, между около 100 и около 200 мм и между около 50 и около 150 мм. В некоторых случаях подложка имеет диаметр менее чем или равный около 1000, 500, 450, 400, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 мм. В некоторых случаях диаметр подложки находится в диапазоне около 25-1000, 25-800, 25-600, 25-500, 25-400, 25-300 или 25-200 мм. В некоторых случаях подложка имеет площадь плоской поверхности по меньшей мере около 100; 200; 500; 1000; 2000; 5000; 10000; 12000; 15000; 20000; 30000; 40000; 50000 мм² или более. В некоторых случаях толщина подложки находится в диапазоне около 50-2000, 50-1000, 100-1000, 200-1000 или 250-1000 мм.

[00166] *Материалы поверхности*

[00167] Подложки, устройства и реакторы, представленные в настоящем документе, изготовлены из любого разнообразия материалов, подходящих для способов, композиций и систем, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях материалы подложки изготавливаются с низким уровнем связывания нуклеотидов. В некоторых случаях материалы подложки модифицируют для создания различных поверхностей, демонстрирующих высокий уровень связывания нуклеотидов. В некоторых случаях материалы подложки прозрачны для видимого и/или ультрафиолетового света. В некоторых случаях материалы подложки обладают достаточной проводимостью, например, способны формировать однородные электрические поля по всей подложке или ее части. В некоторых случаях проводящие материалы соединены с электрическим заземлением. В некоторых случаях подложка является теплопроводной или изолирующей. В некоторых случаях материалы являются химически стойкими и термостойкими, чтобы поддерживать химические или биохимические реакции, например процессы реакции синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях подложка содержит гибкие материалы. Что касается гибких материалов, материалы могут включать, без ограничения, нейлон, как модифицированный, так и немодифицированный, нитроцеллюлозу, полипропилен и тому подобное. В некоторых случаях подложка содержит жесткие материалы. Материалы для жестких материалов могут включать, помимо прочего: стекло; плавкий кремнезем; кремний, пластмассы (например, политетрафторэтилен, полипропилен, полистирол, поликарбонат и их смеси и тому подобное); металлы (например, золото, платина и тому подобное). Подложка, твердая подложка или реакторы могут быть изготовлены из материала, выбранного из группы, включающей кремний, полистирол, агарозу, декстран, полимеры целлюлозы, полиакриламиды, полидиметилсилоксан, (PDMS) и стекло. Подложки/твердые подложки или микроструктуры, реакторы могут быть изготовлены из

комбинации материалов, перечисленных в настоящем документе, или любого другого подходящего материала, известного в данной области техники.

[00168] Архитектура поверхности

[00169] В настоящем документе предложены подложки для способов, композиций и систем, описанных в настоящем документе, при этом подложки имеют структуру поверхности, подходящую для способов, композиций и систем, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях подложка имеет выпуклые и/или вогнутые элементы. Одним из преимуществ таких свойств является увеличение площади поверхности для поддержки синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях подложка, имеющая выпуклые и/или вогнутые элементы, называется трехмерной подложкой. В некоторых случаях трехмерная подложка содержит один или несколько каналов. В некоторых случаях один или несколько локусов составляют канал. В некоторых случаях каналы доступны для нанесения реагента через устройство для нанесения, такое как устройство для нанесения материала. В некоторых случаях реагенты и/или жидкости собираются в большей лунке в одном или нескольких каналах сообщения жидкости. Например, подложка содержит множество каналов, соответствующих множеству локусов с кластером, и множество каналов сообщаются по текучей среде с одной лункой кластера. В некоторых способах библиотеку полинуклеотидов синтезируют во множестве локусов кластера.

[00170] В настоящем документе предложены подложки для способов, композиций и систем, описанных в настоящем документе, где субстраты сконфигурированы для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях структура сконфигурирована таким образом, чтобы обеспечить управляемый поток и пути массопереноса для синтеза полинуклеотидов на поверхности. В некоторых случаях конфигурация субстрата позволяет контролировать и равномерно распределять пути массопереноса, время химического воздействия и/или эффективность промывки в процессе синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях конфигурация подложки позволяет увеличить эффективность развертки, например, обеспечивая достаточный объем для растущего полинуклеотида, так что объем, исключенный растущим полинуклеотидом, занимает не более 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или меньше изначально доступного объема, доступного или подходящего для выращивания полинуклеотида. В некоторых случаях трехмерная структура позволяет управлять потоком жидкости, чтобы обеспечить быстрый обмен химическим воздействием.

[00171] В настоящем документе предложены подложки для способов, композиций и систем, описанных в настоящем документе, где подложки содержат структуры, подходящие для способов, композиций и систем, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях сегрегация достигается физической структурой. В некоторых случаях сегрегация достигается за счет дифференциальной функционализации поверхности, генерирующей активные и пассивные участки для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях дифференциальная функционализация достигается за счет чередования гидрофобности на поверхности подложки, тем самым создавая эффекты краевого угла

смачивания водой, которые вызывают образование капель или смачивание нанесенных реагентов. Использование более крупных структур может уменьшить разбрызгивание и перекрестное загрязнение отдельных участков синтеза полинуклеотидов реагентами из соседних участков. В некоторых случаях устройство, такое как устройство для нанесения материала, используется для нанесения реагентов в различные места синтеза полинуклеотидов. Подложки, имеющие трехмерные характеристики, сконфигурированы таким образом, что позволяет синтезировать большое количество полинуклеотидов (например, более чем около 10000) с низкой частотой ошибок (например, менее чем около 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:3000, 1:5000 или 1:10000). В некоторых случаях подложка содержит элементы с плотностью около или выше чем около 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400 или 500 элементов на мм².

[00172] Лунка подложки может иметь такую же или другую ширину, высоту и/или объем, что и другая лунка подложки. Канал подложки может иметь ту же или другую ширину, высоту и/или объем, что и другой канал подложки. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, содержащей кластер, или оба, составляет между около 0,05-50, 0,05-10, 0,05-5, 0,05-4, 0,05-3, 0,05-2, 0,05-1, 0,05-0,5, 0,05-0,1, 0,1-10, 0,2-10, 0,3-10, 0,4-10, 0,5-10, 0,5-5 или 0,5-2 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, содержащей кластер, или и то, и другое составляет менее чем или около 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06 или 0,05 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, содержащей кластер, или и то, и другое составляет между около 1,0 и 1,3 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или лунки, или того и другого составляет около 1,150 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или лунки, или того и другого составляет около 0,08 мм. Диаметр кластера относится к кластерам внутри двумерной или трехмерной подложки.

[00173] В некоторых случаях высота лунки составляет около 20-1000, 50-1000, 100-1000, 200-1000, 300-1000, 400-1000 или 500-1000 мкм. В некоторых случаях высота лунки составляет менее чем около 1000, 900, 800, 700 или 600 мкм.

[00174] В некоторых случаях подложка содержит множество каналов, соответствующих множеству локусов внутри кластера, где высота или глубина канала составляет 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50 или 10-50 мкм. В некоторых случаях высота канала составляет менее чем 100, 80, 60, 40 или 20 мкм.

[00175] В некоторых случаях диаметр канала, геометрического места (например, в по существу плоской подложке) или канала и геометрического места (например, в трехмерной подложке, где место соответствует каналу) составляет около 1-1000, 1-500, 1-200, 1-100, 5-100 или 10-100 мкм, например, около 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мкм. В некоторых случаях диаметр канала, локуса или и канала и локуса составляет менее чем около 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних каналов, локусов или каналов и локусов составляет около 1-500, 1-200, 1-100, 5-200, 5-100, 5-50 или 5-30, например, около 20 мкм.

[00176] Модификации поверхности

[00177] В настоящем документе предложены способы синтеза полинуклеотидов на поверхности, где поверхность включает различные модификации поверхности. В некоторых случаях модификации поверхности используются для химического и/или физического изменения поверхности с помощью аддитивного или субтрактивного процесса для изменения одного или нескольких химических и/или физических свойств поверхности подложки или выбранного участка или области поверхности подложки. Например, модификации поверхности включают, помимо прочего, (1) изменение смачивающих свойств поверхности, (2) функционализацию поверхности, то есть обеспечение, модификацию или замену поверхностных функциональных групп, (3) дефункционализацию поверхности, то есть удаление поверхностных функциональных групп, (4) иное изменение химического состава поверхности, например, путем травления, (5) увеличение или уменьшение шероховатости поверхности, (6) нанесение покрытия на поверхность, например покрытия, обладающего смачивающими свойствами, отличными от смачивающих свойств поверхности, и/или (7) осаждение частиц на поверхность.

[00178] В некоторых случаях добавление химического слоя поверх поверхности (называемого промотором адгезии) способствует формированию структурированного рисунка локусов на поверхности подложки. Примеры поверхностей для применения для улучшения адгезии включают, без ограничения, стекло, кремний, диоксид кремния и нитрид кремния. В некоторых случаях усилитель адгезии представляет собой химическое вещество с высокой поверхностной энергией. В некоторых случаях на поверхность подложки наносят второй химический слой. В некоторых случаях второй химический слой имеет низкую поверхностную энергию. В некоторых случаях поверхностная энергия химического слоя, нанесенного на поверхность, способствует локализации капель на поверхности. В зависимости от выбранного расположения паттерна близость локусов и/или площадь контакта с жидкостью в локусах могут изменяться.

[00179] В некоторых случаях подложка поверхность субстрата или разрешенные локусы, на которые наносятся нуклеиновые кислоты или другие фрагменты, например, для синтеза полинуклеотидов, являются гладкими или по существу плоскими (например, двумерными) или имеют неровности, такие как выпуклости или пониженные функции (например, трехмерные функции). В некоторых случаях поверхность подложки модифицируют одним или несколькими слоями различных соединений. Такие представляющие интерес модифицированные слои включают, без ограничения, неорганические и органические слои, такие как металлы, оксиды металлов, полимеры, небольшие органические молекулы и тому подобное.

[00180] В некоторых случаях разрешенные локусы субстрата функционализированы одним или несколькими фрагментами, которые увеличивают и/или уменьшают поверхностную энергию. В некоторых случаях группа является химически инертной. В некоторых случаях фрагмент сконфигурирован так, чтобы поддерживать желаемую химическую реакцию, например, один или несколько процессов в реакции синтеза полинуклеотидов. Поверхностная энергия или гидрофобность поверхности является

фактором, определяющим способность нуклеотида прикрепляться к поверхности. В некоторых случаях способ функционализации подложки включает: (а) получение подложки, имеющей поверхность, содержащую диоксид кремния; и (b) силанизирование поверхности с использованием подходящего силанизирующего агента, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области техники, например, органофункциональной молекулы алкоксисилана. Способы и функционализирующие агенты описаны в патенте США № 5474796, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

[00181] В некоторых случаях поверхность подложки функционализируется посредством контакта с дериватирующей композицией, которая содержит смесь силанов, в условиях реакции, эффективных для связывания силанов с поверхностью подложки, обычно через реактивные гидрофильные фрагменты, присутствующие на поверхности подложки. Силанизация обычно покрывает поверхность посредством самосборки органофункциональными молекулами алкоксисилана. Различные реагенты, функционализирующие силосан, могут быть дополнительно использованы, как известно в настоящее время в данной области техники, например, для снижения или увеличения поверхностной энергии. Органофункциональные алкоксисиланы классифицируются в соответствии с их органическими функциями.

[00182] Синтез полинуклеотидов

[00183] Способы синтеза полинуклеотидов по настоящему изобретению могут включать процессы, включающие химию фосфорамидитов. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает соединение основания с фосфорамидитом. Синтез полинуклеотидов может включать связывание основания путем осаждения фосфорамидита в условиях связывания, где одно и то же основание необязательно наносится фосфорамидитом более одного раза, то есть двойное связывание. Синтез полинуклеотидов может включать кэпирование непрореагировавших участков. В некоторых случаях кэпирование является необязательным. Синтез полинуклеотидов может также включать окисление или стадию окисления или стадии окисления. Синтез полинуклеотидов может включать деблокирование, детритилирование и сульфирование. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает либо окисление, либо сульфирование. В некоторых случаях между одной или каждой стадией реакции синтеза полинуклеотидов устройство промывают, например, тетразолом или ацетонитрилом. Временные рамки для любой одной стадии в способе синтеза фосфорамидита могут составлять менее примерно 2 мин, 1 мин, 50 сек, 40 сек, 30 сек, 20 сек и 10 сек.

[00184] Синтез полинуклеотидов с использованием фосфорамидитного метода может включать последующее добавление фосфорамидитного строительного блока (например, нуклеозидного фосфорамидита) к растущей полинуклеотидной цепи для образования фосфитно-триэфирной связи. Синтез фосфорамидитных полинуклеотидов идет в направлении от 3' к 5'. Синтез фосфорамидитных полинуклеотидов позволяет контролировать добавление одного нуклеотида к растущей цепи нуклеиновой кислоты за

цикл синтеза. В некоторых случаях каждый цикл синтеза включает стадию связывания. Фосфорамидитное связывание включает образование триэфирной связи фосфита между активированным нуклеозидом фосфорамидитом и нуклеозидом, связанным с субстратом, например, через линкер. В некоторых случаях нуклеозидфосфорамидит снабжают активируемым устройством. В некоторых случаях нуклеозидфосфорамидит вводят в устройство вместе с активатором. В некоторых случаях нуклеозидфосфорамидиты поставляются в устройство в виде 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100-кратного или более избытка относительно субстрат-связанных нуклеозидов. В некоторых случаях добавление нуклеозидфосфорамидита проводят в безводной среде, например, в безводном ацетонитриле. После добавления нуклеозидфосфорамидита устройство необязательно промывают. В некоторых случаях стадию связывания повторяют еще один или несколько раз, необязательно со стадией промывки между добавлениями нуклеозидфосфорамидита к субстрату. В некоторых случаях способ синтеза полинуклеотидов включает 1, 2, 3 или более последовательных стадий связывания. Перед связыванием во многих случаях нуклеозид, связанный с устройством, снимается с защиты путем удаления защитной группы, где защитная группа предотвращает полимеризацию. Обычной защитной группой является 4,4'-диметокситритил (DMT).

[00185] После связывания способы синтеза фосфорамидитных полинуклеотидов необязательно включают стадию кэпирования. На стадии кэпирования растущий полинуклеотид обрабатывается кэпирующим агентом. Стадия кэпирования может быть использована для блокирования непрореагировавших связанных с субстратом 5'-ОН групп после связывания от дальнейшего удлинения цепи, предотвращая образование полинуклеотидов с внутренними делециями оснований. Кроме того, фосфорамидиты, активированные 1Н-тетразолом, могут в небольшой степени реагировать с положением Об гуанозина. Не ограничиваясь теорией, при окислении I₂/водой этот побочный продукт, возможно, за счет миграции Об-N7, может подвергаться депуринизации. Депуриновые сайты могут в конечном итоге расщепляться в ходе окончательного снятия защиты с полинуклеотида, что снижает выход полноразмерного продукта. Модификации Об могут быть удалены обработкой блокирующим реагентом перед окислением смесью I₂/вода. В некоторых случаях включение стадии кэпирования во время синтеза полинуклеотидов снижает частоту ошибок по сравнению с синтезом без кэпирования. Например, стадия кэпирования включает обработку полинуклеотида, связанного с субстратом, смесью уксусного ангидрида и 1-метилимидазола. После стадии укупорки устройство необязательно промывают.

[00186] В некоторых случаях после добавления нуклеозидного фосфорамидита и, необязательно, после кэпирования и одной или нескольких стадий промывки связанная с устройством растущая нуклеиновая кислота окисляется. Стадия окисления включает окисление триэфира фосфита в тетраординированный триэфир фосфата, защищенный предшественник природной межнуклеозидной связи диэфира фосфата. В некоторых

случаях окисление растущего полинуклеотида достигается обработкой йодом и водой, необязательно в присутствии слабого основания (например, пиридина, лутидина, коллидина). Окисление можно проводить в безводных условиях с использованием, например, трет-бутилгидропероксида или (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил)-оксазиридина (CSO). В некоторых способах после окисления проводят стадию кэппинга. Вторая стадия кэппинга позволяет высушить устройство, так как остаточная вода от окисления, которая может сохраняться, может препятствовать последующему соединению. После окисления устройство и растущий полинуклеотид необязательно промывают. В некоторых случаях стадию окисления заменяют стадией сульфуризации для получения фосфоротиоатов полинуклеотидов, при этом любые стадии кэпирования можно проводить после сульфуризации. Многие реагенты способны к эффективному переносу серы, включая, помимо прочего, 3-(диметиламинометилен)амино)-3H-1,2,4-дитиазол-3-тион, DDTT, 3H-1,2-бензодитиол-3-он, 1,1-диоксид, также известный как реагент Бокажа, и N, N, N' N'-тетраэтилтиурамдисульфид (TETD).

[00187] Для того чтобы последующий цикл включения нуклеозида происходил посредством связывания, защищенный 5'-конец растущего полинуклеотида, связанного с устройством, удаляется, так что первичная гидроксильная группа вступает в реакцию со следующим нуклеозидным фосфорамидитом. В некоторых случаях защитной группой является DMT, и деблокирование происходит с помощью трихлоруксусной кислоты в дихлорметане. Проведение детритилирования в течение длительного времени или более сильными, чем рекомендовано, растворами кислот может привести к усилению депуринизации полинуклеотида, связанного с твердой подложкой, и, таким образом, снизить выход желаемого полноразмерного продукта. Способы и композиции по изобретению, описанные в настоящем документе, обеспечивают контролируемые условия деблокирования, ограничивающие нежелательные реакции депурирования. В некоторых случаях полинуклеотид, связанный с устройством, промывают после деблокирования. В некоторых случаях эффективная промывка после деблокирования способствует получению синтезированных полинуклеотидов с низкой частотой ошибок.

[00188] Способы синтеза полинуклеотидов обычно включают повторяющуюся последовательность следующих стадий: нанесение защищенного мономера на активно функционализированную поверхность (например, локус) для связывания либо с активированной поверхностью, либо с линкером, либо с предварительно снятым с защиты мономером; снятие защиты с нанесенного мономера, чтобы он стал реакционноспособным с нанесенным впоследствии защищенным мономером; и применение другого защищенного мономера для связывания. Одна или несколько промежуточных стадий включают окисление или сульфирование. В некоторых случаях один или несколько стадий промывки предшествуют или следуют за одной или всеми стадиями.

[00189] Способы синтеза полинуклеотидов на основе фосфорамидитов включают ряд химических стадий. В некоторых случаях одна или несколько стадий способа синтеза включают циклирование реагентов, где одна или несколько стадий способа включают

нанесение на устройство реагента, подходящего для данной стадии. Например, реагенты циклически проходят серию стадий жидкого осаждения и вакуумной сушки. Для подложек, содержащих трехмерные элементы, такие как лунки, микролунки, каналы и т.п., реагенты необязательно пропускают через одну или несколько областей устройства через лунки и/или каналы.

[00190] Способы и системы, описанные в настоящем документе, относятся к устройствам синтеза полинуклеотидов для синтеза полинуклеотидов. Синтез может быть параллельным. Например, синтезируется по меньшей мере или около по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 1000, 10000, 50000, 75000, 100000 или более полинуклеотиды могут быть синтезированы параллельно. Общее количество полинуклеотидов, которые могут быть синтезированы параллельно, может составлять 2-100000, 3-50000, 4-10000, 5-1000, 6-900, 7-850, 8-800, 9-750, 10-700, 11-650, 12-600, 13-550, 14-500, 15-450, 16-400, 17-350, 18-300, 19-250, 20-200, 21-150, 22-100, 23-50, 24-45, 25-40, 30-35. Специалистам в данной области техники понятно, что общее количество полинуклеотидов, синтезированных параллельно, может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например, 25-100. Общее количество полинуклеотидов, синтезированных параллельно, может находиться в пределах любого диапазона, определяемого любым из значений, служащих конечными точками диапазона. Общая молярная масса полинуклеотидов, синтезированных в устройстве, или молярная масса каждого из полинуклеотидов может составлять по меньшей мере или по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 25000, 50000, 75000, 100000 пикомолей и более. Длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов внутри устройства может составлять по меньшей мере или около по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 нуклеотидов или более. Длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов в устройстве может составлять самое большее или примерно самое большее 500, 400, 300, 200, 150, 100, 50, 45, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 нуклеотидов или меньше. Длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов внутри устройства может составлять 10-500, 9-400, 11-300, 12-200, 13-150, 14-100, 15-50, 16-45, 17-40, 18-35, 19-25. Специалистам в данной области техники понятно, что длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов в устройстве может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например 100-300. Длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов внутри устройства может находиться в пределах любого диапазона, определяемого любым из значений, служащих конечными точками диапазона.

[00191] Способы синтеза полинуклеотидов на поверхности, предусмотренные в настоящем документе, обеспечивают возможность синтеза с высокой скоростью. Например, синтезируется по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175,

200 нуклеотидов в час или более. Нуклеотиды включают аденин, гуанин, тимин, цитозин, уридиновые строительные блоки или их аналоги/модифицированные версии. В некоторых случаях библиотеки полинуклеотидов синтезируют параллельно на подложке. Например, устройство, содержащее около или по меньшей мере около 100, 1000, 10000, 30000, 75000, 100000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000 или 5000000 разрешенных локусов способны поддерживать синтез по меньшей мере такого же количества различных полинуклеотидов, где полинуклеотид, кодирующий отдельную последовательность, синтезируется в разрешенном локусе. В некоторых случаях библиотека полинуклеотидов синтезируется на устройстве с низким уровнем ошибок, описанном в настоящем документе, менее чем за три месяца, два месяца, один месяц, три недели, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 дня, 24 часа или меньше. В некоторых случаях более крупные нуклеиновые кислоты, собранные из полинуклеотидной библиотеки, синтезированной с низкой частотой ошибок с использованием субстратов и способов, описанных в настоящем документе, получают менее чем за три месяца, два месяца, один месяц, три недели, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 дня, 24 часа или меньше.

[00192] В некоторых случаях способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают создание библиотеки нуклеиновых кислот, включающей варианты нуклеиновых кислот, отличающиеся множеством сайтов кодонов. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может иметь 1 сайт, 2 сайта, 3 сайта, 4 сайта, 5 сайтов, 6 сайтов, 7 сайтов, 8 сайтов, 9 сайтов, 10 сайтов, 11 сайтов, 12 сайта, 13 сайтов, 14 сайтов, 15 сайтов, 16 сайтов, 17 сайтов, 18 сайтов, 19 сайтов, 20 сайтов, 30 сайтов, 40 сайтов, 50 сайтов или более сайтов с вариантными кодонами.

[00193] В некоторых случаях один или несколько сайтов вариантов кодонов могут быть соседними. В некоторых случаях один или несколько сайтов вариантных кодонов могут быть не смежными и разделены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более кодонами.

[00194] В некоторых случаях нуклеиновая кислота может содержать несколько сайтов вариантных кодонов, где все варианты кодонов расположены рядом друг с другом, образуя участок вариантных кодонов. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может содержать несколько сайтов вариантных кодонов, при этом ни один из вариантов кодонов не является смежным друг с другом. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может содержать несколько сайтов вариантных кодонов, причем некоторые сайты вариантных кодонов примыкают друг к другу, образуя отрезок сайтов вариантных кодонов, а некоторые сайты вариантных кодонов не являются смежными друг с другом.

[00195] Обращаясь к фигурам, на **ФИГ. 2** проиллюстрирован типичный технологический процесс синтеза нуклеиновых кислот (например, генов) из более коротких нуклеиновых кислот. Рабочий процесс обычно делится на фазы: (1) синтез de novo библиотеки одноцепочечных нуклеиновых кислот, (2) объединение нуклеиновых кислот для образования более крупных фрагментов, (3) исправление ошибок, (4) контроль качества и (5) отправка. Перед синтезом de novo предварительно выбирают предполагаемую

последовательность нуклеиновой кислоты или группу последовательностей нуклеиновой кислоты. Например, группа генов предварительно выбрана для генерации.

[00196] После того, как выбраны большие нуклеиновые кислоты для генерации, предварительно определенная библиотека нуклеиновых кислот разрабатывается для синтеза *de novo*. Известны различные подходящие способы создания массивов полинуклеотидов высокой плотности. В примере рабочего процесса предоставляется поверхностный слой устройства. В примере химический состав поверхности изменен для улучшения процесса синтеза полинуклеотидов. Области с низкой поверхностной энергией генерируются для отталкивания жидкости, а области с высокой поверхностной энергией генерируются для притяжения жидкостей. Сама поверхность может иметь форму плоской поверхности или иметь вариации формы, такие как выступы или микроуглубления, которые увеличивают площадь поверхности. В примере рабочего процесса выбранные молекулы с высокой поверхностной энергией выполняют двойную функцию поддержки химии DNA, как описано в публикации международной патентной заявки WO/2015/021080, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[00197] Приготовление полинуклеотидных матриц *in situ* создают на твердой подложке и используют процесс удлинения одного нуклеотида для параллельного удлинения нескольких олигомеров. Устройство для нанесения, такое как устройство для нанесения материала **201**, предназначено для высвобождения реагентов ступенчатым образом, так что несколько полинуклеотидов параллельно удлиняются по одному остатку за раз для создания олигомеров с заданной последовательностью нуклеиновой кислоты **202**. В некоторых на этой стадии полинуклеотиды отщепляются от поверхности. Расщепление включает расщепление газа, например, аммиаком или метиламином.

[00198] Созданные библиотеки полинуклеотидов помещают в реакционную камеру. В этом примерном рабочем процессе реакционная камера (также называемая «нанореактор») представляет собой покрытую силиконом лунку, содержащую PCR-реагенты и опускаемую на библиотеку полинуклеотидов **203**. До или после герметизации **204** полинуклеотидов добавляют реагент для высвобождения полинуклеотидов с подложки. В примере рабочего процесса полинуклеотиды высвобождаются после герметизации нанореактора **205**. После высвобождения фрагменты одноцепочечных полинуклеотидов гибридизуются, чтобы охватить всю длинную последовательность DNA. Возможна частичная гибридизация **205**, поскольку каждый синтезированный полинуклеотид имеет небольшую часть, перекрывающуюся по меньшей мере с одним другим полинуклеотидом в пуле.

[00199] После гибридизации начинают реакцию PCA. Во время полимеразных циклов полинуклеотиды отжигаются до комплементарных фрагментов, а пробелы заполняются полимеразой. Каждый цикл случайным образом увеличивает длину различных фрагментов в зависимости от того, какие полинуклеотиды находят друг друга. Комплементарность фрагментов позволяет сформировать полный большой участок двухцепочечно DNA **206**.

[00200] После завершения ПСА нанореактор отделяют от устройства **207** и располагают для взаимодействия с устройством, имеющим праймеры для PCR **208**. После герметизации нанореактор подвергают PCR **209** и амплифицируют более крупные нуклеиновые кислоты. После PCR **210** нанокамера открывается **211**, добавляются реагенты для исправления ошибок **212**, камера герметизируется **213** и происходит реакция исправления ошибок для удаления несоответствующих пар оснований и/или цепей с плохой комплементарностью из продуктов амплификации двухцепочечной PCR **214**. Нанореактор открывается и отделяется **215**. Продукт с исправленной ошибкой затем подвергается дополнительным этапам обработки, таким как PCR и молекулярное штрих-кодирование, а затем упаковывается **222** для отправки **223**.

[00201] В некоторых случаях принимаются меры контроля качества. После исправления ошибок стадии контроля качества включают, например, взаимодействие с пластиной, содержащей секвенирующие праймеры для амплификации продукта **216** с исправлением ошибок, запечатывание пластины в камере, содержащей продукт амплификации с исправлением ошибок **217**, и проведение дополнительного раунда амплификации **218**. Нанореактор открывается **219**, и продукты объединяются **220** и секвенируются **221**. После принятия решения о приемлемом контроле качества упакованный продукт **222** утверждается для отправки **223**.

[00202] В некоторых случаях нуклеиновая кислота создается с помощью рабочего процесса, такого как показанный на **ФИГ. 2**, подвергается мутагенезу с использованием перекрывающихся праймеров, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях библиотеку праймеров создают путем подготовки *in situ* на твердой подложке и используют процесс удлинения одного нуклеотида для параллельного удлинения нескольких олигомеров. Устройство для нанесения, такое как устройство для нанесения материала, предназначено для высвобождения реагентов ступенчатым образом, так что несколько полинуклеотидов параллельно удлиняются по одному остатку за раз для создания олигомеров с заданной последовательностью нуклеиновой кислоты **202**.

[00203] Компьютерные системы

[00204] Любая из описанных в настоящем документе систем может быть функционально связана с компьютером и может быть автоматизирована через компьютер либо локально, либо удаленно. В различных случаях способы и системы по изобретению могут дополнительно включать программное обеспечение в компьютерных системах и их использование. Соответственно, компьютеризированное управление синхронизацией функций дозирования/вакуумирования/пополнения, такое как организация и синхронизация движения устройства для нанесения материала, действие дозирования и приведение в действие вакуума, находится в рамках изобретения. Компьютерные системы могут быть запрограммированы на интерфейс между заданной пользователем базовой последовательностью и положением устройства для нанесения материала, чтобы доставлять правильные реагенты в определенные области подложки.

[00205] Компьютерную систему **300**, показанную на **ФИГ. 3**, можно понимать как логическое устройство, которое может считывать инструкции с носителя **311** и/или сетевого порта **305**, который может быть дополнительно подключен к серверу **309**, имеющему фиксированный носитель **312**. Система, такая как показанная на **ФИГ. 3**, может включать в себя CPU **301**, дисковые накопители **303**, дополнительные устройства ввода, такие как клавиатура **315** и/или мышь **316**, и дополнительный монитор **307**. Передача данных может осуществляться через указанный коммуникационный носитель на сервер в локальном или удаленном месте. Среда связи может включать в себя любые средства передачи и/или приема данных. Например, средством связи может быть сетевое соединение, беспроводное соединение или интернет-соединение. Такое соединение может обеспечивать связь через World Wide Web. Предполагается, что данные, относящиеся к настоящему раскрытию, могут передаваться по таким сетям или соединениям для приема и/или просмотра стороной **322**, как показано на **ФИГ. 3**.

[00206] На **ФИГ. 4** представлена блок-схема, иллюстрирующая первый пример архитектуры компьютерной системы **400**, которую можно использовать в связи с примерными экземплярами настоящего раскрытия. Как показано на **ФИГ. 4**, примерная компьютерная система может включать в себя процессор **402** для обработки инструкций. Неограничивающие примеры процессоров включают: процессор Intel Xeon™, процессор AMD Opteron™, 32-разрядный процессор Samsung RISC ARM 1176JZ(F)-S v1.0™, процессор ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100™, процессор ARM Cortex-A8 Apple A4™, процессор Marvell PXA 930™ или функционально эквивалентный процессор. Для параллельной обработки можно использовать несколько потоков выполнения. В некоторых случаях также могут использоваться несколько процессоров или процессоров с несколькими ядрами, будь то в одной компьютерной системе, в кластере или распределены между системами по сети, включающей множество компьютеров, сотовых телефонов и/или персональных устройств обработки данных.

[00207] Как показано на **ФИГ. 4**, высокоскоростной кэш **404** может быть подключен к процессору **402** или встроен в него для обеспечения высокоскоростной памяти для инструкций или данных, которые недавно или часто использовались процессором **402**. Процессор **402** подключен к северному мосту **406** с помощью шины **408** процессора. Северный мост **406** соединен с оперативным запоминающим устройством (RAM) **410** с помощью шины **412** памяти и управляет доступом к RAM **410** процессором **402**. Северный мост **406** также соединен с южным мостом **414** шиной **416** набора микросхем. Южный мост **414**, в свою очередь, соединен с периферийной шиной **418**. Периферийной шиной может быть, например, PCI, PCI-X, PCI Express или другая периферийная шина. Северный мост и южный мост часто называют набором микросхем процессора и управляют передачей данных между процессором, оперативной памятью и периферийными компонентами по периферийной шине **418**. В некоторых альтернативных архитектурах функции северного моста могут быть встроены в процессор, вместо использования отдельного чипа северного моста. В некоторых случаях система **400** может включать в себя плату **422** ускорителя,

подключенную к периферийной шине **418**. Ускоритель может включать в себя программируемые пользователем вентильные матрицы (FPGA) или другое аппаратное обеспечение для ускорения определенной обработки. Например, для адаптивной реструктуризации данных или для вычисления алгебраических выражений, используемых при обработке расширенного множества может быть использован ускоритель.

[00208] Программное обеспечение и данные хранятся во внешнем хранилище **424** и могут загружаться в RAM **410** и/или кэш-память **404** для использования процессором. Система **400** включает операционную систему для управления системными ресурсами; не ограничивающие примеры операционных систем включают: Linux, Windows™, MACOS™, BlackBerry OSTM, iOS™ и другие функционально эквивалентные операционные системы, а также прикладное программное обеспечение, работающее поверх операционной системы, для управления хранением данных и оптимизацией в соответствии с примером настоящего раскрытия. В этом примере система **400** также включает в себя сетевые интерфейсные карты (NIC) **420** и **421**, подключенные к периферийной шине для обеспечения сетевых интерфейсов для внешнего хранилища, такого как сетевое хранилище (NAS) и другие компьютерные системы, которые можно использовать для распределенной параллельной обработки.

[00209] На **ФИГ. 5** представлена схема, показывающая сеть **500** с множеством компьютерных систем **502a** и **502b**, рядом сотовых телефонов и помощников по работе с персональными данными **502c** и сетевым хранилищем (NAS) **504a** и **504b**. В примерах системы **502a**, **502b** и **502c** могут управлять хранилищем данных и оптимизировать доступ к данным, хранящимся в сетевых хранилищах (NAS) **504a** и **504b**. Для данных может использоваться и оцениваться математическая модель с использованием распределенной параллельной обработки в компьютерных системах **502a** и **502b**, сотовых телефонах и системах **502c** обработки персональных данных. Компьютерные системы **502a** и **502b**, а также системы **502c** для сотовых телефонов и персональных данных могут также обеспечивать параллельную обработку для адаптивной реструктуризации данных, хранящихся в сетевых хранилищах (NAS) **504a** и **504b**. На **ФИГ. 5** иллюстрируется только пример, и большое количество других компьютерных архитектур и систем может быть использовано в сочетании с различными примерами по настоящему изобретению. Например, для обеспечения параллельной обработки можно использовать блейд-сервер. Блейд-процессоры могут быть соединены через заднюю панель для обеспечения параллельной обработки. Хранилище также можно подключить к задней панели или в качестве сетевого хранилища (NAS) через отдельный сетевой интерфейс. В некоторых примерах процессоры могут поддерживать отдельные области памяти и передавать данные через сетевые интерфейсы, объединительную панель или другие разъемы для параллельной обработки другими процессорами. В других случаях некоторые или все процессоры могут использовать общее пространство виртуальной адресной памяти.

[00210] На **ФИГ. 6** представлена блок-схема многопроцессорной компьютерной системы, использующей совместно используемое пространство виртуальной адресной

памяти в соответствии с примерным экземпляром. Система включает в себя множество процессоров **602a-f**, которые могут осуществлять доступ к подсистеме **604** совместно используемой памяти. Система включает множество программируемых аппаратных процессоров алгоритмов памяти (МАР) **606a-f** в подсистеме **604** памяти. Каждая МАР **606a-f** может содержать память **608a-f** и одну или более программируемых пользователем вентильных матриц (FPGA) **610a-f**. МАР обеспечивает конфигурируемый функциональный блок, и конкретные алгоритмы или части алгоритмов могут быть предоставлены FPGA **610a-f** для обработки в тесной координации с соответствующим процессором. Например, МАР можно использовать для оценки алгебраических выражений, касающихся модели данных, и для выполнения адаптивной реструктуризации данных в примерах. В этом примере каждая карта МАР глобально доступна для всех процессоров для этих целей. В одной конфигурации каждая МАР может использовать прямой доступ к памяти (DMA) для доступа к ассоциированной памяти **608a-f**, позволяя ей выполнять задачи независимо и асинхронно от соответствующего микропроцессора **602a-f**. В этой конфигурации МАР может передавать результаты непосредственно на другую МАР для конвейерной обработки и параллельного выполнения алгоритмов.

[00211] Вышеупомянутые компьютерные архитектуры и системы являются только примерами, и широкий спектр других архитектур и систем компьютеров, сотовых телефонов и персональных данных может использоваться в связи с примерами, включая системы, использующие любую комбинацию общих процессоров, сопроцессоров, FPGA и другие программируемые логические устройства, системы на кристаллах (SOC), специализированные интегральные схемы (ASIC) и другие элементы обработки и логики. В некоторых случаях вся или часть компьютерной системы может быть реализована в программном или аппаратном обеспечении. Любое разнообразие носителей данных может использоваться в связи с примерами экземпляров, включая оперативную память, жесткие диски, флэш-память, ленточные накопители, дисковые массивы, сетевые хранилища (NAS) и другие локальные или распределенные устройства и системы хранения данных.

[00212] В примерах компьютерная система может быть реализована с использованием программных модулей, исполняемых на любой из вышеперечисленных или других компьютерных архитектур и систем. В других случаях функции системы могут быть частично или полностью реализованы в программно-аппаратных средствах, программируемых логических устройствах, таких как программируемые вентильные матрицы (FPGA), как указано в **ФИГ. 4**, системы на микросхемах (SOC), специализированные интегральные схемы (ASIC) или другие элементы обработки и логики. Например, установка процессора и оптимизатора может быть реализована с аппаратным ускорением за счет использования карты аппаратного ускорителя, такой как карта **422** ускорителя, показанная на **ФИГ. 4**.

[00213] Следующие примеры приведены для более ясной иллюстрации принципа и практического применения описанных в настоящем документе вариантов осуществления изобретения для специалистов в данной области техники и не должны рассматриваться как

ограничивающие объем каких-либо заявленных вариантов осуществления. Если не указано иное, все части и проценты даны по массе.

ПРИМЕРЫ

[00214] Следующие примеры даны с целью иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения и никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Настоящие примеры, наряду с описанными здесь способами, в настоящее время представляют предпочтительные варианты осуществления изобретения, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения. Изменения в нем и другие варианты использования, которые охватываются духом изобретения, как определено объемом формулы изобретения, очевидны специалистам в данной области техники.

[00215] Пример 1: Функционализация поверхности устройства

[00216] Устройство было функционализировано для поддержки присоединения и синтеза библиотеки полинуклеотидов. Поверхность устройства сначала в течение 20 минут подвергали влажной очистке раствором пираньи, состоящим из 90% H_2SO_4 и 10% H_2O_2 . Устройство промывали в нескольких стаканах с деионизированной водой, выдерживали под краном с деионизированной водой в течение 5 мин и сушили в токе N_2 . Затем устройство замачивали в NH_4OH (1:100; 3 мл:300 мл) в течение 5 минут, промывали деионизированной водой с помощью пистолета, замачивали последовательно подряд в трех стаканах с деионизированной водой на 1 мин в каждом, а затем снова промывали деионизированной водой с помощью пистолета. Затем устройство подвергали плазменной очистке, подвергая поверхность устройства воздействию O_2 . Прибор SAMCO PC-300 использовали для плазменного травления O_2 при мощности 250 Вт в течение 1 мин в нисходящем режиме.

[00217] Очищенную поверхность устройства активно функционализировали раствором, содержащим N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксипибутирамид, с использованием системы печи для осаждения паров YES-1224P со следующими параметрами: от 0,5 до 1 торр, 60 мин, 70°C, испаритель 135 °C. На поверхность устройства наносили резистивное покрытие с использованием установки для центрифугирования Brewer Science 200X. Фоторезист SPR™ 3612 наносили на устройство центрифугированием при 2500 об/мин в течение 40 секунд. Устройство предварительно обжигали на горячей пластине Brewer в течение 30 мин при температуре 90°C. Устройство подвергали фотолитографии с использованием прибора для выравнивания маски Karl Suss MA6. Устройство экспонировали в течение 2,2 сек и проявляли в течение 1 мин в MSF 26A. Остатки проявителя смывали ручным пистолетом, и устройство замачивали в воде на 5 мин. Устройство выжаривали в печи в течение 30 мин при температуре 100°C с последующим визуальным осмотром дефектов литографии с помощью Nikon L200. Для удаления остаточного резиста с помощью инструмента SAMCO PC-300 использовали процесс удаления остатка с помощью плазменного травления кислородом при мощности 250 Вт в течение 1 мин.

[00218] Поверхность устройства пассивно функционализировали 100 мкл раствора перфтороктилтрихлорсилана, смешанного с 10 мкл легкого минерального масла. Устройство помещали в камеру, откачивали в течение 10 мин, затем закрывали клапан на насосе и оставляли на 10 мин. Камеру проветривали. С устройства снимали резистивное покрытие, выполнив два погружения в течение 5 минут в 500 мл NMP при температуре 70°C с обработкой ультразвуком при максимальной мощности (9 на системе Crest). Затем устройство вымачивали в течение 5 минут в 500 мл изопропанола при комнатной температуре с обработкой ультразвуком при максимальной мощности. Устройство погружали в 300 мл этанола 200 п.руф и сушили с помощью N₂. Функционализированную поверхность активировали, чтобы она служила подложкой для синтеза полинуклеотидов.

[00219] Пример 2: Синтез 50-мерной последовательности на устройстве для синтеза олигонуклеотидов

[00220] Устройство для синтеза двумерных олигонуклеотидов находилось в собранном состоянии в проточной ячейке, которая была соединена с проточной ячейкой (Applied Biosystems (ABI394 DNA Synthesizer)). Устройство для двумерного синтеза олигонуклеотидов однородно функционализировали с помощью N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксибутирамида (Gelest) и применяли для синтеза типового полинуклеотида из 50 п.о. («50-мерный полинуклеотид») с использованием способов синтеза полинуклеотидов, описанных в настоящем документе.

[00221] Последовательность 50-мера была такой, как описано. 5'AGACAATCAACCATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTCGGCAT###TTTTT TTTTT3', где # обозначает фосфорамидит CED тимидин-сукцинилгексамида (CLP-2244 от компании ChemGenes), который представляет собой расщепляемый линкер, позволяющий высвободить олигонуклеотиды с поверхности в процессе удаления защитных групп.

[00222] Синтез осуществляли с использованием стандартной химии синтеза ДНК (связывание, экирование, окисление и деблокирование) в соответствии с протоколом, приведенным в **таблице 2**, и с участием синтезатора ABI.

Таблица 2: Протоколы синтеза

Общее название процесса синтеза DNA	Стадия процесса	Время (сек)
ПРОМЫВКА (поток промывки ацетонитрилом)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную ячейку	23
	Промывка системы N ₂	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
ДОБАВЛЕНИЕ ОСНОВАНИЯ DNA (фосфорамидит+поток активатора)	Промывка коллектора активатора	2
	Активатор в проточную ячейку	6
	Активатор+фосфорамидит в проточную ячейку	6
	Активатор в проточную ячейку	0,5
	Активатор+фосфорамидит в проточную ячейку	5

	Активатор в проточную ячейку	0,5
	Активатор+фосфорамидит в проточную ячейку	5
	Активатор в проточную ячейку	0,5
	Активатор+фосфорамидит в проточную ячейку	5
	Инкубировать в течение 25 секунд	25
ПРОМЫВКА (поток промывки ацетонитрилом)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную ячейку	15
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
ДОБАВЛЕНИЕ ОСНОВАНИЯ DNA (фосфорамидит+поток активатора)	Промывка коллектора активатора	2
	Активатор в проточную ячейку	5
	Активатор+фосфорамидит в проточную ячейку	18
	Инкубирование в течение 25 секунд	25
ПРОМЫВКА (поток промывки ацетонитрилом)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную ячейку	15
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
КЭППИНГ (CapA+B, 1:1, Flow)	CapA+B в проточную ячейку	15
ПРОМЫВКА (поток промывки ацетонитрилом)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную ячейку	15
	Промывка системы ацетонитрилом	4
ОКИСЛЕНИЕ (поток окислителя)	Окислитель в проточную ячейку	18
ПРОМЫВКА (поток промывки ацетонитрилом)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную ячейку	15
	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную ячейку	15
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную ячейку	23
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
ДЕБЛОКИРОВКА (деблокировка потока)	Деблокировка в проточную ячейку	36
ПРОМЫВКА (поток промывки ацетонитрилом)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную ячейку	18
	Промывка системы N2	4,13

Промывка системы ацетонитрилом	4,13
Ацетонитрил в проточную ячейку	15

[00223] Комбинация фосфорамидит/активатор доставлялась аналогично доставке нерасфасованных реагентов через проточную ячейку. Стадии сушки не выполнялись, поскольку среда все время остается «влажной» от реагента.

[00224] Ограничитель потока был удален из синтезатора ABI 394, чтобы обеспечить более быстрый поток. Без ограничителя потока скорость потока для амидитов (0,1M в ACN), активатора (0,25 M бензоилтиотетразола («ВТТ»; 30-3070-xx от GlenResearch) в ACN) и Ох (0,02 M I2 в 20% пиридине, 10% воды и 70% ТГФ) составляли около ~100 мкл/сек для ацетонитрила («ACN») и реагентов для уплотнения (смесь CapA и CapB 1:1, где CapA представляет собой уксусный ангидрид в смеси ТГФ/пиридин, и CapB представляет собой 16% 1-метилимидизола в ТГФ), около ~200 мкл/сек, а для деблокировки (3% дихлоруксусной кислоты в толуоле) около ~300 мкл/сек (по сравнению с ~50 мкл/сек для всех реагентов с ограничителем потока). Наблюдали за временем полного вытеснения окислителя, соответствующим образом корректировали время подачи химических соединений и вводили дополнительную промывку ACN между применением различных химических соединений. После синтеза полинуклеотида с чипа снимали защиту в газообразном аммиаке в течение ночи при давлении 75 фунтов на квадратный дюйм. На поверхность наносили пять капель воды для восстановления полинуклеотидов. Затем восстановленные полинуклеотиды анализировали на малые РНК на чипе BioAnalyzer.

[00225] Пример 3: Синтез 100-мерной последовательности на устройстве для синтеза олигонуклеотидов

[00226] Тот же процесс, что описан в примере 2 для синтеза 50-мерной последовательности, использовали для синтеза 100-мерного полинуклеотида («100-мерный полинуклеотид»);

CGGGATCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTCA TGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGAGAACCCCGCAT##TTTTTTTTTTT3', где # обозначает фосфорамидит CED тимидин-сукцинилгексамида (CLP-2244 от компании ChemGenes) на двух разных кремниевых чипах, первый из которых однородно функционализирован с помощью N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксибутирамида, а второй функционализирован смесью 5/95 11-ацетоксиундецилтриэтоксисилан и н-децилтриэтоксисилан, и выделенные с поверхности полинуклеотиды анализировали на приборе BioAnalyzer.

[00227] Все десять образцов из двух чипов дополнительно амплифицировали методом PCR с использованием прямого (5'ATGCGGGTTCTCATCATC3') и обратного (5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3') праймеров в 50 мкл PCR-смеси (25 мкл мастер-микса NEB Q5, 2,5 мкл 10 мкМ прямого праймера, 2,5 мкл 10 мкМ обратного праймера, 1 мкл полинуклеотида, экстрагированного с поверхности, и воды до 50 мкл), используя следующую программу термоциклирования:

98яяС, 30 сек

98яаяС, 10 сек; 63яаяС, 10 сек; 72яаяС, 10 сек; повтор 12 циклов

72яаяС, 2 мин

[00228] Продукты PCR также анализировали на BioAnalyzer, демонстрируя острые пики в 100-мерном положении. Затем образцы, амплифицированные с помощью PCR, клонировали и секвенировали по Сэнгеру. В **таблице 3** обобщены результаты секвенирования по Сэнгеру для образцов, взятых из пятен 1-5 с чипа 1, и для образцов, взятых из пятен 6-10 с чипа 2.

Таблица 3: Результаты секвенирования

Место	Частота ошибок	Эффективность цикла
1	1/763 п.о.	99,87%
2	1/824 п.о.	99,88%
3	1/780 п.о.	99,87%
4	1/429 п.о.	99,77%
5	1/1525 п.о.	99,93%
6	1/1615 п.о.	99,94%
7	1/531 п.о.	99,81%
8	1/1769 п.о.	99,94%
9	1/854 п.о.	99,88%
10	1/1451 п.о.	99,93%

[00229] Таким образом, высокое качество и однородность синтезированных полинуклеотидов были повторены на двух чипах с разным химическим составом поверхности. В целом, 89% 100-меров, которые были секвенированы, были идеальными последовательностями без ошибок, что соответствует 233 из 262.

[00230] В **таблице 4** приведены характеристики ошибок для последовательностей, полученных из образцов полинуклеотидов из точек 1-10.

Таблица 4: Характеристики ошибок

Образец ID/№ места	OSA_0046/1	OSA_0047/2	OSA_0048/3	OSA_0049/4	OSA_0050/5	OSA_0051/6	OSA_0052/7	OSA_0053/8	OSA_0054/9	OSA_0055/10
Всего последовательностей	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
Качество секвенирования	25 из 28	27 из 27	26 из 30	21 из 23	25 из 26	29 из 30	27 из 31	29 из 31	28 из 29	25 из 28
Качество олигонуклеотида	23 из 25	25 из 27	22 из 26	18 из 21	24 из 25	25 из 29	22 из 27	28 из 29	26 из 28	20 из 25
ROI количество совпадений	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
ROI мутация	2	2	1	3	1	0	2	1	2	1
ROI удаление нескольких оснований	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI малая вставка	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI удаление одного основания	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Количество больших удалений	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
Мутация: G>A	2	2	1	2	1	0	2	1	2	1
Мутация: T>C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ROI число ошибок	3	2	2	3	1	1	3	1	2	1

ROI частота ошибок	Ошибка: ~1 в 834	Ошибка: ~1 в 1350	Ошибка: ~1 в 1282	Ошибка: ~1 в 708	Ошибка: ~1 в 2500	Ошибка: ~1 в 2667	Ошибка: ~1 в 876	Ошибка: ~1 в 2900	Ошибка: ~1 в 1400	Ошибка: ~1 в 2349
ROI минус частота ошибок праймера	Минус ошибка праймера: ~1 в 763	Минус ошибка праймера: ~1 в 824	Минус ошибка праймера: ~1 в 780	Минус ошибка праймера: ~1 в 429	Минус ошибка праймера: ~1 в 1525	Минус ошибка праймера: ~1 в 1615	Минус ошибка праймера: ~1 в 531	Минус ошибка праймера: ~1 в 1769	Минус ошибка праймера: ~1 в 854	Минус ошибка праймера: ~1 в 1451

[00231] Пример 4: Пэннинг и скрининг для идентификации антител к SARS-CoV-2 и ACE2

[00232] В этом примере описывается идентификация антител к SARS-CoV-2 и ACE2.

[00233] Библиотеки scFv, VHH и Fab с фаговым дисплеем подвергали пэннингу на предмет связывания с биотинилированным SARS-CoV-2 S1 и человеческим ACE2. На **ФИГ. 7** показана схема of стратегии пэннинга. Биотинилированный антиген связывали с магнитными шариками, покрытыми стрептавидином, с плотностью 100 пмоль антигена на мг шариков (Thermo Fisher #11206D). Фаговые библиотеки блокировали 5% BSA в PBS. После истощения магнитных шариков в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ) шарики удаляли, а супернатант фага переносили на 1 мг шариков, связанных с антигеном, в 1 мл PBS и инкубировали при комнатной температуре с вращением в течение 1 часа. Несвязывающиеся клоны смывали добавлением 1 мл PBST, увеличивая количество промывок с каждым раундом пэннинга. Трипсин использовали для элюирования фага, связанного с комплексом антиген-гранулы, использовали трипсин. Фаг амплифицировали в TG1 *E. coli* для следующего раунда селекции. Эту стратегию селекции повторяли в течение четырех раундов с последовательно меньшими количествами антигена в раунде. После всех четырех раундов селекции по 400 клонов из каждого раунда 2, 3 и 4 были отобраны для экспрессии фага и скрининга фага ELISA. Данные пэннинга можно видеть в **таблице 5**.

Таблица 5. Данные пэннинга

Антитело	Титр	Раунд 1	Раунд 2	Раунд 3	Раунд 4	Раунд 5
1	Титр на входе	$1,5 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{13}$	$4,4 \times 10^{13}$	$1,8 \times 10^{13}$	-
	Титр на выходе	$1,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$	-
2	Титр на входе	$1,4 \times 10^{12}$	$2,6 \times 10^{13}$	$3,0 \times 10^{13}$	$1,0 \times 10^{13}$	-
	Титр на выходе	$9,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$	-
3	Титр на входе	$1,7 \times 10^{12}$	$2,0 \times 10^{13}$	$2,8 \times 10^{13}$	$3,2 \times 10^{13}$	-
	Титр на выходе	$1,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	-
4	Титр на входе	$1,2 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^{13}$	$3,6 \times 10^{13}$	$1,5 \times 10^{13}$	-
	Титр на выходе	$1,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$	-

[00234] Для тестирования на связывание с SARS-CoV-2 S1 и ACE2 фаг экспрессировали из каждой собранной колонии путем суперинфекции КО7 в 384-луночных планшетах для микротитрования. Содержащий фаг супернатант блокировали добавлением 1:1 4% обезжиренного молока (NFM). Планшеты для анализа готовили путем пассивной иммобилизации 0,4 мкг антигена в 384-луночных планшетах Maxisorp (Thermo Fisher #464718) и затем блокировали 4% NFM. После 3-кратной промывки в PBST супернатант блокированного фага инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки в PBST 0,3 мкг/мл анти-M13-HRP (Sino Biological #11973-MM05T-N) делили на аликвоты инкубирования в течение 1 часа при комнатной температуре. Связывание антитела с фаговым дисплеем определяли по поглощению при 450 нм с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (Thermo Fisher #34029). Фаг, который связывался с антигеном в 3 раза больше, чем на фоне человеческого Fc-белка, идентифицировали как потенциальные связыватели для секвенирующего анализа. DNA амплифицировали путем амплификации по катящемуся кругу из исходных глицериновых запасов каждого клона и подвергали секвенированию по Сэнгеру (Genewiz) для захвата доменов VH и VL. На **ФИГ. 8А-8D** показаны данные фагового ELISA из раунда 4 пэннинга белка SARS-CoV-2 S1 (субъединица 1) для антитела 1 (**ФИГ. 8А-8В**) и антитела 2 (**ФИГ. 8С-8D**). На **ФИГ. 9А-9D** показаны данные фагового ELISA из раунда 4 пэннинга белка ACE2 для антитела 3 (**ФИГ. 9А-9В**) и антитела 4 (**ФИГ. 9С-9D**).

[00235] Варианты SARS-CoV-2 тестировали на специфичность с использованием фагового ELISA, как описано выше. Используемые антигены включали Acro COVID S1 (S1N-C82E8), слитый RBD Fc COVID S1 (антиген 1) и слитый Fc COVID S1 RBM (антиген 2). Данные фагового ELISA представлены в **таблице 6А**. В **таблице 6А** показано среднее значение скрининга ELISA, кратность по сравнению с фоном (столбец А), специфичность ELISA, кратность по сравнению с фоном (столбец В) и специфичность ELISA, процент связывания относительно связывания с Acro S1 (столбец С). Как видно из **таблицы 6А**, почти все клоны, специфичные к домену связывания рецептора (RBD), демонстрируют хорошее связывание с полноразмерной субъединицей 1 (S1) и продуцируют S1 RBD Fc. Ни один из вариантов S1 RBD не связывался с S1 RBM Fc.

Таблица 6А. Фаговый анализ ELISA для SARS-CoV-2

Вариант	Колонка А	Колонка В				Колонка С		
	ELISA (Avg)	Acro S1	S1-RBD-Fc	S1-Fc	S1-RBM-Fc	S1-RBD-Fc	S1-Fc	S1-RBM-Fc
1-21	47,6	19,5	14,8	1,4	1,4	75,7%	7,2%	7,0%
1-22	40,6	32,7	26,5	2,5	1,5	81,2%	7,6%	4,7%
1-30	29,5	16,8	1,7	5,6	1,4	9,8%	33,3%	8,5%
1-35	28,6	21,6	1,8	1,4	1,6	8,2%	6,5%	7,3%
1-17	27,4	25,1	20,1	1,6	1,3	79,8%	6,2%	5,2%
1-27	27,2	1,5	1,9	1,3	1,6	124,5%	84,8%	108,8%
1-37	27,0	11,6	2,0	5,4	1,4	17,7%	46,7%	12,3%

1-12	25,7	1,7	1,7	1,3	1,7	104,0%	79,6%	102,5%
1-2	24,2	1,8	1,9	1,7	1,7	103,3%	95,4%	93,5%
1-3	23,9	1,6	1,8	1,5	1,5	109,3%	91,2%	91,9%
1-23	23,1	5,1	3,6	1,6	1,6	70,9%	31,1%	32,0%
1-7	22,5	6,8	3,3	1,7	1,6	48,7%	24,8%	23,0%
1-31	20,7	30,4	1,3	15,7	1,2	4,3%	51,6%	3,8%
1-4	20,6	1,0	1,4	0,9	1,1	137,5%	90,8%	105,3%
1-38	20,2	1,1	1,5	0,9	1,2	127,9%	82,8%	100,9%
1-8	19,3	12,0	11,2	1,1	1,2	92,9%	8,8%	10,3%
1-9	18,5	10,7	9,8	0,9	1,0	91,1%	8,7%	9,3%
1-32	17,9	11,5	1,5	4,0	1,1	13,1%	35,3%	9,5%
1-33	17,6	7,1	1,5	3,0	1,0	21,1%	42,1%	14,6%
1-24	32,9	12,9	11,0	1,1	1,3	85,4%	8,9%	10,3%
1-39	24,4	18,6	11,6	2,5	1,3	62,5%	13,2%	6,7%
1-40	22,9	18,7	14,3	1,3	1,1	76,7%	7,1%	6,0%
1-5	20,6	1,5	1,6	1,2	1,4	107,8%	82,9%	92,0%
1-41	18,1	4,5	2,7	1,3	1,2	58,8%	28,9%	26,3%
1-28	17,7	1,0	1,1	1,1	1,2	112,9%	109,7%	124,1%
1-10	16,9	17,4	17,4	1,3	1,1	100,5%	7,3%	6,2%
2-1	45,3	39,3	36,8	20,2	1,5	93,7%	51,3%	3,9%
2-10	43,8	38,9	39,9	9,4	1,2	102,7%	24,1%	3,1%
2-5	30,8	38,3	35,9	24,3	1,1	93,7%	63,3%	3,0%
2-2	23,4	39,4	39,6	4,7	1,1	100,4%	12,0%	2,8%
3-10	17,4	1,2	1,2	1,2	1,1	97,2%	99,6%	93,3%
1-26	19,5	1,4	1,1	1,3	1,0	76,8%	98,0%	74,7%
1-42	34,5	22,7	20,8	1,4	1,0	91,4%	6,4%	4,2%
1-13	28,2	4,8	4,3	0,9	1,2	89,3%	18,4%	24,2%
1-43	21,9	6,7	5,8	3,9	1,0	87,3%	58,3%	14,5%
1-44	24,6	10,4	8,2	1,0	0,8	78,6%	9,6%	7,6%
1-14	21,7	16,8	13,5	1,1	0,9	80,6%	6,7%	5,4%
1-6	20,8	1,8	1,3	1,1	0,8	69,6%	60,5%	45,4%
1-45	24,0	12,1	10,3	1,2	1,0	85,3%	9,6%	8,3%
1-46	21,7	4,6	3,1	1,1	0,9	66,6%	24,5%	19,8%
1-20	26,0	5,7	3,9	1,0	0,8	67,3%	17,0%	14,5%
1-47	22,6	8,1	5,5	1,2	0,9	68,9%	14,6%	11,1%
1-29	23,8	1,1	0,9	1,0	0,9	81,4%	94,0%	78,3%
1-1	32,5	4,5	4,0	1,6	1,1	90,7%	35,3%	24,5%
1-19	22,3	24,2	23,9	1,5	1,2	98,7%	6,4%	4,9%
1-16	22,1	3,4	3,1	1,0	0,9	89,7%	29,5%	27,3%
1-34	28,7	7,5	3,1	1,8	1,0	41,3%	24,5%	13,3%
1-48	22,6	2,5	2,1	0,8	0,8	84,7%	31,5%	30,3%
1-49	27,6	1,0	1,0	0,8	0,8	99,3%	85,6%	78,8%
1-18	22,7	9,8	7,0	1,1	0,8	71,0%	11,0%	8,0%

1-11	33,2	4,8	4,8	0,9	1,0	99,5%	18,7%	20,6%
1-50	21,1	13,9	12,4	1,2	0,8	88,9%	8,8%	5,9%
1-25	27,9	3,6	2,7	1,0	0,8	75,4%	28,1%	22,3%
1-36	23,6	10,1	1,2	1,1	0,8	11,5%	10,6%	8,4%
1-15	24,8	2,5	1,4	1,0	0,8	55,4%	41,5%	32,1%
2-4	15,5	37,7	38,8	7,2	1,2	102,7%	19,0%	3,1%
2-6	22,1	11,1	12,8	1,8	1,1	115,8%	16,4%	9,5%
2-11	28,1	1,1	1,0	1,2	0,9	86,3%	103,4%	76,1%
2-12	18,2	39,8	40,3	14,7	1,1	101,3%	37,0%	2,9%
2-13	19,1	27,3	32,1	3,7	0,9	117,5%	13,4%	3,1%
2-14	17,2	31,7	32,9	4,2	0,9	103,9%	13,3%	2,8%
2-7	25,3	37,2	37,3	7,7	0,9	100,3%	20,6%	2,4%
2-8	32,4	35,9	36,5	5,4	1,1	101,8%	15,0%	3,1%
2-15	13,7	31,0	28,1	3,8	0,9	90,6%	12,4%	3,0%
2-9	14,1	24,1	24,3	3,0	0,8	100,7%	12,2%	3,5%

[00236] В таблицах 6В-6С показана кинетика Carterra SPR для вариантов антител к SARS-CoV-2, ранжированных по отклонению от нормы (таблица 6В) и по K_D (таблица 6С). На ФИГ. 10 показано, что ACE2 связывается с вариантами S1-RBD-Fc и S1-Fc.

Таблица 6В. Кинетика Carterra SPR для SARS-CoV-2, ранжированная по отклонению от нормы

IgG	Acro S1	S1-RBD-Fc	S1-Fc	S1-RBM-Fc	ка (M-1 с-1)	K_D (с-1)
2-10	38,9	39,9	9,4	1,2	2,08E+05	1,15E-04
2-5	38,3	35,9	24,3	1,1	9,39E+04	2,59E-04
1-31	30,4	1,3	15,7	1,2	2,05E+04	7,62E-04
2-2	39,4	39,6	4,7	1,1	7,74E+04	9,06E-04
1-13	4,8	4,3	0,9	1,2	2,17E+05	1,38E-03
1-30	16,8	1,7	5,6	1,4	4,39E+04	1,64E-03
1-29	1,1	0,9	1,0	0,9	5,35E+02	1,97E-03
1-27	1,5	1,9	1,3	1,6	2,27E+05	2,85E-03
1-35	21,6	1,8	1,4	1,6	5,90E+04	5,43E-03
1-36	10,1	1,2	1,1	0,8	1,14E+05	7,85E-03
1-67	18,6	11,6	2,5	1,3	7,36E+04	8,86E-03
1-2	1,8	1,9	1,7	1,7	1,58E+03	2,72E-02
1-5	1,5	1,6	1,2	1,4	2,15E+03	5,40E-02
1-68	6,7	5,8	3,9	1,0	2,46E+06	8,75E-02
1-69	1,1	1,5	0,9	1,2	3,08E+05	1,23E-01
1-4	1,0	1,4	0,9	1,1	4,20E+04	1,24E-01
1-12	1,7	1,7	1,3	1,7	3,59E+05	1,34E-01
1-11	4,8	4,8	0,9	1,0	5,92E+05	1,43E-01
1-10	17,4	17,4	1,3	1,1	1,04E+06	1,47E-01
1-7	4,5	2,7	1,3	1,2	2,09E+05	1,55E-01
1-15	2,5	1,4	1,0	0,8	4,49E+05	1,56E-01

1-25	3,6	2,7	1,0	0,8	1,98E+06	1,56E-01
1-23	5,1	3,6	1,6	1,6	5,06E+05	1,59E-01
1-7	6,8	3,3	1,7	1,6	1,34E+06	1,70E-01
1-47	8,1	5,5	1,2	0,9	6,32E+03	2,40E-01
1-3	1,6	1,8	1,5	1,5	1,42E+06	3,04E-01
1-32	11,5	1,5	4,0	1,1	5,49E+06	3,17E-01
1-20	5,7	3,9	1,0	0,8	5,17E+02	6,95E-01
1-28	1,0	1,1	1,1	1,2	1,23E+08	9,05E+00
1-48	2,5	2,1	0,8	0,8	5,56E+07	9,11E+00
1-24	12,9	11,0	1,1	1,3	1,94E+08	1,46E+01
1-6	1,8	1,3	1,1	0,8	4,49E+08	2,08E+01
1-17	25,1	20,1	1,6	1,3	3,92E+08	2,63E+01
1-49	1,0	1,0	0,8	0,8	6,00E+08	3,22E+01
1-71	11,6	2,0	5,4	1,4	3,69E+08	4,03E+01
1-42	22,7	20,8	1,4	1,0	9,10E+08	1,03E+02

[00236] Таблица 6С. Кинетика Carterra SPR для SARS-CoV-2, ранжированная по K_D

IgG	Acro S1	S1-RBD-Fc	S1-Fc	S1-RBM-Fc	ka (M-1 с-1)	kd (с-1)	K_D (нМ)	Rmax (RU)
2-10	38,9	39,9	9,4	1,2	2,08E+05	1,15E-04	0,6	20
2-5	38,3	35,9	24,3	1,1	9,39E+04	2,59E-04	2,8	39
1-13	4,8	4,3	0,9	1,2	2,17E+05	1,38E-03	6,4	23
2-2	39,4	39,6	4,7	1,1	7,74E+04	9,06E-04	11,7	131
1-27	1,5	1,9	1,3	1,6	2,27E+05	2,85E-03	12,5	39
1-68	6,7	5,8	3,9	1,0	2,46E+06	8,75E-02	35,6	73
1-30	16,8	1,7	5,6	1,4	4,39E+04	1,64E-03	37,2	98
1-31	30,4	1,3	15,7	1,2	2,05E+04	7,62E-04	37,2	256
1-6	1,8	1,3	1,1	0,8	4,49E+08	2,08E+01	46,3	87
1-49	1,0	1,0	0,8	0,8	6,00E+08	3,22E+01	53,6	72
1-32	11,5	1,5	4,0	1,1	5,49E+06	3,17E-01	57,8	112
1-17	25,1	20,1	1,6	1,3	3,92E+08	2,63E+01	67,1	46
1-36	10,1	1,2	1,1	0,8	1,14E+05	7,85E-03	68,9	150
1-28	1,0	1,1	1,1	1,2	1,23E+08	9,05E+00	73,5	58
1-24	12,9	11,0	1,1	1,3	1,94E+08	1,46E+01	75,5	48
1-25	3,6	2,7	1,0	0,8	1,98E+06	1,56E-01	78,9	46
1-35	21,6	1,8	1,4	1,6	5,90E+04	5,43E-03	91,9	341
1-71	11,6	2,0	5,4	1,4	3,69E+08	4,03E+01	109,3	113
1-42	22,7	20,8	1,4	1,0	9,10E+08	1,03E+02	113,4	68
1-67	18,6	11,6	2,5	1,3	7,36E+04	8,86E-03	120,4	22
1-7	6,8	3,3	1,7	1,6	1,34E+06	1,70E-01	127,1	31
1-10	17,4	17,4	1,3	1,1	1,04E+06	1,47E-01	141,7	27

1-48	2,5	2,1	0,8	0,8	5,56E+07	9,11E+00	163,8	64
1-3	1,6	1,8	1,5	1,5	1,42E+06	3,04E-01	214,6	87
1-11	4,8	4,8	0,9	1,0	5,92E+05	1,43E-01	240,9	53
1-23	5,1	3,6	1,6	1,6	5,06E+05	1,59E-01	314,6	128
1-15	2,5	1,4	1,0	0,8	4,49E+05	1,56E-01	346,9	79
1-12	1,7	1,7	1,3	1,7	3,59E+05	1,34E-01	372,5	112
1-69	1,1	1,5	0,9	1,2	3,08E+05	1,23E-01	398,4	66
1-7	4,5	2,7	1,3	1,2	2,09E+05	1,55E-01	742,5	160
1-4	1,0	1,4	0,9	1,1	4,20E+04	1,24E-01	2946,4	385
1-29	1,1	0,9	1,0	0,9	5,35E+02	1,97E-03	3684,3	1206
1-2	1,8	1,9	1,7	1,7	1,58E+03	2,72E-02	17228,5	1652
1-5	1,5	1,6	1,2	1,4	2,15E+03	5,40E-02	25170,1	4457
1-47	8,1	5,5	1,2	0,9	6,32E+03	2,40E-01	37971,0	5497
1-20	5,7	3,9	1,0	0,8	5,17E+02	6,95E-01	1344113,2	64406

[00237] Пример 5. Варианты SARS-CoV-2 и ACE

[00238] Антитела к варианту SARS-CoV-2 и ACE тестировали на специфичность и аффинность.

[00239] Рекомбинантный белок S1 (Acros Biosystems, кат. № S1N-S52H5) пассивно иммобилизовали на 384-луночном планшете для ELISA и блокировали с помощью BSA. Антитела S1 Panel разбавляли от 50 нМ до 0,0076 нМ и инкубировали с заблокированным планшетом. Связывание антител определяли с использованием вторичного антитела Goat-anti-Human-HRP и проявляли с использованием субстрата HRP (список в настоящем документе). Сигнал поглощения наносили на график в виде % от максимального связывания и подгоняли для определения EC50 каждого антитела с использованием GraphPad Prism.

[00240] Примеры данных по аффинности вариантов 2-6 SARS-CoV-2 показаны на **ФИГ 11А-11В**. Панель связывания антител к SARS-CoV-2 определяли, как показано на **ФИГ. 12** и в **таблицах 7А-7F** далее.

Таблица 7А. EC50 вариантов SARS-CoV-2

Антитело	EC50 (нМ)
1-31	0,03139
2-6	0,03364
ACRO	0,04831
1-34	0,06522
2-2	0,07992
1-27	0,09283
2-8	0,1029
1-22	0,1248
1-32	0,1406

1-16	0,1435
1-12	0,1585
2-5	0,1615
CR3022	0,1657
1-53	0,1691
1-30	0,2084
1-28	0,2224
1-71	0,2673
1-20	0,3236
1-4	0,4216
1-35	0,4922
1-47	0,5893
1-5	0,774
2-4	0,8792
1-3	0,9724
1-21	1,003
2-19	1,257
1-51	1,465
1-19	1,706
1-42	1,742
2-2	1,789
2-1	1,894
1-33	3,006
2-13	5,139
2-11	6,921
2-15	8,509
2-7	10,09
1-26	11,93
1-24	12,86
1-49	13,04
1-10	18,31
1-1	21,87
1-8	25,09
1-7	26,94

1-72	29,13
1-17	33,17
1-36	34,86
1-73	43,58
2-10	46,43
1-9	46,88
2-17	51,86
1-52	57,88
2-18	74,71
1-29	83,41
2-12	95,94
1-25	107
2-9	118,3
1-23	123,9
1-48	296
2-14	854,7

Таблица 7В. SARS-CoV-2 Частота вариантов и данные ELISA

IgG	Частота	ELISA (Avg)
1-21	1	47,6
1-22	3	40,6
1-30	1	29,5
1-35	3	28,6
1-17	79	27,4
1-27	1	27,2
1-12	2	25,7
1-2	14	24,2
1-3	2	23,9
1-23	1	23,1
1-7	4	22,5
1-31	1	20,7
1-4	1	20,6
1-8	2	19,3
1-9	2	18,5
1-32	1	17,9
1-33	1	17,6
1-24	1	32,9
1-5	1	20,6
1-28	2	17,7

1-10	1	16,9
1-26	1	19,5
1-13	1	28,2
1-14	1	21,7
1-6	1	20,8
1-20	3	26,0
1-29	1	23,8
1-1	1	32,5
1-19	1	22,3
1-16	1	22,1
1-34	1	28,7
1-18	1	22,7
1-11	1	33,2
1-25	1	27,9
1-36	1	23,6
1-15	1	24,8
1-51	1	7,1
1-52	1	3,5
1-53	1	21,7

Таблица 7С. Варианты SARS-CoV-2 S1

			DB/S1	DB/S-T	DC/S1	DC/S-T	Ингибитор	Fc/S1	Fc/S-T
IgG	Freq	ELISA(Avg)	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)	IC50(нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)f
1-21	1	47,6					6,7		
1-22	3	40,6					73,2		
1-30	1	29,5	37,2		4,7	475861,6	25,3		
1-35	3	28,6	91,9	569,8	47,5	16,7	209,2	139,4	0,5
1-17	79	27,4	67,1		6649,2				10,0
1-27	1	27,2	12,5		5519,6			9,6	9,6
1-12	2	25,7	372,5		10,6		33,0	6,1	14,0
1-2	14	24,2	17228,5	304,3					
1-3	2	23,9	214,6	423,0	252,8	5306,9	15,7		10,0
1-23	1	23,1	314,6						
1-7	4	22,5	127,1						
1-31	1	20,7	37,2		14,4		9,2	17,5	
1-4	1	20,6	2946,4	6,6	659,2	129,2		25,5	12,3
1-8	2	19,3					97,3		
1-9	2	18,5					282,4		
1-32	1	17,9	57,8		14,8			2979,8	
1-33	1	17,6			8,1	1739312,4			
1-24	1	32,9	75,5		2043,7				
1-40	2	22,9							
1-5	1	20,6	25170,1	1155,7					
1-28	2	17,7	73,5	13,4	520,3	96,6		3236,7	8,6
1-10	1	16,9	141,7				17,7		
1-26	1	19,5					8,0		
1-13	1	28,2	6,4						

1-14	1	21,7		8,1					
1-6	1	20,8	46,3	684,2					
1-20	3	26,0	1344113,2		34,4	145,0		10,3	17,3
1-29	1	23,8	3684,3	36,1					19,3
1-1	1	32,5							
1-19	1	22,3			85,4	0,0		14,3	18,6
1-16	1	22,1			2282,0	4487,3	1,7	178,8	2,2
1-34	1	28,7			8,2	623,6		13,4	1,4
1-18	1	22,7							
1-11	1	33,2	240,9	30,2					
1-25	1	27,9	78,9				3,0		6,1
1-36	1	23,6	68,9	3,9			9,3		33,2
1-15	1	24,8	346,9						
1-51	1	7,1							
1-52	1	3,5					739,8		
1-53	1	21,7					1426,0		
2-16	1	7,1					433,4		
2-17	1	3,5							
2-18	1	43,0							
2-19	1	21,7							
2-2	1	12,8							

Таблица 7D. Частота вариантов SARS-CoV-2 S1 и данные ELISA

IgG	Частота	ELISA(Avg)
2-1	1	45,3
2-10	1	43,8
2-5	46	30,8
2-2	2	23,4
2-4	1	15,5
2-6	5	22,1
2-11	3	28,1
2-12	1	18,2
2-13	1	19,1
2-14	1	17,2
2-7	1	25,3
2-8	1	32,4
2-15	1	13,7
2-9	1	14,1
2-16	1	7,1
2-17	1	3,5
2-18	1	43,0
2-19	1	21,7
2-2	1	12,8

Таблица 7Е. Варианты SARS-CoV-2 S1

			DB/S1	DB/S-T	DC/S1	DC/S-T	Ингибитор	Fc/S1	Fc/S-T
IgG	Freq	ELISA (Avg)	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)	IC50 (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)
2-10	1	43,8	0,6	125,6					
2-5	46	30,8	2,8			17,3	4,2	1,9	90,2
2-2	2	23,4	11,7	1,2		1,4	3,6	58,3	0,8
2-4	1	15,5		4337,7					
2-6	5	22,1		3,0	563,8	0,4		32,3	0,01
2-11	3	28,1		3,1				90,0	284,5
2-12	1	18,2		6,4		63,8	1,0		3,2
2-13	1	19,1					45,0		
2-14	1	17,2		2,5					34,8
2-7	1	25,3							252,5
2-8	1	32,4		115,1	33,4	47,4	12,2	52,8	
2-15	1	13,7		3,5			4,7		
2-9	1	14,1					23,2		23582,5

Таблица 7F. Панель антител ELISA, титрование связывания (EC50)

АНТИТЕЛО	EC50 (нМ)
2-8	0,08001
1-35	0,09604
1-3	0,133
2-5	0,1332
1-27	0,1479
1-31	0,2035
2-6	0,283
1-2	0,523
1-34	0,5584
2-2	0,612
1-67	0,9402
1-16	1,409
1-12	2,15
1-28	2,284
1-4	2,559
1-1	4,157
1-19	4,413
1-22	6,548
1-5	7,833
1-42	7,92
2-15	7,92
1-49	8,669
1-53	10,25
2-9	12,58
1-33	17,5
1-26	48,46
2-29	63,43
1-7	95,66
1-25	95,66
1-51	98,17
2-17	100
2-2	100

[00241] Данные конкурентного ELISA для первого набора антител SARS-CoV-2 S1 RBD и вариантных антител ACE2 показаны на **ФИГ. 13А-13В** и **ФИГ. 14А**. Вариантные антитела к SARS-CoV-2 с высокой эффективностью по порядку активности включали варианты 2-2, Асго mAb (1.5333), варианты 2-5, варианты 1-12 и варианты 2-9. Вариантные антитела ACE с высокой активностью по порядку активности включали варианты 4-52, варианты 4-17, варианты 4-39, Асго mAb (1.533), варианты 4-54 и варианты 3.5. Данные конкурентного ELISA для второго набора вариантных антител к ACE2 показаны на **ФИГ. 14В**. Вариантные антитела с высокой активностью по порядку активности включали вариант 4-101, вариант 4-140, вариант 4-121, вариант 4-118 и Асго mAb (2,76 нМ). На **ФИГ. 14С-14D** показано, что вариантные антитела к SARS-CoV-2 демонстрируют сильную нейтрализацию.

[00242] Также проводили анализы ингибирования, как показано на **ФИГ. 15**.

[00243] Вариантные антитела к SARS-CoV-2 анализировали на ингибирование Vero с использованием FACS. Вкратце, клетки Vero удаляли с помощью Cell Stripper (~20 минут с жизнеспособностью 90% после удаления). Клетки высевали по $0,1 \times 10^6$ клеток на лунку. Исходный раствор вариантных антител при концентрации 200 нМ титровали 1:3. S-белок SARS-CoV-2 RBD, SPD-C5259 составляли 6 мкг/мл. Титраты вариантов антител смешивали 1:1 с 6 мкг/мл белка S (50 мкл IgG:50 мкл белка S). К клеткам добавляли 100 мкл смеси и затем инкубировали на льду в течение 1 часа. Клетки промывали 1X с последующим добавлением 50 мкл козьего антимишиного вторичного препарата в соотношении 1:200. Затем клетки инкубировали на льду в течение 1 часа в темноте, трижды промывали и затем считывали с планшетов. Данные для вариантных антител SARS-CoV-2 показаны на **ФИГ. 16А-16D**, **ФИГ. 17А-17D** и в **таблицах 8 и 9**. Как видно из данных, несколько вариантных антител блокировали связывание меченого S1 RBD с ACE2 на клетках Vero, включая варианты 2-8, 2-5, 2-2, 2-4 и 1-63.

Таблица 8.

Антитело	IC50 (нМ)
Асго Анти-S1	2,7
1-30	NC
1-35	NC
1-12	NC
1-31	NC
1-63	106,6
2-5	4,4
2-2	3,0
2-4	46,3
2-6	NC
2-8	19,5

Таблица 9.

	Мономер S1 (нМ)	Тример S (нМ)
--	-----------------	---------------

1-31	0,22	0,80
1-30	0,67	4,02
1-35	0,15	0,76
1-12	2,08	0,61
1-63	1,40	14,39
2-8	1,52	7,08
2-5	0,17	0,59
2-2	0,13	0,64
2-4	1,58	10,18
2-6	0,07	0,43

[00244] Сводная информация о биннинге эпитопов для вариантных антител SARS-CoV-2 представлена в **таблице 10** ниже.

Таблица 10. Связывание эпитопов SARS-CoV-2

ID	Acro mAb	2-2	Abcam CR3022	2-5	2-8	2-11	1-32	1-16	2-6	1-35
*Acro mAb	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1
*2-2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1
Abcam CR3022	2	0	0	0	0	1	1	2	2	2
*2-5	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
*2-8	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
2-11	1	0	0	0	0	0	1	2	1	1
**1-32	2	1	3	1	2	1	0	0	1	1
1-16	1	1	2	2	1	1	1	0	0	0
2-6	2	2	3	2	2	2	1	0	0	0
1-35	1	1	2	2	1	1	1	0	0	0

* Ингибирование анти-S1 IgG в анализе FACS (Vero E6)

[00245] ** Ингибирование анти-S1 IgG в анализе ELISA (растворимый ACE2)

[00246] Варианты антител также измеряли в отношении связывания с другими коронавирусами. Данные показывают, что вариантные антитела не связываются в значительной степени с S1 HCoV-229E (Sino), S1 HCoV-HKU1 (Sino), S1 HCoV-NL63 (Sino) или S1 HCoV-OC43 (Sino) (данные не показаны).

[00247] Данные показывают, что вариантные антитела к SARS-CoV-2 и ACE2 обладают высокой специфичностью и аффинностью к своим антигенам-мишеням с аффинностью в диапазоне от пиколярной до наномолярной.

[00248] Пример 6. Варианты SARS-CoV-2 S1

[00249] Антитела VHH-Fc, нацеленные на S1, титровали 1:3, начиная с 200 нМ, и смешивали 1:1 с RBD SARS-COV2-S1 (метка IgG2Fc мыши). К клеткам Vero E6,

экспрессирующим эндогенный рецептор ACE2, добавляли комплекс RBD/VHH-Fc и инкубировали. Затем клетки промывали и использовали вторичное антитело против мыши для измерения связывания S1 RBD с ACE2, таким образом оценивая ингибирование S1. Более 60 клонов продемонстрировали сильное ингибирование. Данные показаны на **ФИГ. 18А-18С** и в **таблицах 11 и 12.**

Таблица 11.

Образец	IC ₅₀ [нМ]
2-2	0,56
5-56	0,68
5-1	0,75
5-67	0,76
5-47	0,80
5-8	0,94
5-38	0,96
5-37	1,01
5-34	1,21
5-20	1,23
5-55	1,45
5-46	1,52
5-50	1,61
5-5	1,79
2-5	2,146
5-60	2,15
5-15	2,19
5-29	2,19
Асго анти-S1	3,80
5-49	5,61
5-44	11,73

Таблица 12.

Образец	IC ₅₀ [нМ]
6-85	0,2044
2-2	0,56
6-63	0,74
6-3	0,74
6-78	0,7427
6-20	0,76
6-91	0,89
6-44	0,97
6-55	0,97
6-73	1,01
6-26	1,07
6-76	1,11
6-45	1,16

6-60	1,31
6-40	1,36
6-81	1,383
6-10	1,44
6-7	1,53
6-39	1,53
6-109	1,60
6-38	1,94
2-5	2,146
6-30	2,94
6-57	3,13
Асго анти-S1	3,49
6-67	3,80
6-77	4,041
6-100	5,07
6-47	5,86
6-41	6,60
6-88	7,118
6-105	7,82
6-34	8,24
6-54	8,90
6-18	12,29
6-1	15,76
6-65	37,47

[00249] Кинетику антител измеряли для вариантов 2-5, 2-2 и 2-6 (**ФИГ. 19А**) и вариантов 1-12, 1-42, 1-20 и 1-19 (**ФИГ. 19В**). Данные показаны на **ФИГ. 19А-19В**. Данные показывают, что антитела связываются с наномолярной аффинностью. На **ФИГ. 19С** показан процент нейтрализации для вариантов 1-12, 1-42 и 1-20. На **ФИГ. 19D** показан процент нейтрализации для вариантов 1-12, 1-42 и 1-20 с использованием живого вируса.

[00250] Пример 7. Нейтрализация живого вируса

[00251] Антитела VHH-Fc, нацеленные на S1, титровали 1:3, начиная с 200 нМ, и смешивали 1:1 с RBD SARS-COV2-S1 (метка IgG2Fc мыши). К клеткам Vero E6, экспрессирующим эндогенный рецептор ACE2, добавляли комплекс RBD/VHH-Fc и инкубировали. Затем клетки промывали и использовали вторичное антитело против мыши для измерения связывания S1 RBD с ACE2, таким образом оценивая ингибирование S1. Более 60 клонов продемонстрировали сильное ингибирование. Данные показаны на **ФИГ. 20А-20В** и в **таблицах 13**.

Таблица 13.

Антитело	EC50 (мкг/мл)
6-63	0,06
6-3	0,06
2165mAb*	0,08
5-1	0,10

6-60	0,15
6-55	0,21
5-20	0,27
1-20	0,37
5-34	0,54
6-85	0,84
6-76	1,08
6-73	1,46
1-42	2,03
1-12	2,10
6-26	2,97
6-20	5,03
6-78	8,26
2-6	11,77
2-5	18,31
2-2	67,57
1-63	106,90

[00252] На **ФИГ. 20В** показано, что вариант 6-2 продемонстрировал более высокую нейтрализацию по сравнению с IgG в живом вирусе. Варианты 6-63, 6-3 и 5-1 показали сопоставимую нейтрализацию по сравнению с 2165 mAb, полученными от субъекта с COVID-19.

[00253] На **ФИГ. 20С-20Е** и в **таблице 14** показаны данные для однодоменных антител VHH в анализах нейтрализации VSV-псевдотипа SARS-CoV-2. Варианты 5-1, 6-3 и 6-63 продемонстрировали улучшенную нейтрализацию при тестировании псевдовирюсов, включая FRNT живого вируса (**ФИГ. 20Е**). Варианты 6-3, 6-60, 6-63 и 6-76 продемонстрировали сильную нейтрализацию в PRNT живого вируса, как видно из **таблицы 15** и на **ФИГ. 20F**. Данные, как видно из **таблицы 16** и на **ФИГ. 20G-20H** показывают, что варианты 6-3, 6-63 и 1-20 проявляют сильную нейтрализацию в PRNT живого вируса.

Таблица 14.

Антитело	NC50 (мкг/мл)
6-63	0,06
6-3	0,06
5-1	0,10
6-60	0,15
6-55	0,21
5-20	0,27
1-20	0,37
5-34	0,54
6-85	0,84
6-76	1,08

6-73	1,46
1-42	2,03
1-12	2,10
6-26	2,97
6-20	5,03
6-78	8,26
2-6	11,77
2-5	18,31
2-2	67,57
1-63	106,90

Таблица 15.

Антитело	PRNT90 (нг/мл)
5-1	15,6
5-20	3,9
5-34	15,6
6-26	62,5
6-60	<0,98
6-63	3,9
6-3	<0,98
6-55	62,5
6-76	3,9
6-78	250
6-20	15,6
6-73	250
6-85	62,5

Таблица 16.

Антитело	ЕС80 (мкг/мл)
6-63	0,057861
6-3	0,115234
1-20	0,171875
6-60	0,236816
5-20	0,376
6-76	0,425781
6-55	0,445313
5-34	0,570313
6-42	0,734375
5-1	0,810547
1-12	0,855469
6-85	1,0625
5-38	1,5

5-67	1,566406
1-42	1,78125
6-73	2,015625
6-20	2,3125
5-47	2,457031
1-19	2,78125
6-44	3,15625
6-26	3,609375
6-45	4,015625
5-37	12,4375
6-78	13,75
5-63	14,1875
5-8	15,8125
6-6	24,375
6-13	25,6875
6-24	31,375
1-63	50,5
6-32	60,625
2-6	72,34043
6-22	103,25
5-56	104,75
2-5	106,5
6-82	107,75
5-32	180,1418
6-91	240,5
2-2	354,6099
5-51	387,9433

[00254] Варианты также тестировали в исследованиях нейтрализации псевдовирусов и PRNT живых вирусов. Варианты 5-20, 6-60, 6-63 и 6-3 продемонстрировали сильную нейтрализацию в PRNT живого вируса, как видно из **ФИГ. 20I**.

[00255] Пример 8. Оценка *in vivo* вариантов иммуноглобулинов коронавируса

[00256] В этом примере оценивают варианты иммуноглобулинов коронавируса в модели сирийского хомяка (с подавленным иммунитетом) заболевания COVID-19.

[00257] Самок сирийских хомяков в возрасте 8-10 недель подвергали иммуносупрессии с помощью циклофосфамида (140 мг/кг в сутки за 3 дня до заражения и затем 100 мг/кг каждые 4 дня внутривентриально). Одиннадцати группам по шесть хомяков в группе инъецировали антитело в день -1 в сравнении с контрольным инфицированием внутривентриальным путем (внутрибрюшинно). В день 0 всех хомяков инфицировали 1000 PFU изолятом SARS CoV-2 Washington интраназальным путем и ежедневно взвешивали. Рассчитывали процентное изменение веса по отношению к исходному весу. Мазки из зева собирали в дни -1, 1, 4, 7, 9. На 9-й день отбирали легкие и гомогенизировали для определения вирусной нагрузки. Данные по группам показаны в **таблице 17**.

Таблица 17. Группы

Группа	Разбавитель/объем, вводимый внутрибрюшинно
Реконвалесцентная плазма	NA/2,5 мл
Отрицательный контроль MAb c7d11	PBS/2,5 мл
6-63	PBS/2,5 мл
6-3	PBS/2,5 мл
6-36	PBS/2,5 мл

NA=не применимо

[00258] Животные, которым внутрибрюшинно (в/б) инъектировали антитело отрицательного контроля, теряли вес, начав терять значительное количество веса между 5 и 6 днями, и продолжая терять до конца эксперимента на 9 день. Максимальная средняя потеря веса в группе составила -11,7%. Напротив, животные, которым вводили положительную контрольную плазму выздоравливающего человека, поддерживали вес в пределах -3,2% от их веса в день 0, что указывает на то, что эта плазма защищала от заболевания, проявляющегося потерей веса (ФИГ. 21А).

[00259] Группам из шести животных вводили в/б 10, 5 или 1 мг/кг моноклонального антитела 6-63, разведенного в PBS. Во всех группах поддерживался вес на уровне или выше исходного веса, что указывает на то, что антитело защищало от заболевания, приводящего к потере веса (ФИГ. 21В).

[00260] Группам из шести животных вводили в/б 10, 5 или 1 мг/кг моноклонального антитела 6-3, разведенного в PBS. В группах 1 и 10 мг/кг поддерживался вес на уровне или выше исходного веса во все моменты времени. Вес в группе, получавшей 5 мг/кг, был немного ниже, чем у выздоравливающего контроля на 7-9 дни, но явно отличался от веса в случае антител отрицательного контроля. Вместе эти данные указывают на то, что антитело уменьшало потерю веса, связанную с заболеванием (ФИГ. 21С).

[00261] Группам из шести животных вводили в/б 10, 5 или 1 мг/кг моноклонального антитела 6-36, разведенного в PBS. В группах 10 и 5 мг/кг поддерживался вес на уровне, аналогичном положительному контролю, во все моменты времени. Вес в группе 1 мг/кг значительно снизился, как и в отрицательном контроле. Эти данные показывают, что антитела 6-36 в дозе 1 мг/кг недостаточны для получения положительного эффекта, но 5-кратная или более доза достаточна для уменьшения заболевания, определяемого по потере веса (ФИГ. 21D).

[00262] На ФИГ. 3421Е показаны данные для вариантов антител, сгруппированных по дозе. На ФИГ. 21F графики процентного изменения веса для антител 6-3, 6-63, и 1-20.

[00263] У хомяков дикого типа вирус обычно элиминируется к 7-му дню. Однако в модели с циклофосфамидом уровни вируса не подавляются, если не проводится вмешательство (например, введение защитных антител) или циклофосфамид не прекращается, чтобы обеспечить иммунный ответ и элиминацию. В этом эксперименте положительная контрольная сыворотка выздоравливающего человека элиминировала вирус из легких всех хомячков, кроме одного. Напротив, у всех, кроме одного, хомячков,

которым вводили антитело отрицательного контроля, в легких все еще оставался инфекционный вирус. Интересно, что хомяки, профилактически обработанные (за 24 часа до воздействия) любым из трех антител в самой высокой дозе (10 мг/кг), имели инфекционный вирус в легких по крайней мере у половины животных, обследованных через 9 дней. Как это ни парадоксально, 6-63 и 6-3 в более низких дозах (5 и 1 мг/кг) имели животных с относительно менее инфекционным вирусом в легких. У 4 из 6 животных, которым вводили от 1 до 20 животных в дозе 5 мг/кг, вирус не обнаруживался в легких. Когда дозы этого антитела были снижены до 1 мг/кг, все животные, кроме одного, имели инфекционный вирус. Данные показаны на **ФИГ. 21G-21H**.

[00264] Оценки воспаления и отека патологии легких у трех животных добавляли для каждой группы и наносили на график (**ФИГ. 21I**). Это были те же самые легкие, которые использовались для оценки ISH. Средний балл сыворотки реконвалесцентов в положительном контроле составил 2, а в отрицательном контроле - 4. Единственными группами со средним баллом ниже, чем в группе отрицательного контроля, были 1 и 5 мг/кг 6-63, 10 и 5 мг/кг 6-3, и 5 мг/кг 1-20. Самые высокие средние баллы патологии были у групп 1-20, получавших дозы 1 и 10 мг/кг. Самая низкая средняя оценка патологии была у группы 5 мг/кг 6-63.

[00265] Пример 9. Анализ нейтрализации псевдотипа VSV антител к SARS-CoV-2 B.135 (южноафриканский штамм)

[00266] Антитела, описанные в настоящем документе, тестировали в анализе нейтрализации псевдотипа VSV для SARS-CoV-2 B.135 (южноафриканский штамм).

[00267] Вкратце, полулогарифмические разведения всех тестируемых антител (ТА) и контроля готовили и смешивали с вирусом псевдотипа VSV в соотношении 1:1 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией над клетками Vero (ATCC® CCL-81TM) высевали по 60000 клеток на лунку при температуре 37°C. На следующий день клетки лизировали и измеряли активность люциферазы для оценки способности каждого ТА блокировать проникновение вируса в клетки Vero. Все образцы запускались в трех экземплярах. Анализ данных проводится с помощью XLFit и Graphpad Prism. Тестовые концентрации и план планшета показаны в **Таблица 18А**.

Таблица 18А. Оценка концентраций и план планшета

	Образцы	Исходный раствор (мг/мл)	Целевая концентрация/разведение	Концентрация в планшете
1	6-63	6,39	100 мкг/мл	50,00 мкг/мл
2	6-3	10,05	100 мкг/мл	50,00 мкг/мл
3	1-12	2,24	100 мкг/мл	50,00 мкг/мл
4	pAb мыши	1	1:25	1:50

[00268] Данные показаны на **ФИГ. 22А-22В**. На **ФИГ. 22А** показано, что положительный контроль pAb имеет NT50 1:14, 993 разведение, как и ожидалось. На **ФИГ. 22В** показано, что антитела 6-63 и 6-3 нейтрализуют штамм VSV-SARS B.135 с IC50 ~3,07

мкг/мл и 0,143 мкг/мл, соответственно. Антитело 1-12 не смогло нейтрализовать штамм VSV-SARS B.135.

[00269] Пример 10. Анализ нейтрализации псевдотипа VSV антител к варианту D614G SARS-CoV-2

[00270] Антитела, описанные в настоящем документе, тестировали в анализе нейтрализации псевдотипа VSV для варианта SARS-CoV-2 SARS CoV-2 S D614G.

[00271] Вкратце, готовили серийные полулогарифмические разведения всех тестируемых антител (ТА) и контроля и смешивали с вирусом псевдотипа VSV в соотношении 1:1 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией над клетками Vero (ATCC® CCL-81TM), высеянными по 60000 клеток на лунку при температуре 37°C. На следующий день клетки лизировали и измеряли активность люциферазы для оценки способности каждого ТА блокировать проникновение вируса в клетки Vero. Все образцы запускались в трех экземплярах. Анализ данных проводили с помощью XLFit и Graphpad Prism.

[00272] Данные показаны на **ФИГ. 23А-23С**. На **ФИГ. 23А** показан положительный контроль.

[00273] Пример 11. Коктейли антител для лечения SARS-CoV-2 у сирийских хомяков

[00274] Этот пример демонстрирует эффективность коктейлей антител до и после воздействия на сирийских хомяков.

[00275] Способы

[00276] В этом исследовании у хомячков временно подавляли иммунитет с помощью циклофосамида. В качестве стратегии снижения риска отбора вирусов с мутациями, ускользящими от нейтрализации, был объединен и использован коктейль из нанотела (nAb) и моноклонального антитела (MAb), которые, как известно, связывают различные эпитопы шиповидного белка. Комбинированная доза составляла 20 мг/кг в этом эксперименте по проверке концепции. Коктейль состоял из 10 мг/кг нанотела VNN 6-63 и 10 мг/кг моноклонального антитела 1-20. В каждой группе использовали равное количество самцов и самок животных.

[00277] В этом эксперименте использовали семьдесят восемь хомячков в соответствии с **таблицей 18В**. В день 0 животных подвергали интраназальной (и/н) инстилляцией 1000 PFU вируса SARS-CoV-2 в объеме 50 мкл. Объем распределялся между обеими ноздрями. Для временного подавления иммунитета всех животных лечили циклофосфамидом, начиная с 3-го дня (доза 140 мг/кг), с последующими дополнительными дозами (100 мг/кг) в 1, 5 и 9 дни.

[00278] В указанный день после воздействия внутрибрюшинно (в/б) вводили коктейль MAb/nAb или с7D11. В день 0 у группы I для гематологического исследования брали образцы крови, чтобы подтвердить иммуносупрессию. Группа I была также контролем любых побочных эффектов лечения циклофосфамидом у хомячков. Клинические показатели и вес отдельных животных регистрировали ежедневно. Мазки из зева и другие

ключевые события описаны в **таблице 18В**. Животных в группах А-І подвергали эвтаназии на 14-й день и собирали легкие для вирусологии и патологии. Животных группы J использовали для серийного компонента патологии этого исследования. Двух животных из группы J (2 самца и 2 самки) подвергали эвтаназии, начиная с 1-го дня, а затем каждый день вплоть до 6-го дня включительно.

Таблица 18В. Экспериментальная дизайн

Группа	Количество хомяков (категория боли)	Воздействие вируса (день 0)	Лечение [002]	День лечения
A	6 (3 самца, 3 самки) (D)	SARS CoV-2	Коктейль ^b 20 мг/кг	-1
B	6 (3 самца, 3 самки) (D)		Коктейль ^b 20 мг/кг	+1
C	6 (3 самца, 3 самки) (D)		Коктейль ^b 20 мг/кг	+2
D	6 (3 самца, 3 самки) (D)		Коктейль ^b 20 мг/кг	+3
E	6 (3 самца, 3 самки) (D)		Коктейль ^b 20 мг/кг	+4
F	6 (3 самца, 3 самки) (D)		Коктейль ^b 20 мг/кг	+5
G	6 (3 самца, 3 самки) (E)		Коктейль ^b 20 мг/кг	+6
H	6 (3 самца, 3 самки) (E)		Отрицат. контроль IgG	+1
I	6 (3 самца, 3 самки)(C)	Нет вируса	нет	Контроль циклофосфамид
J	24 (12 самцов, 12 самок) (E)	SARS CoV-2	нет	Нет лечения- контроль патологии ^d

78 сирийских хомяков

^a инфицирование 1000 pfu вируса в объеме 50 мкл

^b коктейль=6-63 в сочетании с 1-20 1:1 масса/объем доставляется 2,5 мл на животное в/б путем

^c отрицательный контроль 20мг/кг

^d Двое животных (2 самца и 2 самки) из группы J были подвергнуты эвтаназии по поводу патологии/вирусологии в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6

[00279] Результаты

[00280] Лечение циклофосфамидом неинфицированных животных не приводит к потере веса. Контрольные животные (контроли СУР, группа I), которых лечили СУР, но не инфицировали, со временем набирали вес.

[00281] *Отрицательное контрольное антитело c7D11 в дозе 20 мг/кг, группа Н, не защищает от потери веса, связанной с заболеванием.* Хомячки в группе Н теряли вес, начиная с 6-го дня (**ФИГ. 24А**). Потеря веса продолжалась до 10-го дня, когда она стабилизировалась. В последний день эксперимента (день 14) вес животных все еще был ниже 10% от их исходного веса.

[00282] *Коктейль, введенный за день до воздействия, защищал от потери веса.* Хомячки в группе А сохранили свой вес и остались в пределах 1% от исходного веса (**ФИГ. 24А**). Это подтвердило, что обработка нейтрализующими антителами перед воздействием была достаточной для защиты от значительной потери веса.

[00283] *Постэкспозиционное лечение модели COVID19 хомяка СУР вызывает различные эффекты/характеристики потери веса.* Однократное лечение коктейлем, содержащим 1-20 и 6-63 в конечной дозе 20 мг/кг, проводилось в дни 1 (В), 2 (С), 3 (D), 4 (Е), 5 (F) и 6 (G). Процентное изменение веса по отношению к дню 0 показано на **ФИГ. 24А**. Стрелки и пунктирные вертикальные линии указывают день лечения, специфичный для сравниваемой схемы лечения. Те же самые данные вместе показаны на **ФИГ. 24В**. Обращается внимание на то, что в группе В (день 1) было двое животных, которые нетипично сбросили вес во время эксперимента, и одно животное умерло на 12 день. Это животное имело некротическое/кровотокающее яичко из-за явного перекрута и было исключено из анализа. Для второго животного не было выявлено определяемой причины, поэтому животное не было исключено из анализа. Статистический анализ был проведен для сравнения контрольного антитела СУР (группа I) и отрицательного контроля (c7d11, группа Н) со всеми другими группами. Определяли значимость между группами в отдельные моменты времени и различия в площади под кривой (АОС). Результаты обработки коктейлем через день после воздействия (группа В) были искажены из-за выбраковки животного. Не было значительных различий в АОС между группой В и группой Н, что свидетельствует об отсутствии защиты; однако также не было существенной разницы в АОС между группой А и группой I, что указывает на то, что потеря веса в группе В существенно не отличалась от контрольной группы СУР, которая не подвергалась воздействию. Лечение коктейлем через два дня после воздействия (группа С) явно защищало. Существовали значительные различия в АОС между группой С и группой Н; и отсутствие существенной разницы в АОС между группой С и группой I. Лечение через три дня (3-й день, группа D) не приводило к существенной разнице в АОС между группами D и Н. Однако лечение на 4-й или 5-й день после воздействия (группы Е и F соответственно) значительно снижало АОС по сравнению с группой Н. Лечение на 6-й день (группа G) было сходным с лечением на 3-й день, где не было существенной разницы в АОС между группами G и Н. Несмотря на отсутствие значимости АОС для группы лечения на 6-й день, потеря массы тела в последние три временных точки была значительно меньше, чем в группе отрицательного контроля. Интересно, что в группах, которым вводили антитело на 3, 4, 5 или 6 день, начиналась прибавка в весе, начиная с 9 дня, в то время как у животных,

получавших отрицательное контрольное антитело, этого не происходило. Это говорит о том, что лечение коктейлем было эффективным даже через 6 дней после воздействия.

[00284] *Инфекционный вирус в легких (день 14/15).* У хомяков дикого типа вирус обычно исчезает к 7-му дню. Однако в модели с циклофосфамидом вирус не подавляется, если не проводится вмешательство (например, введение защитных антител) или циклофосфамид не прекращается, чтобы обеспечить иммунный ответ и клиренс. Здесь наши контроли демонстрируют, что неэкспонированные хомяки были отрицательными для вируса (Сур Cont), тогда как все хомяки, подвергшиеся воздействию вируса и обработанные нецелевым моноклональным антителом (Neg Cont), имели более 10000 pfu вируса на грамм легочной ткани. Большинство хомяков, получавших коктейль за день до или через день после воздействия вируса, имели обнаруживаемые уровни вируса в образцах легких, собранных на 14-й день (группы А и В). Однако почти у всех хомяков, которым вводили антитела в течение ≥ 2 дней после заражения, уровни антител в легких оставались неопределяемыми. В группах, получавших лечение на 2-й, 3-й, 4-й и 6-й день, было только одно животное-исключение. У всех хомяков, которых лечили на 5-й день, легкие были свободны от инфекционного вируса. См. **ФИГ. 24С.**

[00285] *Последовательное взятие образцов.* У хомяков с подавленным иммунитетом и подвергшихся воздействию вируса в день 0 брали образцы в течение длительного времени для мониторинга инфекции. Инфекционный вирус был обнаружен в легких 3 из 4 хомяков в 1-й день. Затем уровни инфекционного вируса увеличились более чем на 4 log ко 2-му дню. Затем уровни вируса выровнялись и оставались на уровне 7-9 log₁₀ в течение последней временной точки отбора проб (6-й день), проанализированной на текущий момент. Таким образом, животные, которым вводили коктейль после 1-го дня, вероятно, имели очень высокие уровни инфекционного вируса в легких до лечения антителом. См. **ФИГ. 24D.**

[00286] *Заключение*

[00287] Данные демонстрируют, что при введении на или до дня 2 относительно воздействия вируса комбинация антитела и нанотела в дозе 20 мг/кг была достаточной для обеспечения убедительного положительного эффекта, определяемого анализируемыми параметрами заболевания. При лечении после 2-го дня у животных все еще наблюдалась потеря веса, но восстановление происходило примерно через 4 дня. Через две недели после контакта с вирусом в легких хомяков, получавших антитела на ранней стадии (день -1 или 1), было обнаружено более инфекционный вирус, чем на 2-й день или позже. Лечение облученных животных на 2-й день (или позже) проводилось в то время, когда вирусная нагрузка в легких была уже заметно высокой. СУР сам по себе не вызывает потери веса или клинических признаков заболевания.

[00288] **Пример 12. Иммунитет, обеспечиваемый антителами к SARS-CoV-2 и ACE2**

[00289] Антитела, описанные в примерах 4-6, используют для придания иммунитета субъекту. Субъекта пассивно иммунизируют антителом к SARS-CoV-2 или ACE2. Затем

субъект подвергается воздействию SARS-CoV-2 после иммунизации антителом к SARS-CoV-2 или ACE2. Воздействие может быть в течение нескольких дней или в течение нескольких месяцев. Субъект также может получить антитела к SARS-CoV-2 или ACE2 сразу после контакта с SARS-CoV-2. Хотя субъект подвергается воздействию SARS-CoV-2, у субъекта вырабатывается иммунитет против SARS-CoV-2, и инфекция предотвращается.

[00290] Пример 13. Последовательности

[00291] В таблицах 19-25 показаны примеры последовательностей для CDRH1-H3 и CDRL1-L3, а также варианты тяжелых цепей и варианты легких цепей для вариантов SARS-CoV-2 и ACE2.

Таблица 19. CDR варибельной области тяжелой цепи SARS-CoV-2 S1

Вариант	SEQ ID NO	CDRH1	SEQ ID NO	CDRH2	SEQ ID NO	CDRH3
1-1	1	FTFSSHAMY	37	SAISGSAGSTYY A	73	CAHDTKDFWSGYCIFDP W
1-2	2	FTFSSQAMS	38	SAISGSGGGTYY A	74	CAKDRRFGEFDPW
1-3	3	FTFSSQAMS	39	SAISGSGGGTYY A	75	CAKDRRFGEFDPW
1-4	4	FTFSSQAMS	40	SAISGSGGGTYY A	76	CAKDRRFGEFDPW
1-5	5	FTFSSQAMS	41	SAISGSGGGTYY A	77	CAKDRRFGEFDPW
1-6	6	FTFSSQAMS	42	SAISGSGGGTYY A	78	CAKDRRFGEFDPW
1-7	7	FTFSSYDMS	43	SVISGSGGSTYY A	79	CAKGPLVGWYFDLW
1-8	8	FTFSSYDMS	44	SVISGSGGSTYY A	80	CAKGPLVGWYFDLW
1-9	9	FTFSSYDMS	45	SVISGSGGSTYY A	81	CAKGPLVGWYFDLW
1-10	10	FTFSSYDMS	46	SVISGSGGSTYY A	82	CAKGPLVGWYFDLW
1-11	11	ITFSSYAMS	47	SGISGSGGSTYY A	83	CAKHGSGTIFGVVIAK YYFDYC
1-12	12	ITFSSYAMS	48	SGISGSGGSTYY A	84	CAKHGSGTIFGVVIAKY Y FDYW
1-13	13	VTFSSYAMS	49	SAITGSGGSTYY A	85	CAKHGSGTIFGVVIAKY Y FDYW

1-14	14	ITFSSYAMS	50	SGISGSGGSTYYY A	86	CANHGSGTIFGVVIAKY YF DYW
1-15	15	FTFSSHAMY	51	SAISGSAGSTYYY A	87	CARDTKDFWSGYSIFDP W
1-16	16	FTFSSYAMY	52	SAISGSAGSTYYY A	88	CARDTNDFW
1-17	17	FTFSSYAMY	53	SAISGSAGSTYYY A	89	CARDTNDFWSGYSIFDP W
1-18	18	FTFSSYAMY	54	SAISGSAGSTYYY A	90	CARDTNDFWSGYSIFDP W
1-19	19	FTFTSYAMY	55	SAISGSAGSTYYY A	91	CARDTNDFWSGYSIFDP W
1-20	20	FTFSSYAMY	56	SAISGSAGSTYYY A	92	CARDTNDFWSGYSIFHP W
1-21	21	FTFSSYTMS	57	SIISGSGGSTYYA	93	CAREGYRDYLWYFDLW
1-22	22	FTFSSYAMN	58	SIISGSGGSTYYA	94	CAREGYRDYLWYFDLW
1-23	23	FTFSSYAIS	59	SIISGSGGSTYYA	95	CAREGYRDYLWYFDLW
1-24	24	FTFSSYAMN	60	SIISGSGGSTYYA	96	CAREGYRDYLWYFDLW
1-25	25	FTFSDYAMN	61	SIISGSGGSTYYA	97	CAREGYRDYLWYFDLW
1-26	26	FTFSSYAIS	62	SAISGSGYSTYYY A	98	CARGAPDSSGYFQGEV Y FDYW
1-27	27	FTFSSYAMT	63	SAISGSGGGTYYY A	99	CASSSSWQFDYW
1-28	28	FTFSSYGMS	64	SAISGSGGGTYYY A	100	CASSSSWQFDYW
1-29	29	FTFSSYAMT	65	SAISGSGGGTYYY A	101	CASSSSWQFDYW
1-30	30	FTFSSYAMT	66	SAISGSGGSTFYA	102	CTRPPYGDYGDYW
1-31	31	FTFSSYAMN	67	SAISGSGGSTFYA	103	CTRPPYGDYGDYW
1-32	32	FTFSSYAMY	68	SAISGSGGSTFYA	104	CTRPPYGDYGDYW
1-33	33	FTFSSYAMI	69	SAISGSGGSTFYA	105	CTRPPYGDYGDYW
1-34	34	FTFSSYAMY	70	SAISSGGSTYYA	106	CTRPPYGDYGDYW
1-35	35	FTFSNYAMS	71	SDISGSGGSTYYY A	107	CVKGTIPIFGVIRSAFDY W
1-36	36	LTSSYAMS	72	SDISGSGGSTYYY A	108	CVKGTIPIFGVIRSAFDY W

Таблица 20. CDR варибельной легкой цепи SARS-CoV-2 S1

Вариант	SEQ ID NO	CDRL1	SEQ ID NO	CDRL2	SEQ ID NO	CDRL3
1-1	109	TGTSSDIGSYNLVS	145	EGTKRPS	181	CCSYAGSRTYVF
1-2	110	TGTSSGVGSYNLVS	146	EGIKRPS	182	CCSYAGSSSFVVF
1-3	111	TGISSDVGSYNLVS	147	EGTKRPS	183	CCSYAGSSSFVVF

1-4	112	TGTSSDVGTYNLVS	148	EGSQRPS	184	CCSYAGSSSFVVF
1-5	113	TGTSSGVGSYNLVS	149	EASKRPS	185	CCSYAGSYTFAVF
1-6	114	TGTSSGVGSYNLVS	150	EGIKRPS	186	CCSYAGSSSFVVF
1-7	115	TGTSSDFGSYNLVS	151	EGNKRPS	187	CCSYAGSSTFVVF
1-8	116	TGTSNDVGSYNLVS	152	EGSKRPS	188	CCSYAGSRYVVF
1-9	117	TGTSSDVGTYNLVS	153	EGSNRPS	189	CCSYAGSSSFVVF
1-10	118	TGTSSNVGSYNLVS	154	EGTKRPS	190	CCSYAGSSSFVVF
1-11	119	TGTSSDVGHYNLVS	155	EGTKRPS	191	CCSYAGSSSFVVF
1-12	120	TGTSSDVGHYNLVS	156	EGTKRPS	192	CCSYAGSSSFVVF
1-13	121	TGTSSDVGRYNLVS	157	EGGKRPS	193	CCSYASSSTLVF
1-14	122	TGTSSDVGHYNLVS	158	EGTKRPS	194	CCSYAGSSSFVVF
1-15	123	TGTSSDIGSYNLVS	159	EGTNRPS	195	CCSYAGSRTYVF
1-16	124	TGTSSDIGSYNLVS	160	EGTKRPS	196	CCSYAGSRTYVF
1-17	125	TGTSSDIGSYNLVS	161	EGTKRPS	197	CCSYAGSRTYVF
1-18	126	TGTSSDIGSYNLVS	162	EGTKRPS	198	CCSYAGSRTYVF
1-19	127	TGTSSDIGSYNLVS	163	EGTKRPS	199	CCSYAGSRTYVF
1-20	128	TGTSSDIGSYNLVS	164	EGTKRPS	200	CCSYAGSRTYVF
1-21	129	TGTSSDVGSNNLVS	165	EGNKRPS	201	CCSYAGSVVF
1-22	130	TGTSTDVGSYNLVS	166	EGSQRPS	202	CCSYAGSSTVF
1-23	131	TGTSNDVGSYNLVS	167	EGNKRPS	203	CCSYAGSYTVF
1-24	132	TGTSSDVGYYNLVS	168	EGNKRPS	204	CCSYAGGSVVF
1-25	133	SGTSSDVGSYNLVS	169	EASKRPS	205	CCSYAGSSTVF
1-26	134	TGTSSDVGYYNLVS	170	EGTKRPS	206	CCSFVRSSAHVVF
1-27	135	TGTSSYVGHYNLVS	171	EGSRRPS	207	CCSYAGSYTHYVF
1-28	136	TGTSSGVGSYNLVS	172	EGSQRPS	208	CCSYAGSSTHYVF
1-29	137	TGTSSYVGHYNLVS	173	EGSRRPS	209	CCSYAGSYTHYVF
1-30	138	TGTSRDVGSYNLVS	174	EGTKRPS	210	CCSYAGSRTPVVF
1-31	139	TGTSSDVGKYNLVS	175	EGSQRPS	211	CCSYAGSRTPVVF
1-32	140	TGTSSDVGYYNLVS	176	EGNKRPS	212	CCSYAGSSTFPVVF
1-33	141	TGTSSDVGSYNLLS	177	EASKRPS	213	CCSYAGSRTPVVF
1-34	142	TGTSSDVGYYNLVS	178	EASKRPS	214	CCSYAGSYIPVVF
1-35	143	TGTSSDVGSYSLVS	179	EGTKRPS	215	CCSYAGSYSYVVF
1-36	144	TGTSSDVGSYSLVS	180	EGDKRPS	216	CCSYAGSYSYVVF

Таблица 21. CDR варибельной области тяжелой цепи SARS-CoV-2 S1

Название	SEQ ID NO	CDRH1	SEQ ID NO	CDRH2	SEQ ID NO	CDRH3
1-21	217	FTFSSYTM S	283	SIISGSGGSTYY A	349	CAREGYRDYLWYFDL W
1-22	218	FTFSSYA MN	284	SIISGSGGSTYY A	350	CAREGYRDYLWYFDL W

1-30	219	FTFSSYA MT	285	SAISGSGGSTF YA	351	CTRPPYGDYGDYW
1-35	220	FTFSNYA MS	286	SDISGSGGSTY YA	352	CVKGTIPIFGVIRSAFD YW
1-17	221	FTFSSYA MY	287	SAISGSAGSTY YA	353	CARDTNDFWSGYSIFD PW
1-27	222	FTFSSYA MT	288	SAISGSGGGTY YA	354	CASSSSWQFDYW
1-12	223	ITFSSYAM S	289	SGISGSGGSTY YA	355	CAKHGSGTIFGVVIAK YY FDYW
1-2	224	FTFSSQA MS	290	SAISGSGGGTY YA	356	CAKDRRFGEFDPW
1-3	225	FTFSSQA MS	291	SAISGSGGGTY YA	357	CAKDRRFGEFDPW
1-23	226	FTFSSYAI S	292	SIISGSGGSTYY A	358	CAREGYRDYLWYFDL W
1-7	227	FTFSSYD MS	293	SVISGSGGSTY YA	359	CAKGPLVGWYFDLW
1-31	228	FTFSSYA MN	294	SAISGSGGSTF YA	360	CTRPPYGDYGDYW
1-4	229	FTFSSQA MS	295	SAISGSGGGTY YA	361	CAKDRRFGEFDPW
1-8	230	FTFSSYD MS	296	SVISGSGGSTY YA	362	CAKGPLVGWYFDLW
1-9	231	FTFSSYD MS	297	SVISGSGGSTY YA	363	CAKGPLVGWYFDLW
1-32	232	FTFSSYA MY	298	SAISGSGGSTF YA	364	CTRPPYGDYGDYW
1-33	233	FTFSSYA MI	299	SAISGSGGSTF YA	365	CTRPPYGDYGDYW
1-24	234	FTFSSYA MN	300	SIISGSGGSTYY A	366	CAREGYRDYLWYFDL W
1-40	235	FTFSSYA MY	301	SAISGSAGSTY YA	367	CARDTNDFWSGYSIFD PW
1-5	236	FTFSSQA MS	302	SAISGSGGGTY YA	368	CAKDRRFGEFDPW
1-28	237	FTFSSYG MS	303	SAISGSGGGTY YA	369	CASSSSWQFDYW
1-10	238	FTFSSYD MS	304	SVISGSGGSTY YA	370	CAKGPLVGWYFDLW
1-26	239	FTFSSYAI S	305	SAISGSGYSTY YA	371	CARGAPDSSGYFQGE VY FDYW

1-42	240	VTFSSYA MS	306	SAITGSGGSTY YA	372	CAKHGSGTIFGVVIAK YY FDYW
1-13	241	FTFSSHA MS	307	SAISGSAGSTY YA	373	CARDTKDFWSGYCIFD PW
1-14	242	FTFTSYA MS	308	SAISGSGGSTY YA	374	CANDTNDFWFGYWIF DPW
1-6	243	FTFSSQA MS	309	TAISGSGGGTY YA	375	CAKDTIFGEFY PW
1-20	244	ITFSSYAM S	310	SGISGSGGSTY YA	376	CANHGSGTIFGVVIAK YY FDYW
1-47	245	FTFSSQA MS	311	SAISGSGGGTY YA	377	CAKDRRFGEFDPW
1-29	246	FTFSSYA MY	312	SAISGSAGSTY YA	378	CARDTNDFWSGYSIFD PW
1-1	247	FTFSSHA MY	313	SAISGSAGSTY YA	379	CARDTKDFWSGYSIFD PW
1-19	248	ITFSSYAM S	314	SGISGSGGSTY YA	380	CAKHGSGTIFGVVIAK YY FDYC
1-16	249	LTFSSYA MS	315	SDISGSGGSTY YA	381	CVKGTIPIFGVIRSAFD YW
1-34	250	FTFSSYA MT	316	SAISGSGGGTY YA	382	CASSSSWQFDYW
1-48	251	FTFSSHA MY	317	SAISGSAGSTY YA	383	CAHDTKDFWSGYCIFD PW
1-49	252	FTFSSYA MY	318	SAISGSAGSTY YA	384	CARDTNDFW
1-18	253	FTFSSHA MS	319	SAISGSAGSTY YA	385	CAHDTKDFWSGYCIFD PW
1-11	254	FTFSSYD MS	320	SAISGSGGTTY YA	386	CARGPLDFW
1-25	255	FTFTSYA MY	321	SAISGSAGSTY YA	387	CARDTNDFWSGYSIFD PW
1-36	256	FTFSDYA MN	322	SIISGSGGSTYY A	388	CAREGYRDYLWYFDL W
1-15	257	ITFSSHAM S	323	SGISGSGGSTY YA	389	CAKHGSGTIFGVVIAK YY FDYW
1-51	258	FTFSSYA MS	324	SVISGSGGSTY YA	390	CAREGYRDYLWYFDL W
1-52	259	FTFSNYA MS	325	SAISGSAGSTY YA	391	CARVRQGLRRTWYYF DYW

1-53	260	FTFSSYTM S	326	SVISGSGGSTY YA	392	CAREGYRDYLWYFDL W
1-54	261	FTFSSYA MY	327	SAISGSAGSTY YA	393	CARDTNDFWSGYSIFD PW
1-55	262	FTFSSYA MA	328	SAISGSGSSTY YA	394	CASSSSWQFDYW
1-56	263	FTFSSYA MY	329	SAISGSAGSTY YA	395	CARDTNDFWSGYSIFD PW
1-57	264	FTFSSYA MT	330	SAISGSGGSTF YA	396	CTRPPYGDYGDYW
1-58	265	FTFSSYA MG	331	SAISTSGGSTY YA	397	CAKGLWFGGGGFDPW
1-59	266	FTFSSYA MN	332	SVISGSGGSTY YA	398	CAREGYRDYLWYFDL W
1-6	267	FTFSSYA MY	333	SAISSSGGSTY YA	399	CTRPPYGDYGDYW
1-61	268	FTFSSYAV S	334	SDISGSGGSTY YA	400	CVKGTIPIFGVIRSAFD YW
1-62	269	FRFSSYA MS	335	SAISGSGGTTY YA	401	CAKDFHGIAAAGIDY W
1-63	270	FMFSSYA MS	336	SAISGSGGSTY YT	402	CAKDGASGWPNWHF DLW
1-64	271	FAFSSYA MS	337	SAISGSGGDTY YA	403	CAHSRDSSSWYVDYW
1-37	272	FTFTSYA MN	338	TAISGSGGSTF YA	404	CTRPPYGDYGDYW
1-38	273	ITFSSYAM S	339	SGISGSGGSTY YA	405	CAKHGSGTIFGVVIAK YY FDYW
1-39	274	FTFSSYA MY	340	TAISGSGGSTF YA	406	CTRPPYGYGDYW
1-41	275	FTFSSYD MS	341	SVISGSGGSTY YA	407	CAKGPLVGWYFDLW
1-43	276	FTFSSQA MS	342	TAISGSGGGTY YA	408	CAKDTIFGEFYPW
1-44	277	FTFSSQA MS	343	TAISGSGGGTY YA	409	CAKDRKFGEFDPW
1-45	278	FTFSSYA MS	344	SIISGSAGSTYY A	410	CARDGYKYCLW
1-46	279	FTFTSYA MS	345	SAISGSGGSTY YA	411	CANDTSDFCFGYWIFD PW
1-50	280	FTFSSYD MS	346	SAISGSGGTTY YA	412	CARGPLDFW
1-65	281	FTFSSHA MS	347	SAISGSAGSTY YA	413	CARDTKDFWSGYCIFD PW

1-66	282	FTFTSYA MS	348	SAISGSGGSTY YA	414	CANDTNDFWFGYWIF DPW
------	-----	---------------	-----	-------------------	-----	------------------------

Таблица 22. CDR варибельной легкой цепи SARS-CoV-2 S1

Название	SE Q ID NO	CDRL1	SE Q ID NO	CDRL2	SE Q ID NO	CDRL3
1-21	415	TGTSSDVGSNNLV S	474	EGNKRP S	533	CCSYAGSVVF
1-22	416	TGTSTDVGSYNLV S	475	EGSQRPS	534	CCSYAGSSTVF
1-30	417	TGTSRDVGSYNLV S	476	EGTKRP S	535	CCSYAGSRTPVVF
1-35	418	TGTSSDVGSYSLV S	477	EGTKRP S	536	CCSYAGSYSYVVF
1-17	419	TGTSSDIGSYNLVS	478	EGTKRP S	537	CCSYAGSRTYVF
1-27	420	TGTSSYVGHYNLV S	479	EGSRRPS	538	CCSYAGSYTHYVF
1-12	421	TGTSSDVGHYNLV S	480	EGTKRP S	539	CCSYAGSSSFVVF
1-2	422	TGTSSGVGSYNLV S	481	EGIKRPS	540	CCSYAGSSSFVVF
1-3	423	TGISSDVGSYNLV S	482	EGTKRP S	541	CCSYAGSSSFVVF
1-23	424	TGTSNDVGSYNLV S	483	EGNKRP S	542	CCSYAGSYTVF
1-7	425	TGTSSDFGSYNLV S	484	EGNKRP S	543	CCSYAGSSTFVVF
1-31	426	TGTSSDVGKYNLV S	485	EGSQRPS	544	CCSYAGSRTPVVF
1-4	427	TGTSSDVGTYNLV S	486	EGSQRPS	545	CCSYAGSSSFVVF
1-8	428	TGTSNDVGSYNLV S	487	EGSKRPS	546	CCSYAGSRYVVF
1-9	429	TGTSSDVGDYNLV S	488	EGSNRPS	547	CCSYAGSSSFVVF
1-32	430	TGTSSDVGGYNLV S	489	EGNKRP S	548	CCSYAGSSTFPVVF
1-33	431	TGTSSDVGSYNLL S	490	EASKRPS	549	CCSYAGSRTPVVF
1-24	432	TGTSSDVGYYNLV S	491	EGNKRP S	550	CCSYAGGSVVF
1-5	433	TGTSSGVGSYNLV S	492	EASKRPS	551	CCSYAGSYTFAVF

1-28	434	TGTSSGVGSYNLV S	493	EGSQRPS	552	CCSYAGSSTHYVF
1-10	435	TGTSSNVGSYNLV S	494	EGTKRP S	553	CCSYAGSSSFVVF
1-26	436	TGTSSDVGGYNLV S	495	EGTKRP S	554	CCSFVRSSAHVVF
1-42	437	TGTSSDVGRYNLV S	496	EGGKRP S	555	CCSYASSSTLVF
1-20	438	TGTSSDVGHYNLV S	497	EGTKRP S	556	CCSYAGSSSFVVF
1-47	439	TGTSSGVGSYNLV S	498	EGIKRPS	557	CCSYAGSSSFVVF
1-29	440	TGTSSDIGSYNLVS	499	EGTKRP S	558	CCSYAGSRITYVF
1-1	441	TGTSSDIGSYNLVS	500	EGTNRP S	559	CCSYAGSRITYVF
1-19	442	TGTSSDVGHYNLV S	501	EGTKRP S	560	CCSYAGSSSFVVF
1-16	443	TGTSSDVGSYSLV S	502	EGDKRP S	561	CCSYAGSYSYVVF
1-34	444	TGTSSYVGHYNLV S	503	EGSRRPS	562	CCSYAGSYTHYVF
1-48	445	TGTSSDIGSYNLVS	504	EGTKRP S	563	CCSYAGSRITYVF
1-49	446	TGTSSDIGSYNLVS	505	EGTKRP S	564	CCSYAGSRITYVF
1-25	447	TGTSSDIGSYNLVS	506	EGTKRP S	565	CCSYAGSRITYVF
1-36	448	SGTSSDVGSYNLV S	507	EASKRPS	566	CCSYAGSSTVF
1-51	449	TGTSSDVGSYDLV S	508	EGNKRP S	567	CCSYAGSSVVF
1-52	450	TGTSSDVGSSNLV S	509	EGSKRPS	568	CCSYAGSLYVF
1-53	451	TGTSTDVGSYNLV S	510	EGTKRP S	569	CCSYAGSYTSVVF
1-54	452	TGTSSDIGSYNLVS	511	EGTKRP S	570	CCYHSRTRTHVF
1-55	453	TGTSSDLGSYNIVS	512	EGSRRPS	571	CCSYAGSYTHYVF
1-56	454	TGTSSDIGSYNLVS	513	EGTKRP S	572	CCYHSRTRTHVS
1-57	455	TGTSSDVGKYNLV S	514	EGVKRP S	573	CCSYAGSRTPVVF
1-58	456	TGTRSDVGSYNLV S	515	EVSKRPS	574	CCSYAGDSFPYVF

1-59	457	TGTSSDVGSFNLV S	516	EVSKRPS	575	CCSYAGSSVVF
1-6	458	TGTSSDVGGYNLV S	517	EASKRPS	576	CCSYAGSYIPVVF
1-61	459	TGTSSDVGSYSLV S	518	EGGKRP S	577	CCSYAGSYSYVVF
1-62	460	TGTSSDVGSHNLV S	519	EGGKRP S	578	CCSYSGRYTYVF
1-63	461	TGTSSDVGSYYLV S	520	EGDKRP S	579	CCSHAGRYPYVF
1-64	462	TGTSSGVGSYNLV S	521	AGSKRP S	580	CCSYLGSGTFDVL F
1-37	463	TGTSSDIGSYNLVS	522	EGTKRP S	581	CCSYAGSRITYVF
1-38	464	TGTSSDIGSYNLVS	523	EGTKRP S	582	CCSYAGSRITYVF
1-39	465	TGTSSDIGSYNLVS	524	EGTKRP S	583	CCSYAGSRITYVF
1-41	466	TGTSSDIGSYNLVS	525	EGTKRP S	584	CCSYAGSRITYVF
1-43	467	TGTSSDIGSYNLVS	526	EGTKRP S	585	CCSYAGSRITYVF
1-44	468	TGTSSDIGSYNLVS	527	EGTKRP S	586	CCSYAGSRITYVF
1-45	469	TGTSSDIGSYNLVS	528	EGTKRP S	587	CCSYAGSRITYVF
1-46	470	TGTSSDIGSYNLVS	529	EGTKRP S	588	CCSYAGSRITYVF
1-50	471	TGTSSDIGSYNLVS	530	EGTKRP S	589	CCSYAGSRITYVF
1-65	472	TGTSSDIGSYNLVS	531	EGTKRP S	590	CCSYAGSRITYVF
1-66	473	TGTSSDIGSYNLVS	532	EGTKRP S	591	CCSYAGSRITYVF

Таблица 23. Последовательности вариантов SARS-CoV-2 с вариательной тяжелой цепью

Название	SEQ ID	Аминокислотная последовательность
1-21	592	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAP GKGLEWVSIISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLYWYFDLWGQGTLVTVSS
1-22	593	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWRQAP GKGLEWVSIISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLYWYFDLWGQGTLVTVSS

1-30	594	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-35	595	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYAMSWVRQAP GKGLEWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVKGTIPFGVIRSAFDYWGQGTLVTVSS
1-17	596	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGTLVTVSS
1-27	597	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASSSSWQFDYWGQGTLVTVSS
1-12	598	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKHGSGTIFGVVIKYYFDYWGQGTLVT VSS
1-2	599	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-3	600	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-23	601	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAISWVRQAPG KGLEWVSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREGYRDYLDYFDLWGQGTLVTVSS
1-7	602	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLVTVSS
1-31	603	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-4	604	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-8	605	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLVTVSS
1-9	606	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLVTVSS
1-32	607	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS

1-33	608	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMIWVRQAP KGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-24	609	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAP GKLEWVSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLWYFDLWGQGTLVTVSS
1-40	610	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGTLVTVSS
1-5	611	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAP GKLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-28	612	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAP GKLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASSSSWQFDYWGQGTLVTVSS
1-10	613	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAP GKLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLVTVSS
1-26	614	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSY AISWVRQAPG KGLEWVSAISGSGYSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCARGAPDSSGYFFQGEVYFDYWGQGTLV TVSS
1-42	615	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGVTFSSYAMSWVRQAP GKLEWVSAITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKHGSGTIFGVVI AKYYFDYWGQGTL VTVSS
1-13	616	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTKDFWSGYCIFDPWGQGTLVTVS S
1-14	617	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAP GKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCANDTNDFWFGYWIFDPWGQGTLVTVS S
1-6	618	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAP GKLEWVTAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDTIFGEFY PWGQGTLVTVSS
1-20	619	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGITFSSYAMSWVRQAPG KLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCANHSGTIFGVVI AKYYFDYWGQGTLVT VSS
1-47	620	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAP GKLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS

1-29	621	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGT LVTVSS
1-1	622	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSHAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTKDFWSGYSIFDPWGQGT LVTVSS
1-19	623	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGITFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKHGSGTIFGVVIAKYYFDYCGQGT LVT VSS
1-16	624	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGLTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVKGTIPFGVIRSAFDYWGQGT LVTVSS
1-34	625	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASSSSWQFDYWGQGT LVTVSS
1-48	626	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSHAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAHDTKDFWSGYCIFDPWGQGT LVTVS S
1-49	627	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWGQGT LVTVSS
1-18	628	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAHDTKDFWSGYCIFDPWGQGT LVTVS S
1-11	629	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGPLDFWGQGT LVTVSS
1-25	630	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFTSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGT LVTVSS
1-36	631	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWVRQAP GKGLEWVSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLWYFDLWGQGT LVTVSS
1-15	632	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGITFSSHAMSWVRQAPG KGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKHGSGTIFGVVIAKYYFDYWGQGT LVT VSS
1-51	633	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLWYFDLWGQGT LVTVSS
1-52	634	EVQLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ

		MNSLRAEDTAVYYCARVRQGLRRTWYYFDYWGQGTLVTVSS
1-53	635	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLWYFDLWGQGTLVTVSS
1-54	636	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGTLVTVSS
1-55	637	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMAWVRQAP GKGLEWVSAISGSGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASSSSWQFDYWGQGTLVTVSS
1-56	638	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGTLVTVSS
1-57	639	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-58	640	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMGWVRQAP GKGLEWVSAISTSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGLWFGGGGFDPWGQGTLVTVSS
1-59	641	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLWYFDLWGQGTLVTVSS
1-6	642	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-61	643	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAP GKGLEWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVKGTIPFGVIRSAFDYWGQGTLVTVSS
1-62	644	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFRFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDFHGIAAAGIDYWGQGTLVTVSS
1-63	645	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFMFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKD GASGWP NW HFDLWGQGTLVTVSS
1-64	646	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFAFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGDTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAHSRDSSSWYVDYWGQGTLVTVSS
1-37	647	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAP GKGLEWVTAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-38	648	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGITFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKHGSGTIFGVVIAKYYFDYWGQGTLVT VSS

1-39	649	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVTAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTRPPYGYYGDYWGQGTLTVSS
1-41	650	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLTVSS
1-43	651	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAP GKGLEWVTAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDTIFGEFYPWGQGTLTVSS
1-44	652	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAP GKGLEWVTAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDRKFGEFDPWGQGTLTVSS
1-45	653	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSIISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDGYKYCLWGQGTLTVSS
1-46	654	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCANDTSDFCFGYWIFDPWGQGTLTVSS
1-50	655	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGPLDFWGQGTLTVSS
1-65	656	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTKDFWSGYCIFDPWGQGTLTVS S
1-66	657	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCANDTNDFWFGYWIFDPWGQGTLTVS S

Таблица 24. Последовательности вариантов SARS-CoV-2 с варибельной легкой цепью

Название	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
1-21	658	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSNNLVSWEYQQHPG KAPKLMYEGNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSVVFGGGTKLTVL
1-22	659	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSTDVGSYNLVSWEYQQHPG KAPKLMYEGSQRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSTVFGGGTKLTVL
1-30	660	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSRDVGSYNLVSWEYQQHPG KAPKLMYEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSRTPVFGGGTKLTVL

1-35	661	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYSLVSWYQQHPG KAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSYSYVVFSGGGTKLTVL
1-17	662	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVVFSGGGTKLTVL
1-27	663	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSYVGHYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGSRRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSYTHYVVFSGGGTKLTVL
1-12	664	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGHYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVVFSGGGTKLTVL
1-2	665	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVGSYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGIKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVVFSGGGTKLTVL
1-3	666	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVVFSGGGTKLTVL
1-23	667	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNDVGSYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSYTVVFSGGGTKLTVL
1-7	668	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDFGSYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSTFVVFSGGGTKLTVL
1-31	669	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGKYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGSQRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSRTPVVFSGGGTKLTVL
1-4	670	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGSQRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVVFSGGGTKLTVL
1-8	671	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNDVGSYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSRYVVFSGGGTKLTVL
1-9	672	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG DYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVVFSGGGTKLTVL
1-32	673	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG GYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSTFPVVFSGGGTKLTVL
1-33	674	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLLSWYQQHPG KAPKLMIEASKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSRTPVVFSGGGTKLTVL
1-24	675	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGYYNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGGSVVFSGGGTKLTVL

1-5	676	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVGSYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEASKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSYTFAVFGGGTKLTVL
1-28	677	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVGSYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGSQRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSTHYVFGGGTKLTVL
1-10	678	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNVGSYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-26	679	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSFVRSSAHVFGGGTKLTVL
1-42	680	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGGKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYASSSTLVFGGGTKLTVL
1-20	681	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGHYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-47	682	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVGSYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGIKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-29	683	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWSYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-1	684	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWSYQQHPGK APKLMIEGTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-19	685	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGHYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-16	686	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYSLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGDKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSYSYVFGGGTKLTVL
1-34	687	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSYVGHYNLVSWSYQQHPG KAPKLMIEGSRRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-48	688	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWSYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-49	689	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWSYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-25	690	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWSYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL

1-36	691	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGTSSDVGSYNLVSWEYQQHPG KAPKLMIEASKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSTVFGGGTKLTVL
1-51	692	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYDLVSWYQQHPG KAPKLMIEGKRPSPGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSSVFGGGTKLTVL
1-52	693	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSLYVFGGGTKLTVL
1-53	694	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSTDVGSYNLVSWEYQQHPG KAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYAGSYTSVFGGGTKLTVL
1-54	695	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCYHSRTRTHVFGGGTKLTVL
1-55	696	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGSYNIVSWYQQHPGK APKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-56	697	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGSYNIVSWYQQHPGK APKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-57	698	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGSYNIVSWYQQHPGK APKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-58	699	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGSYNIVSWYQQHPGK APKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-59	700	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGSYNIVSWYQQHPGK APKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-6	701	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGSYNIVSWYQQHPGK APKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-61	702	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGSYNIVSWYQQHPGK APKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-62	703	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSHNLVSWYQQHPG KAPKLMIEGGKRPSPGVSNRFSgSKSGNTaslTISGLQAEDEAD YYCCSYSGRYTYVFGGGtKLTVL
1-63	704	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYYLVSWYQQHPG KAPKLMIEGDKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSHAGRYPYVFGGGTKLTVL
1-64	705	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVGSYNLVSWEYQQHPG KAPKLMIEAGSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCCSYLGSFTDVLFGGGTKLTVL

1-37	706	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-38	707	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-39	708	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-41	709	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-43	710	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-44	711	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-45	712	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-46	713	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-50	714	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-65	715	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-66	716	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHPGK APKLMIEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL

Таблица 25. Переформатированные варианты последовательностей SARS-CoV-2 S1

Название	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
1-H1	717	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLYWYFDLWGQGTLVTV SS
1-H2	718	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQA PGKGLEWVSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLYWYFDLWGQGTLVTV SS

1-H3	719	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-H4	720	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYAMSWVRQA PGKGLEWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVKGTIPFGVIRSAFDYWGQGTLVTVSS
1-H5	721	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQA PGKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGTLVTVSS
1-H6	722	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCASSSSWQFDYWGQGTLVTVSS
1-H8	723	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKHGSGTIFGVVI AKYYFDYWGQGT LTVTVSS
1-H9	724	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-H10	725	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-H11	726	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AISWVRQAP GKGLEWVSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLWYFDLWGQGTLVTVSS
1-H12	727	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLVTVSS
1-H13	728	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN WVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-H14	729	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-H16	730	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLVTVSS
1-H17	731	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLVTVSS

1-H18	732	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-H19	733	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMIWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGTLVTVSS
1-H20	734	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQA PGKGLEWVSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLWYFDLWGQGTLVTVSS
1-H23	735	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-H25	736	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCASSSSWQFDYWGQGTLVTVSS
1-H26	737	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGPLVGWYFDLWGQGTLVTVSS
1-H27	738	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAISWVRQAP GKGLEWVSAISGSGYSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGAPDSSGYFQGEVYFDYWGQGT LTVSS
1-H28	739	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVT FSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKHGSGTIFGVVI AKYYFDYWGQG TLVTVSS
1-H31	740	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQA PGKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFHPWGQGTLVT VSS
1-H36	741	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIT FSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCANHSGTIFGVVI AKYYFDYWGQG TLVTVSS
1-H37	742	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDRRFGEFDPWGQGTLVTVSS
1-H38	743	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQA PGKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGTLVT VSS
1-H39	744	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMYWVRQA PGKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL

		QMNSLRAEDTAVYYCARDTKDFWSGYSIFDPWGQGLVT VSS
1-H40	745	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKHGSGTIFGVVIAKYYFDYCGQG TLVTVSS
1-H41	746	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVKGTIPFGVIRSAFDYWGQGLVT VSS
1-H42	747	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCASSSSWQFDYWGQGLVTVSS
1-H43	748	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMYWVRQA PGKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAHDTKDFWSGYCIFDPWGQGLVT VSS
1-H44	749	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQA PGKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWGQGLVTVSS
1-H47	750	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQA PGKGLEWVSAISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRPPYGDYGDYWGQGLVTVSS
1-H48	751	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMYWVRQA PGKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDTNDFWSGYSIFDPWGQGLVT VSS
1-H49	752	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWVRQ APGKGLEWVSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLWYFDLWGQGLVT VSS
1-L1	753	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSNNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGSVVFGGGTKLTVL
1-L2	754	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSTDVGSYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGSQRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSTVFGGGTKLTVL
1-L3	755	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSRDVGSYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGSRTPVFGGGTKLTVL
1-L4	756	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYSLVSWYQQHP GKAPKLMYEGTKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSYSVVFGGGTKLTVL

1-L5	757	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHP GKAPKLMYEGTKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-L6	758	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSYVGHYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGSRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-L8	759	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGHYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGTKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L9	760	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVSYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGIKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L10	761	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGISSDVGSYNLVSWYQQHP GKAPKLMYEGTKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L11	762	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNDVGSYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGNKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGSYTVFGGGTKLTVL
1-L12	763	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDFGSYNLVSWYQQHP GKAPKLMYEGNKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSTFVFGGGTKLTVL
1-L13	764	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGKYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGSQRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTPVFGGGTKLTVL
1-L14	765	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGSQRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L16	766	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNDVGSYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGSKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRYVFGGGTKLTVL
1-L17	767	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L18	768	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGNKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGSSTFPVFGGGTKLTVL
1-L19	769	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLLSWYQQHP GKAPKLMYIEASKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTPVFGGGTKLTVL
1-L20	770	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGYYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGNKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGGSVFGGGTKLTVL
1-L23	771	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVSYNLVSWYQQH PGKAPKLMYIEASKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSYTFAVFGGGTKLTVL

1-L25	772	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVGSYNLVSWEYQQH PGKAPKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSHYVFGGGTKLTVL
1-L26	773	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNVGSYNLVSWEYQQH PGKAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L27	774	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINLVSWEYQQH PGKAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSFVRSSAHVFGGGTKLTVL
1-L28	775	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRYNLVSWEYQQH PGKAPKLMIEGGKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYASSSTLVFGGGTKLTVL
1-L31	776	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWEYQQHP GKAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-L36	777	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGHYNLVSWEYQQH PGKAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L37	778	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSGVGSYNLVSWEYQQH PGKAPKLMIEGIKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L38	779	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWEYQQHP GKAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-L39	780	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWEYQQHP GKAPKLMIEGTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-L40	781	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGHYNLVSWEYQQH PGKAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAGSSSFVFGGGTKLTVL
1-L41	782	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYSLVSWEYQQHP GKAPKLMIEGDKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSYSYVFGGGTKLTVL
1-L42	783	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSYVGHYNLVSWEYQQH PGKAPKLMIEGSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSYTHYVFGGGTKLTVL
1-L43	784	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWEYQQHP GKAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-L44	785	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWEYQQHP GKAPKLMIEGTRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-L47	786	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINLVSWEYQQH PGKAPKLMIEASKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSYIPVFGGGTKLTVL

1-L48	787	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGSYNLVSWYQQHP GKAPKLMYEGTKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSRTYVFGGGTKLTVL
1-L49	788	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGTSSDVGSYNLVSWYQQHP GKAPKLMYEASKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYAGSSTVFGGGTKLTVL
1-H51	789	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLYWYFDLWGQGLTVV SS
1-H52	790	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARVRQGLRRTWYFYFDYWGQGLTV TVSS
1-H53	791	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQA PGKGLEWVSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGYRDYLYWYFDLWGQGLTVV SS
1-L51	792	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYDLVSWYQQH PGKAPKLMYEGNKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCCSYAG-SSVVFSGGGTKLTVL
1-L52	793	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSNLVSWYQQHP GKAPKLMYEGSKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCCSYA-GSLYVFGGGTKLTVL
1-L53	794	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSTDVGSYNLVSWYQQH PGKAPKLMYEGTKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQA ZDEADYYCCSYAGSYTSVVFSGGGTKLTVL

[00292] Хотя в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены только в качестве примера. Специалистам в данной области техники будут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены без отхода от изобретения. Следует понимать, что при практическом применении изобретения могут быть использованы различные альтернативы вариантам осуществления изобретения. Предполагается, что следующая далее формула изобретения определяет объем изобретения и что ею охватываются способы и структуры в пределах объема данной формулы изобретения и их эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или фрагмент антитела, содержащие переменный домен, область тяжелой цепи (VH) и переменный домен, область легкой цепи (VL), где VH содержит определяющие комплементарности области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где VL содержит определяющие комплементарности области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена любой из SEQ ID NO: 1-36 или 217-282; (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена любой из SEQ ID NO: 37-72 или 283-348; (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена любой из SEQ ID NO: 73-108 или 349-414; (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена любой из SEQ ID NO: 109-144 или 415-473; (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена любой из SEQ ID NO: 145-180 или 415-473; и (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена любой из SEQ ID NO: 181-216 или 533-591.

2. Антитело или фрагмент антитела по п. 1, где

- (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена SEQ ID NO: 30;
- (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 66;
- (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 102;
- (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 138;
- (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 174; и
- (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 210.

3. Антитело или фрагмент антитела по п. 1, где

- (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена SEQ ID NO: 35;
- (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 71;
- (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 107;
- (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 143;
- (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 179; и
- (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 215.

4. Антитело или фрагмент антитела по п. 1, где

- (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена SEQ ID NO: 12;
- (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 48;
- (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 84;
- (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 120;
- (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 156; и
- (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 192.

5. Антитело или фрагмент антитела по п. 1, где

- (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена SEQ ID NO: 31;
- (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 67;
- (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 103;
- (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 139;
- (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 175; и

- (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 211.
6. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где
- (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена SEQ ID NO: 240;
 - (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 306;
 - (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 372;
 - (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 437;
 - (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 496; и
 - (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 555.
7. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где
- (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена SEQ ID NO: 244;
 - (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 310;
 - (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 376;
 - (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 437;
 - (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 496; и
 - (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 555.
8. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где
- (a) аминокислотная последовательность CDRH1 представлена SEQ ID NO: 270;
 - (b) аминокислотная последовательность CDRH2 представлена SEQ ID NO: 336;
 - (c) аминокислотная последовательность CDRH3 представлена SEQ ID NO: 402;
 - (d) аминокислотная последовательность CDRL1 представлена SEQ ID NO: 461;
 - (e) аминокислотная последовательность CDRL2 представлена SEQ ID NO: 520; и
 - (f) аминокислотная последовательность CDRL3 представлена SEQ ID NO: 579.
9. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где антитело или фрагмент антитела связывается с гликопротеином спайка.
10. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где антитело или фрагмент антитела связывается с рецептор-связывающим доменом гликопротеина спайка.
11. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где антитело или фрагмент антитела имеет K_D меньше чем 50 нМ.
12. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где антитело или фрагмент антитела имеет K_D меньше чем 25 нМ.
13. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где антитело или фрагмент антитела имеет K_D меньше чем 10 нМ.
14. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где антитело или фрагмент антитела имеет K_D меньше чем 5 нМ.
15. Антитело или фрагмент антитела, содержащие переменный домен, область тяжелой цепи (VH) и переменный домен, область легкой цепи (VL), где
- VH содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 592-657, и где
- VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 658-716.

16. Антитело или фрагмент антитела по п.15, где
VN содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 594, и где
VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 660.
17. Антитело или фрагмент антитела по п.15, где
VN содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 595, и где
VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 661.
18. Антитело или фрагмент антитела по п.15, где
VN содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 598, и где
VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 664.
19. Антитело или фрагмент антитела по п.15, где
VN содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 603, и где
VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 669.
20. Антитело или фрагмент антитела по п.15, где
VN содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 615, и где
VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 680.
21. Антитело или фрагмент антитела по п.15, где
VN содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 631, и где
VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 691.
22. Антитело или фрагмент антитела по п.15, где
VN содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 645, и где
VL содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 704.
23. Антитело, где антитело содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 1-716; и где антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье

антитело, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, однодоменное антитело, изолированная определяющая комплементарность область (CDR), диатело, фрагмент антитела, состоящий из единственного мономерного переменного домена, дисульфид-связанные Fv (sdFv), интратело, антиидиотипическое (анти-Id) антитело или его антигенсвязывающие фрагменты ab.

24. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая:

а) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный домен, область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 592-657;

б) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный домен, область легкой цепи (VL) по меньшей мере на около 90% идентичную последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 658-716; и эксципиент.

25. Способ лечения инфекции SARS-CoV-2, включающий введение антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-23.

26. Способ по п.25, где антитело вводят перед воздействием SARS-CoV-2.

27. Способ по п.26, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 1 неделю перед воздействием SARS-CoV-2.

28. Способ по п.26, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 1 месяц перед воздействием SARS-CoV-2.

29. Способ по п.26, где антитело вводят по меньшей мере примерно за 5 месяцев перед воздействием SARS-CoV-2.

30. Способ по п.25, где антитело вводят после воздействия SARS-CoV-2.

31. Способ по п.30, где антитело вводят самое большее примерно через 24 часа после воздействия SARS-CoV-2.

32. Способ по п.30, где антитело вводят самое большее примерно через 1 неделю после воздействия SARS-CoV-2.

33. Способ по п.30, где антитело вводят самое большее примерно через 1 месяц после воздействия SARS-CoV-2.

34. Способ лечения индивидуума с инфекцией SARS-CoV-2 антителом или фрагментом антитела по любому из пп.1-23 включающий:

(а) получая или получив образец от индивидуума;

(б) выполняя или выполнив анализ уровня экспрессии в образце для определения уровней экспрессии антител к SARS-CoV-2; и

(с) если образец имеет уровень экспрессии антител к SARS-CoV-2, то введение индивидууму антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-23, тем самым излечивая инфекцию SARS-CoV-2.

35. Способ оптимизации антитела, включающий:

(a) предоставление множества полинуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или фрагмент антитела, где антитело или фрагмент антитела получены от субъекта, имеющего SARS-CoV-2;

(b) создание библиотеки нуклеиновых кислот, содержащей множество последовательностей, которые при трансляции кодируют антитела или фрагменты антител, которые связывают белок SARS-CoV-2 или ACE2, где каждая из последовательностей содержит заданное количество вариантов CDR относительно входной последовательности, которая кодирует антитело; где библиотека содержит по меньшей мере 50000 вариантов последовательностей; и

(c) синтез по меньшей мере 50000 вариантов последовательностей.

36. Способ по п.35, где библиотека антител содержит по меньшей мере 100000 последовательностей.

37. Способ по п.35, где способ дополнительно включает обогащение подмножества вариантных последовательностей.

38. Способ по п.35, где способ дополнительно включает экспрессию антитела или фрагментов антител, соответствующих вариантным последовательностям.

39. Способ по п.35, где полинуклеотидная последовательность представляет собой последовательность мышинового, человеческого или химерного антитела.

40. Способ по п.35, где каждая последовательность из множества вариантных последовательностей содержит по меньшей мере один вариант в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности.

41. Способ по п.35, где каждая последовательность из множества вариантных последовательностей содержит по меньшей мере два варианта в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно входной последовательности.

42. Способ по п.35, где по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 5 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности.

43. Способ по п.35, где по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 25 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности.

44. Способ по п.35, где по меньшей мере одна транслируемая последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, обладающие аффинностью связывания по меньшей мере в 50 раз выше, чем аффинность связывания входной последовательности.

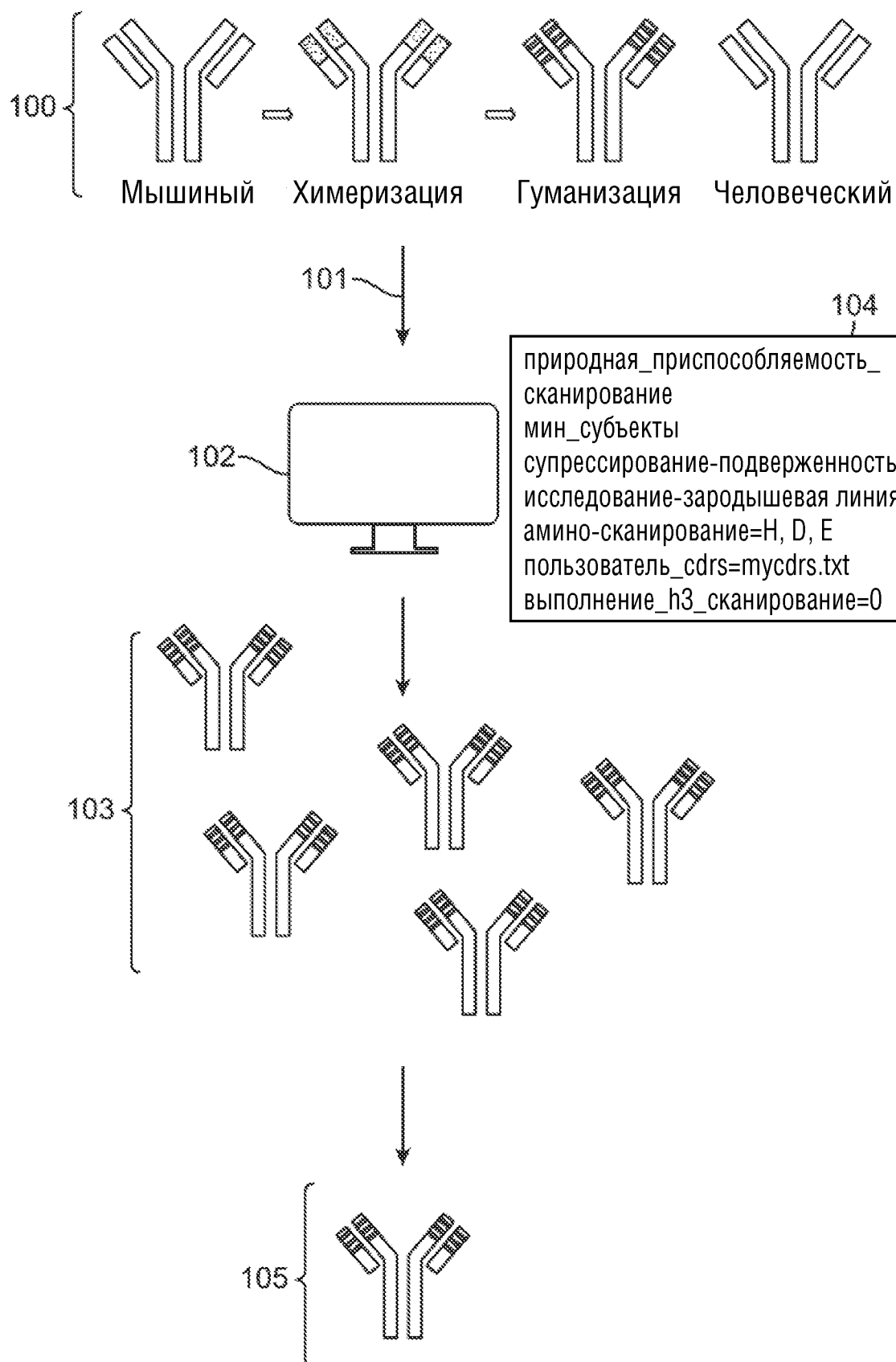
45. Способ по п.35, где каждая последовательность содержит по меньшей мере один вариант в каждой CDR тяжелой цепи или легкой цепи относительно последовательности зародышевой линии входной последовательности.

46. Способ по п.35, где библиотека нуклеиновых кислот имеет теоретическое разнообразие по меньшей мере 10^{10} последовательности.

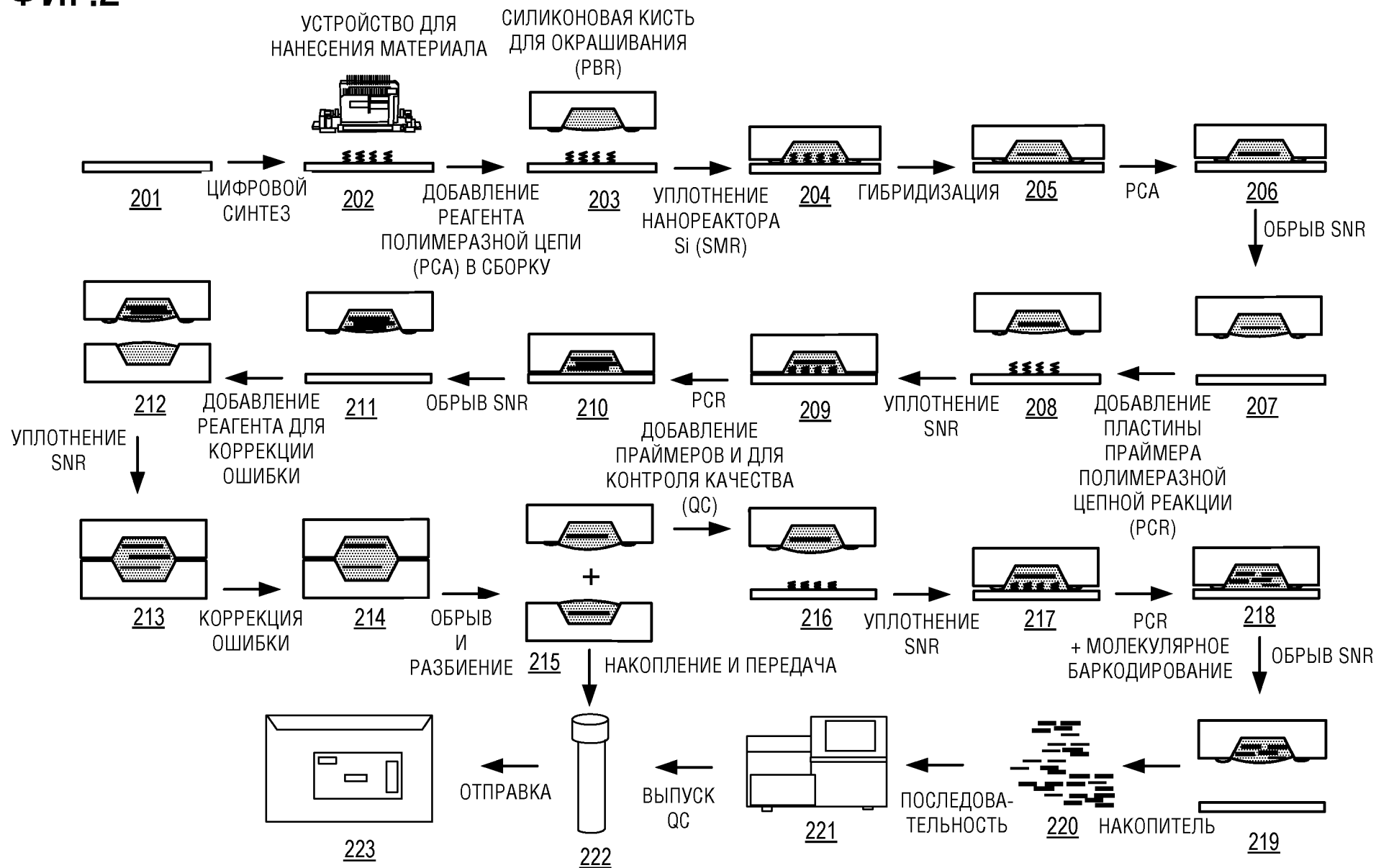
47. Способ по п.35, где библиотека нуклеиновых кислот имеет теоретическое разнообразие по меньшей мере 10^{12} последовательности.

По доверенности

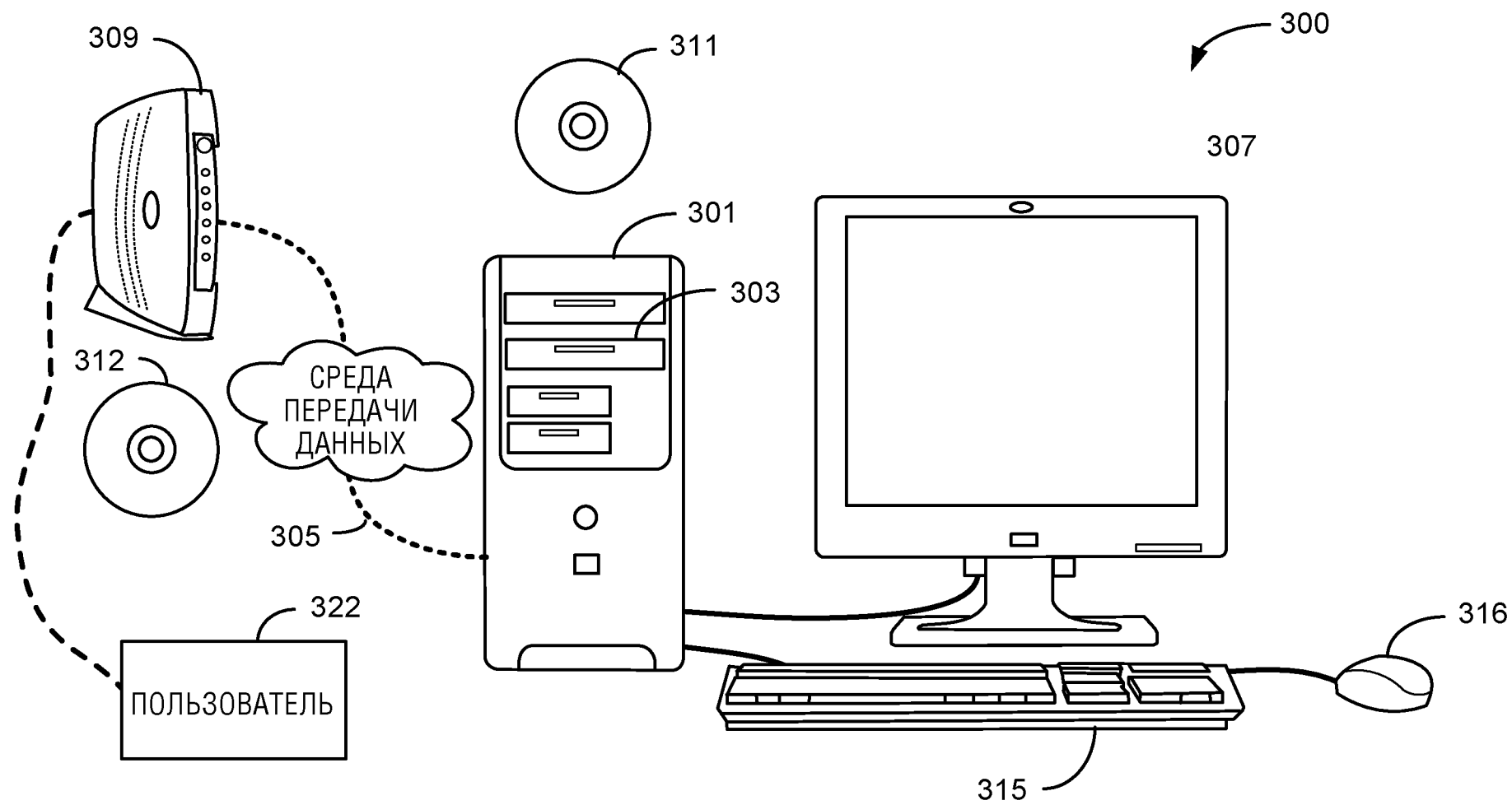
ФИГ.1



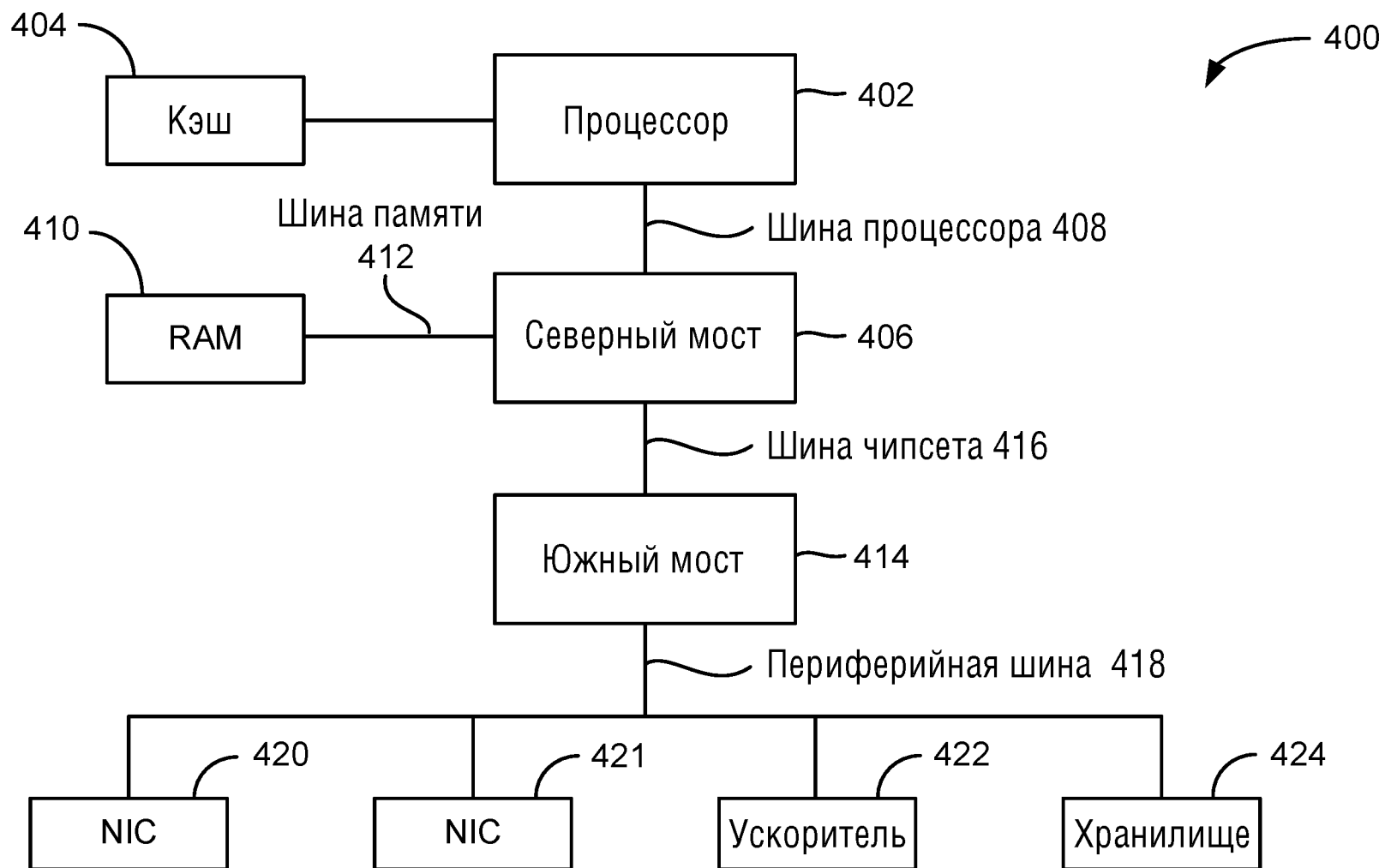
ФИГ.2



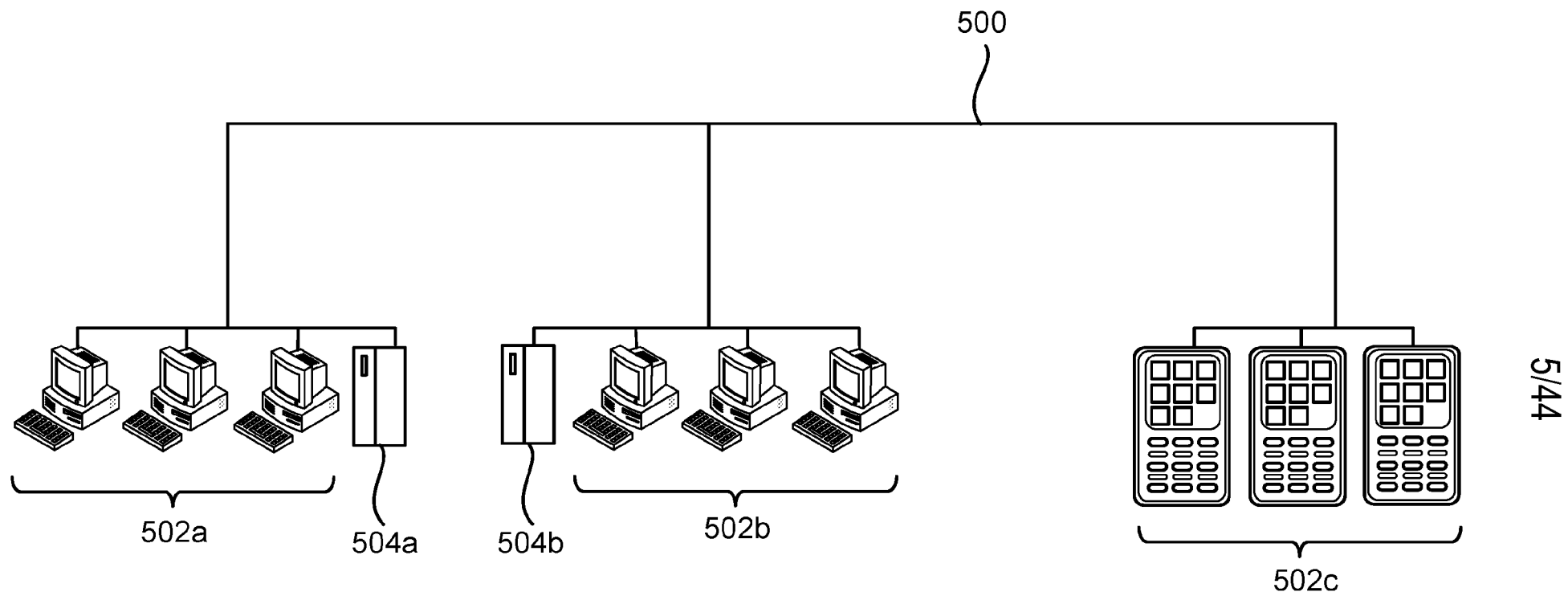
ФИГ.3



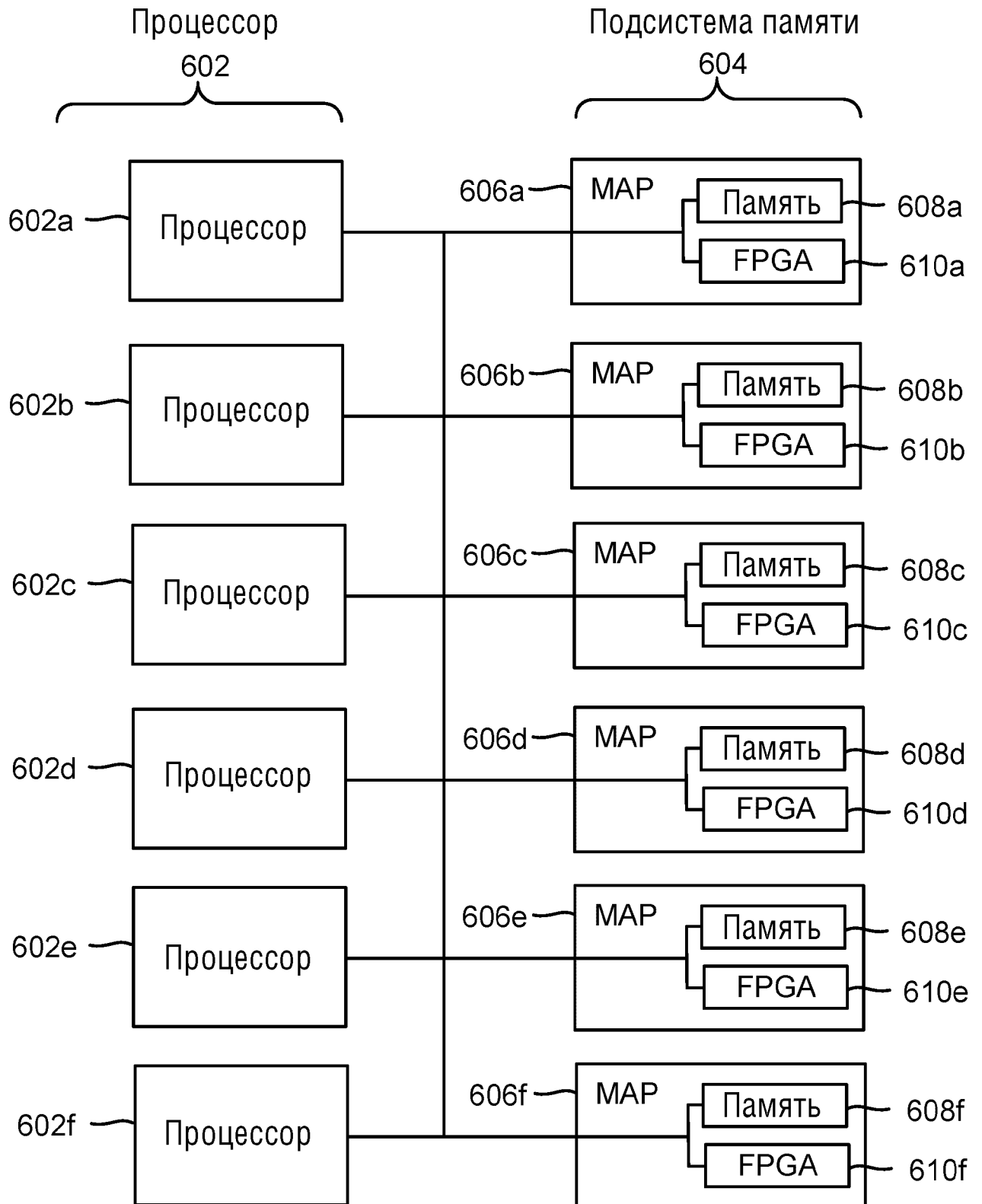
ФИГ.4



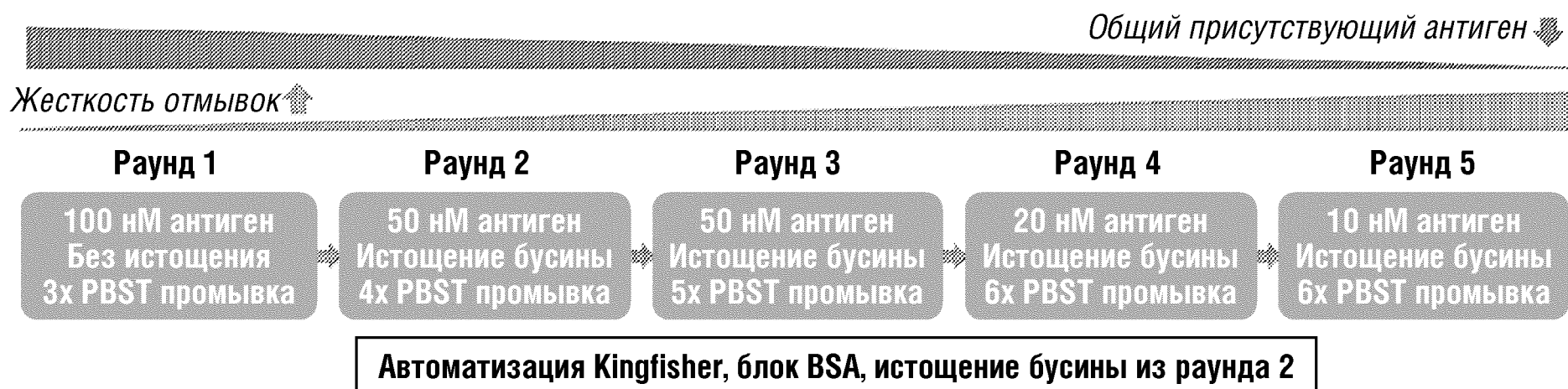
ФИГ.5



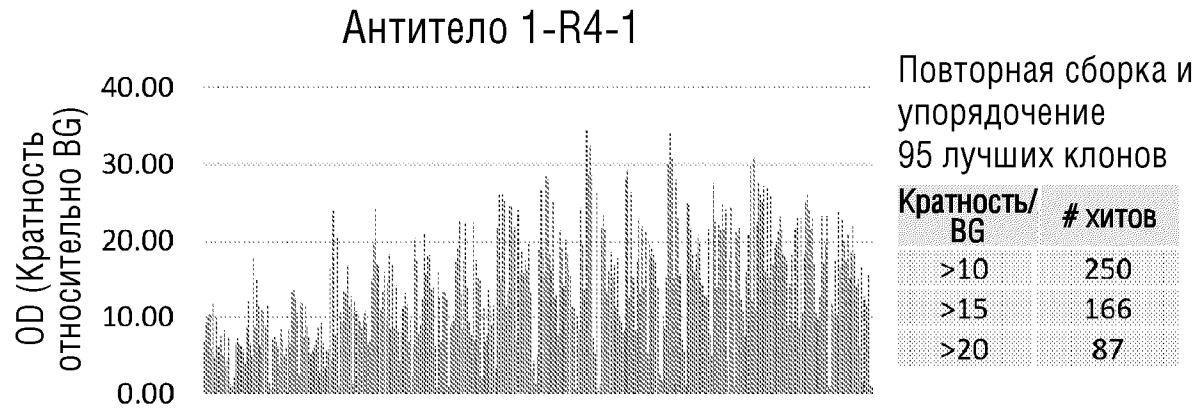
ФИГ.6



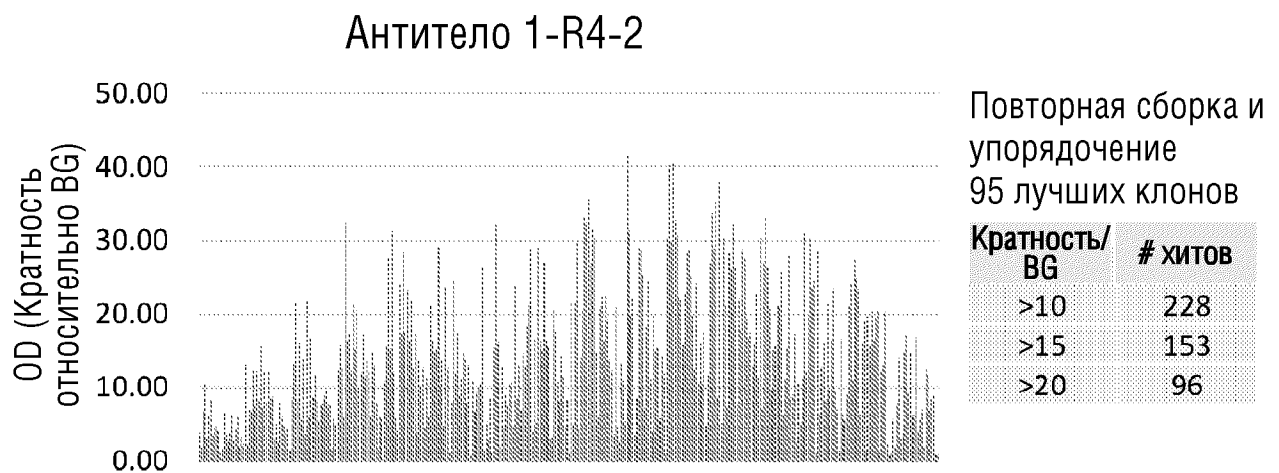
ФИГ.7



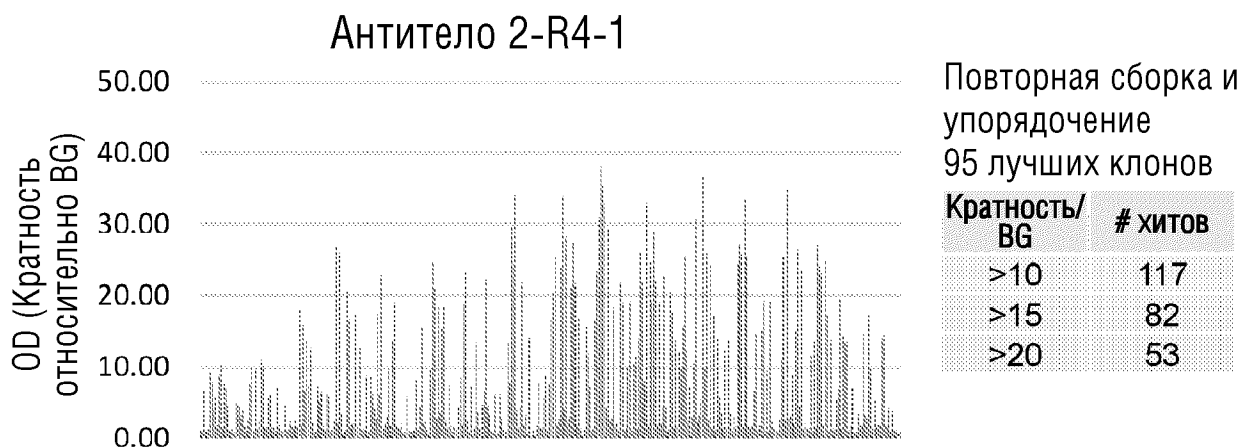
ФИГ.8А



ФИГ.8В

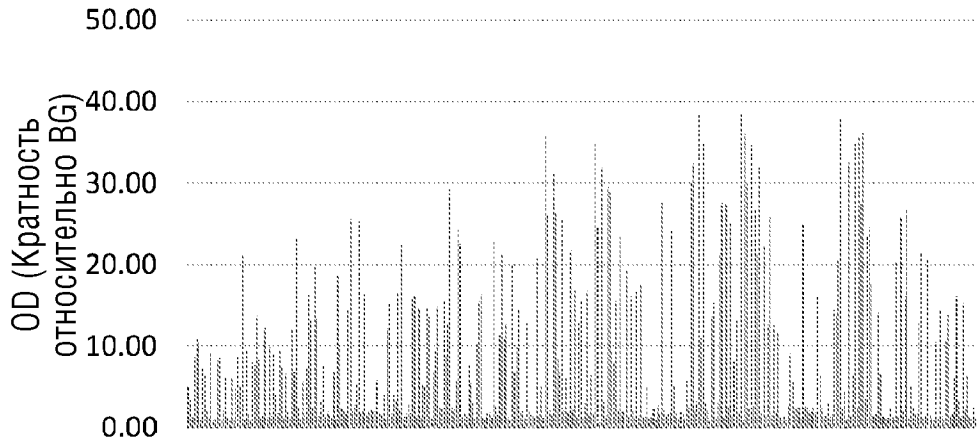


ФИГ.8С



ФИГ.8D

Антитело 2-R4-2

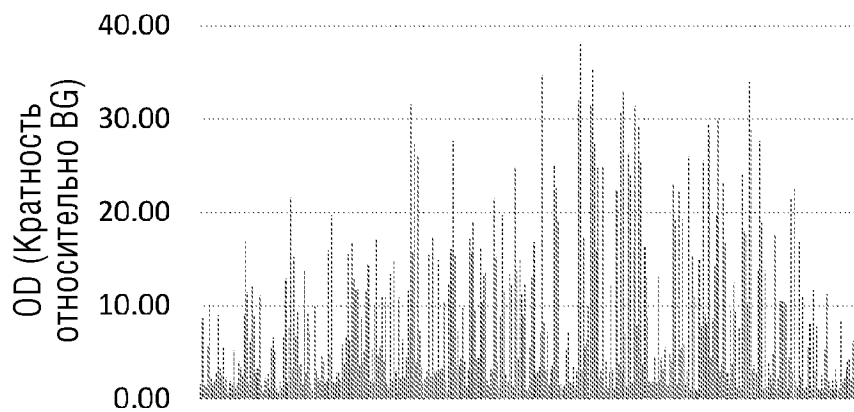


Повторная сборка и
упорядочение
95 лучших клонов

Кратность/ BG	# хитов
>10	118
>15	83
>20	57

ФИГ.9A

Антитело 3-R4-1

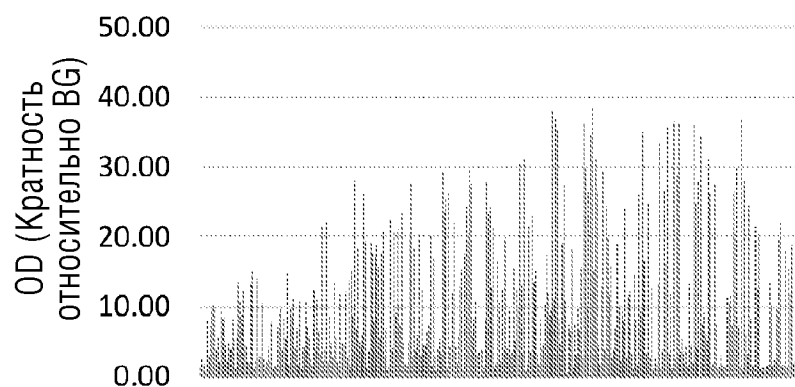


Повторная сборка и
упорядочение
95 лучших клонов

Кратность/ BG	# хитов
>10	124
>15	74
>20	39

ФИГ.9B

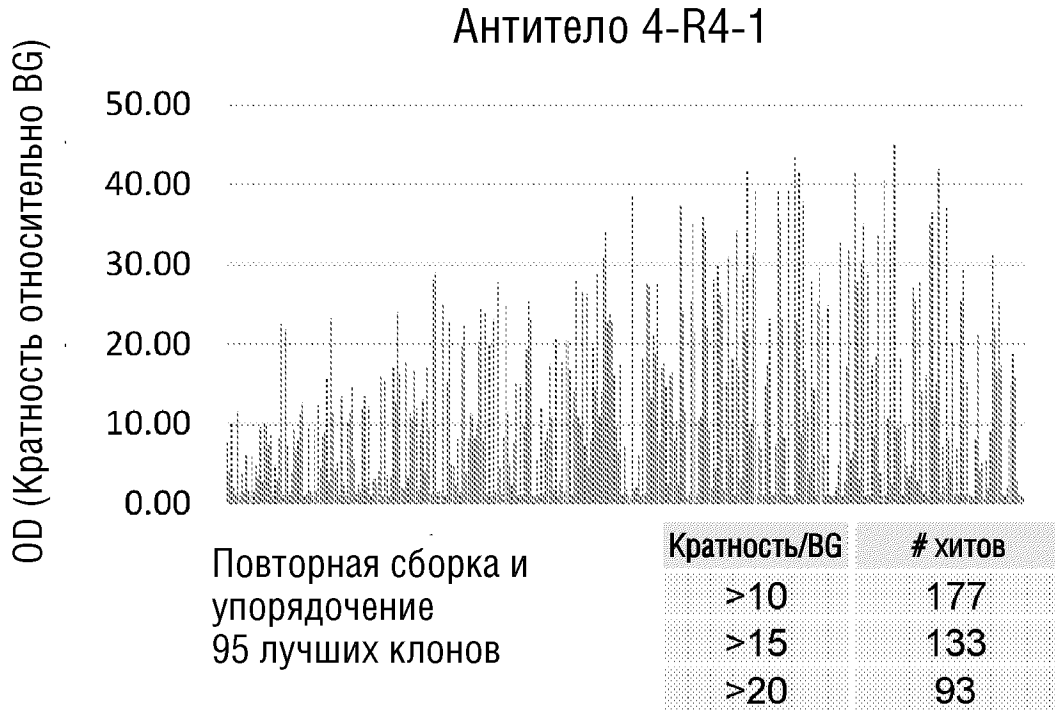
Антитело 3-R4-2



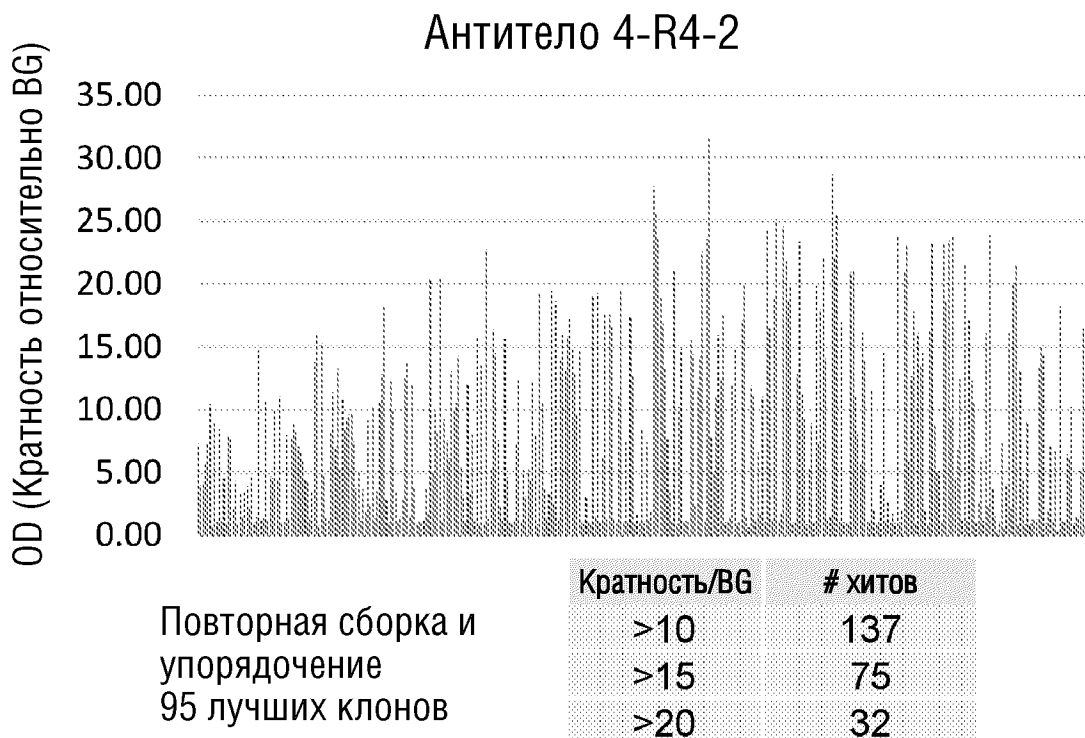
Повторная сборка и
упорядочение
95 лучших клонов

Кратность/ BG	# хитов
>10	150
>15	100
>20	69

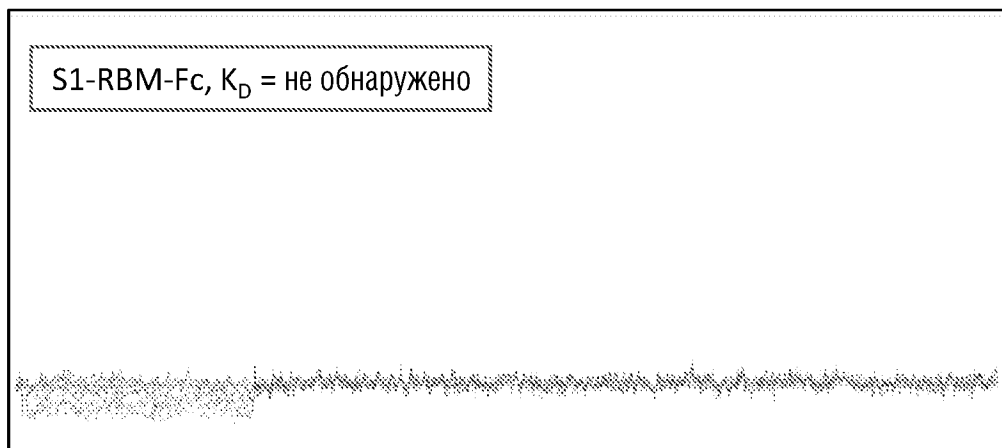
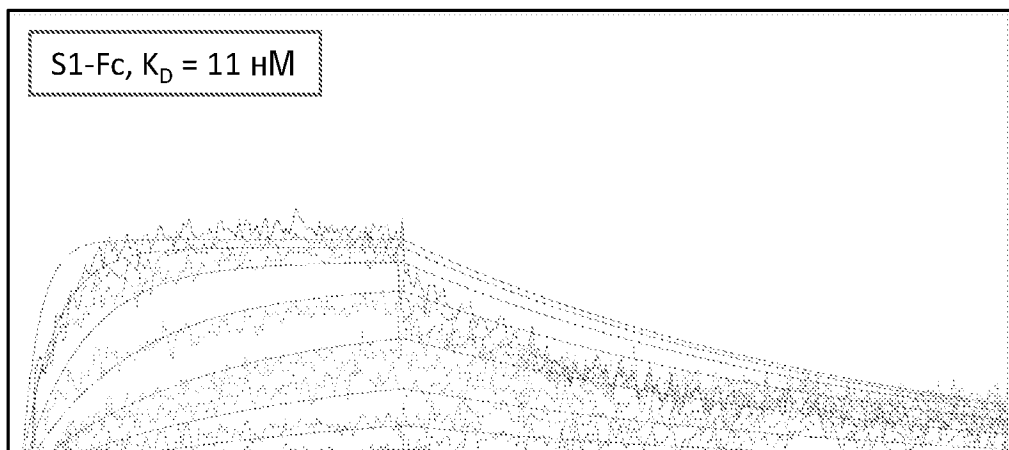
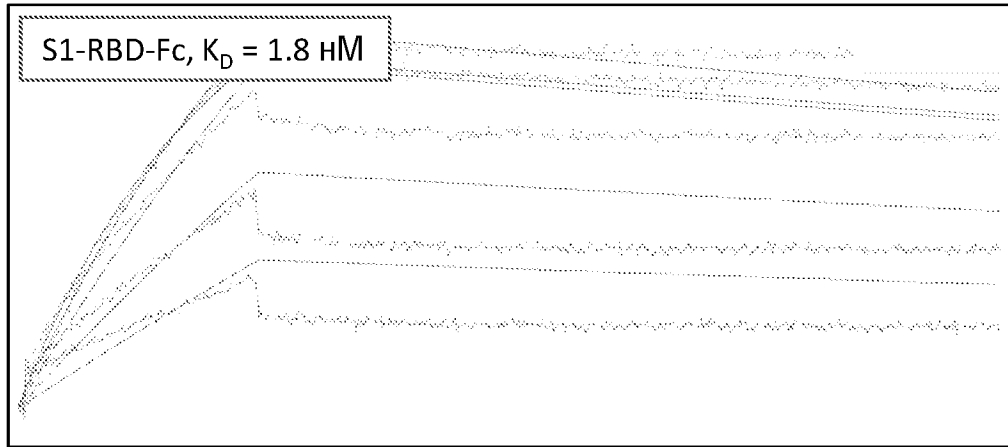
ФИГ.9С



ФИГ.9D

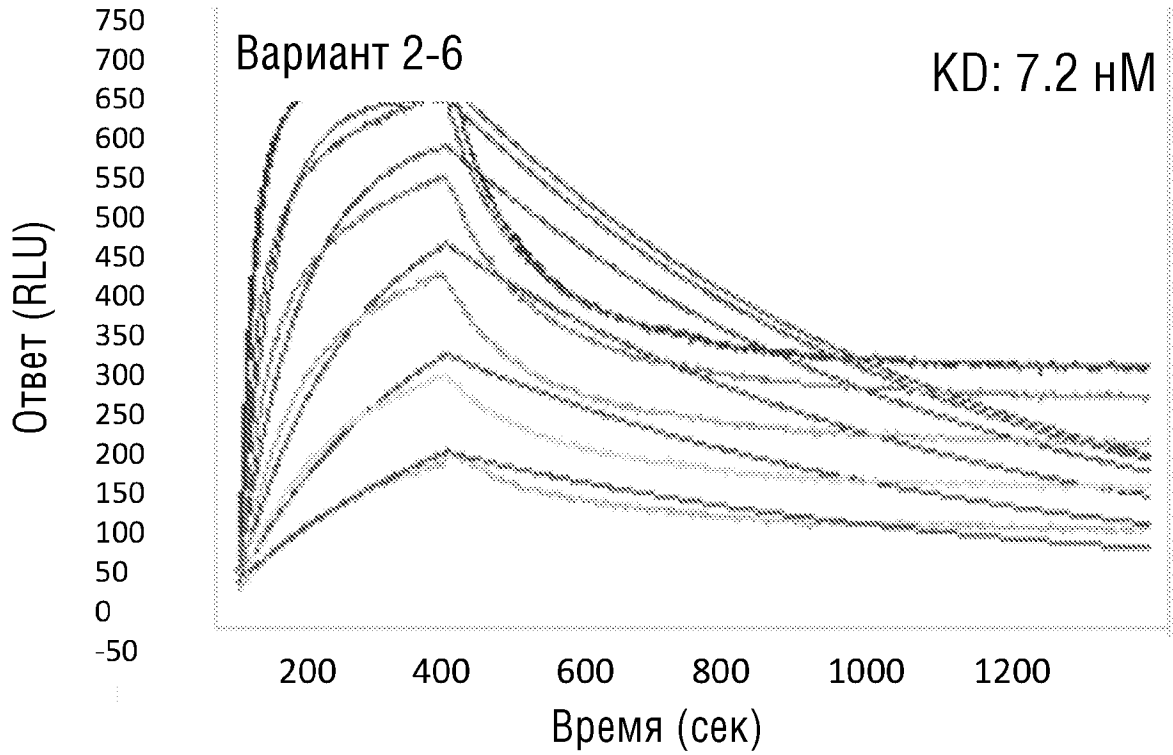


ФИГ.10



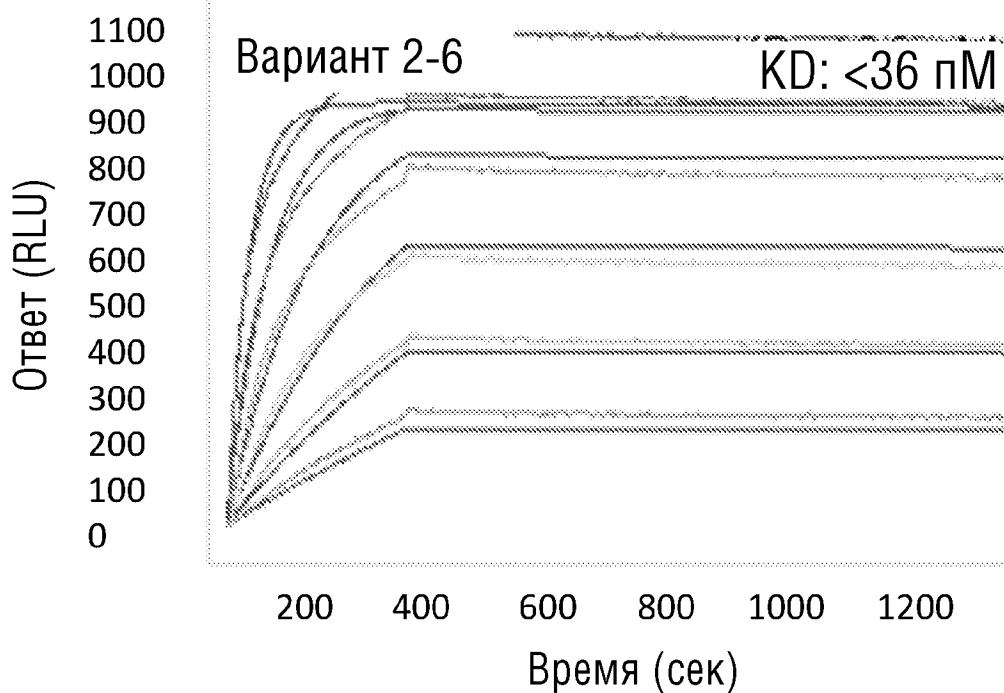
ФИГ.11А

S1, Вариант 2-6

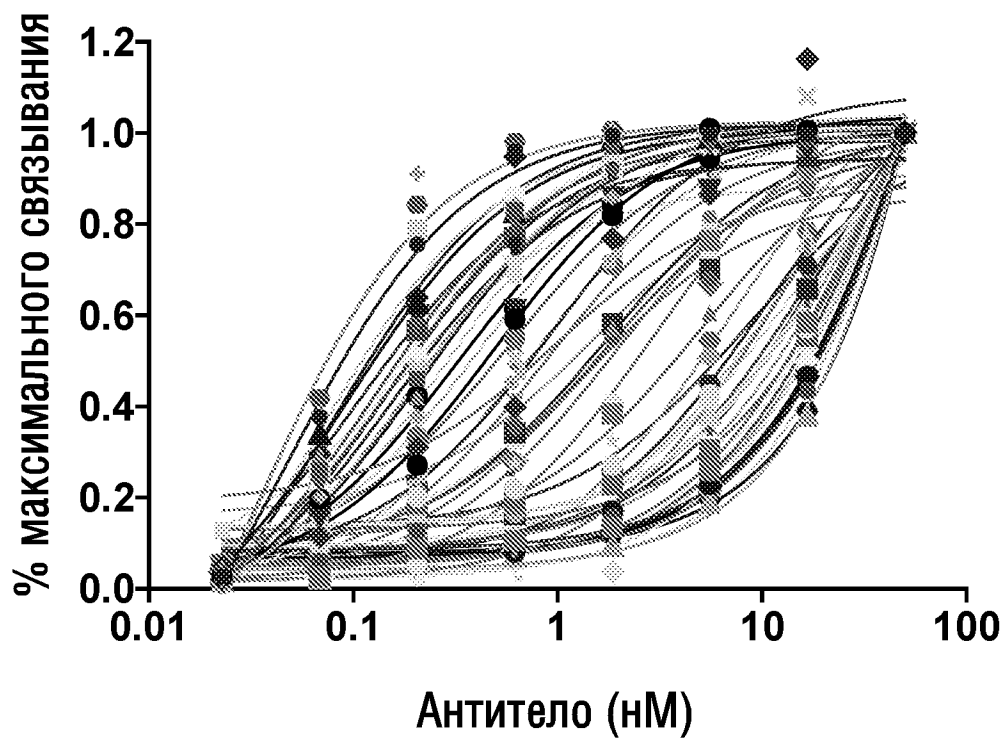


ФИГ.11В

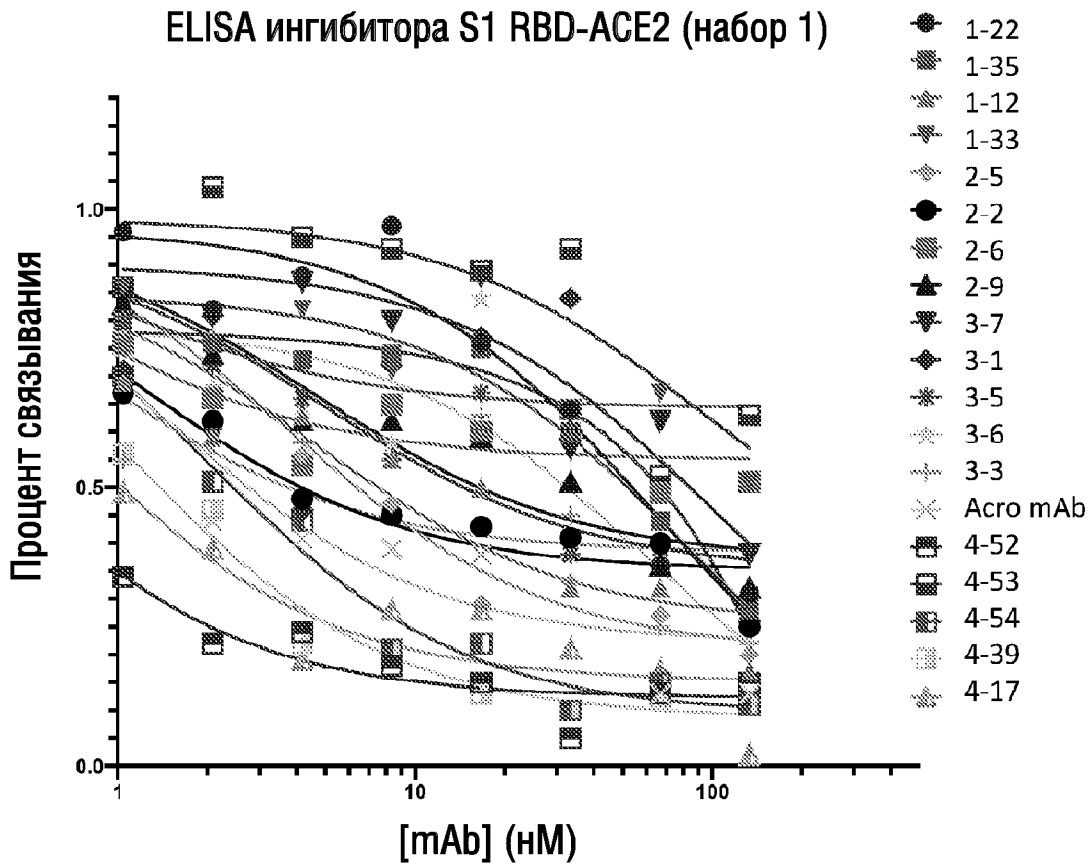
Вариант 2-6 тримера S



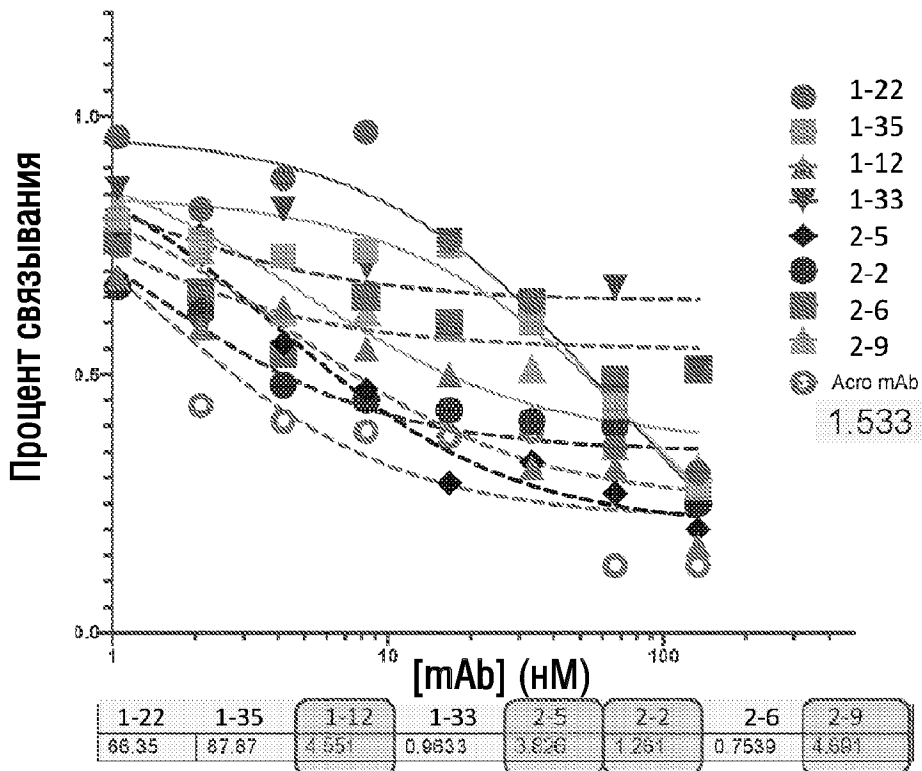
ФИГ.12



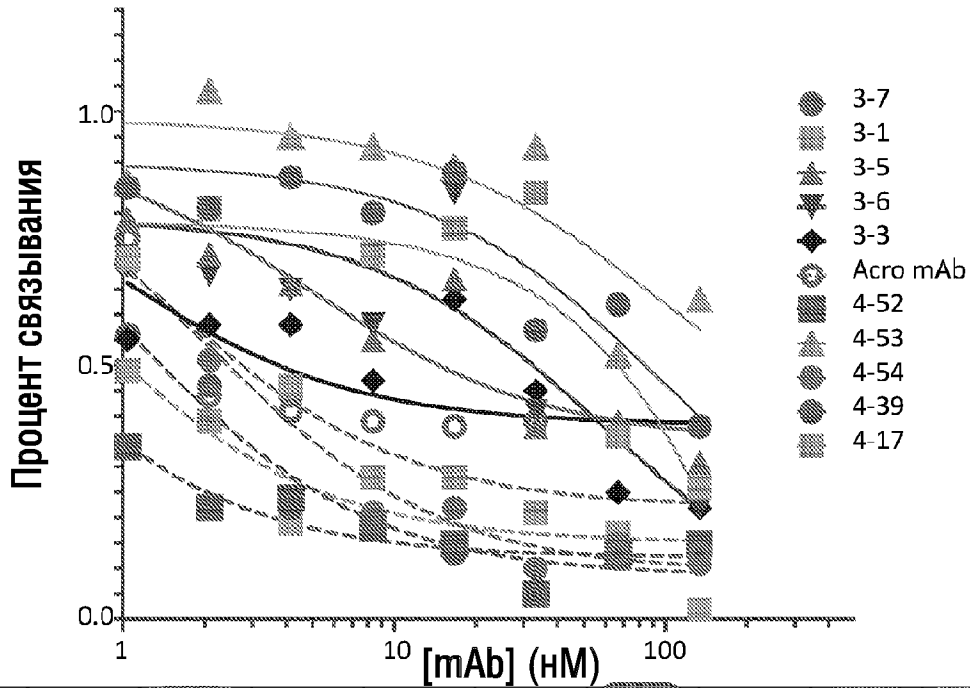
ФИГ.13А



ФИГ.13В



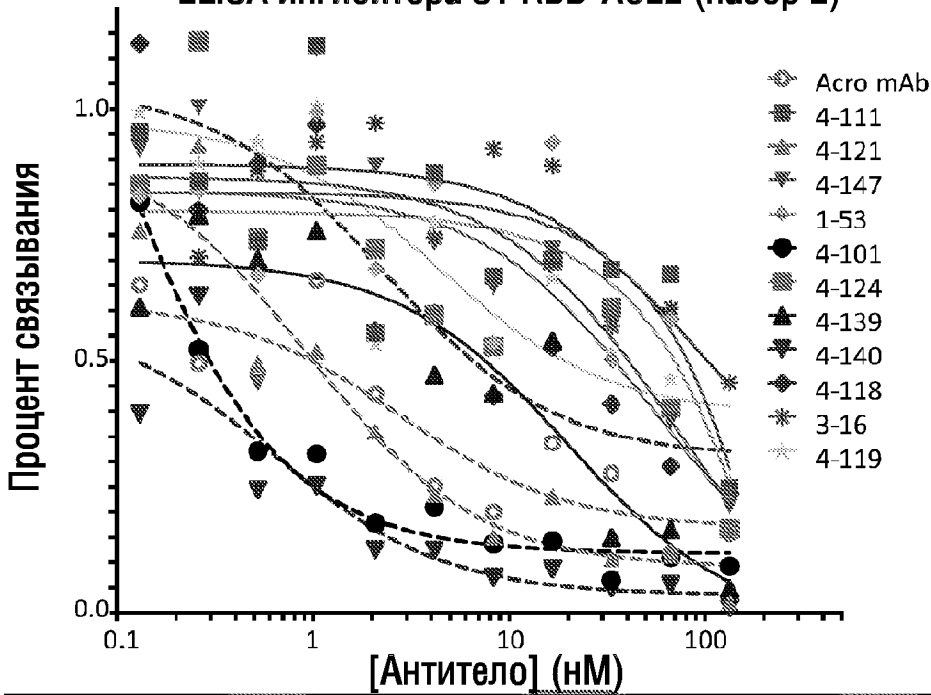
ФИГ.14А



3-7	3-1	3-5	3-6	3-3	Acro mAb	4-52	4-53	4-54	4-39	4-17
101.1	1623	4.929	60.02	0.9157	1.533	0.3499	92.76	1.995	1.148	0.7208

ФИГ.14В

ELISA ингибитора S1 RBD-ACE2 (набор 2)



Acro mAb	4-111	4-121	4-147	1-53	4-101	4-124	4-139	4-140	4-118	3-16	4-119
2.760	306825 8855649 9	0.9368	68.27	14.26	0.07805	54.35	20.20	0.6351	2.304	98.43	4.374

ФИГ.14С

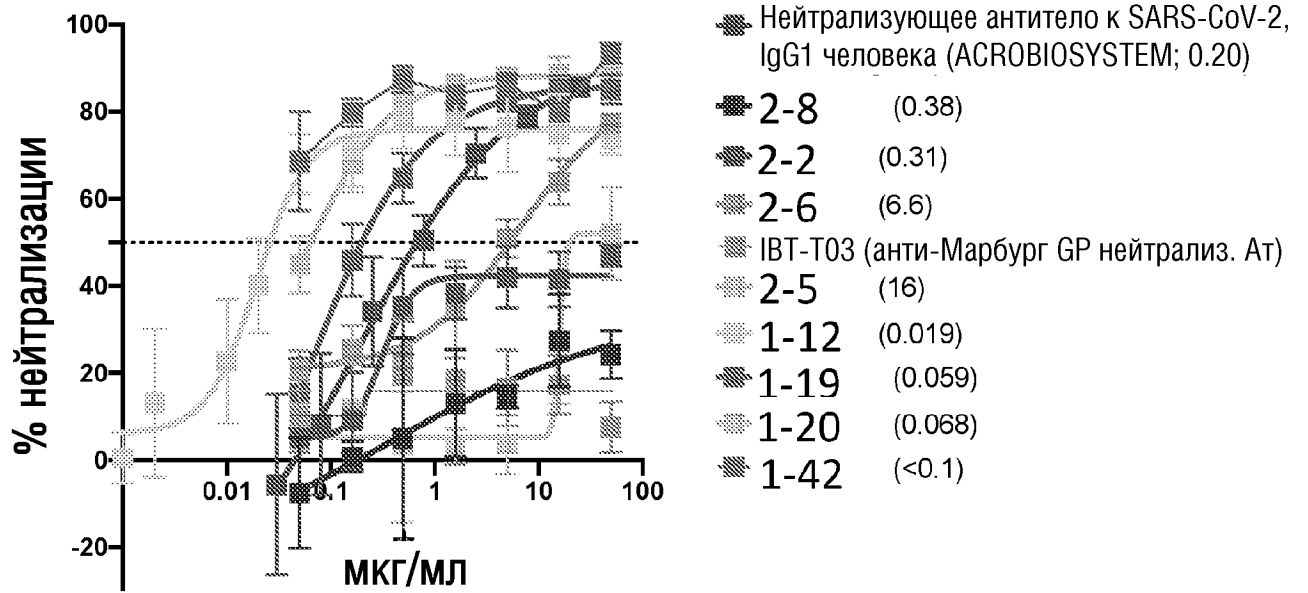
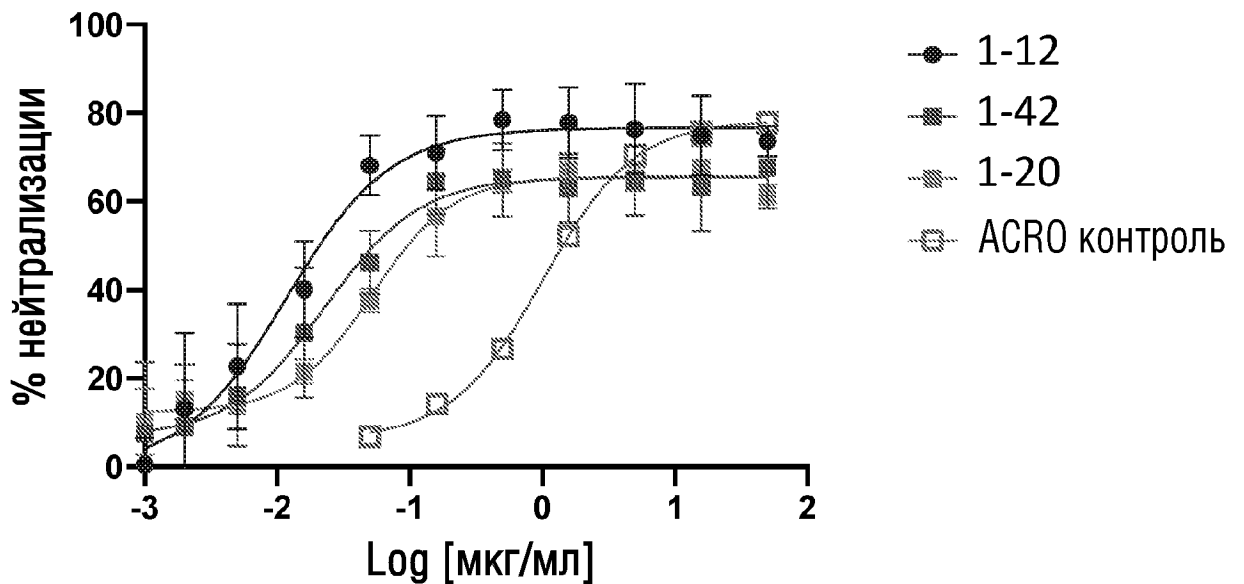


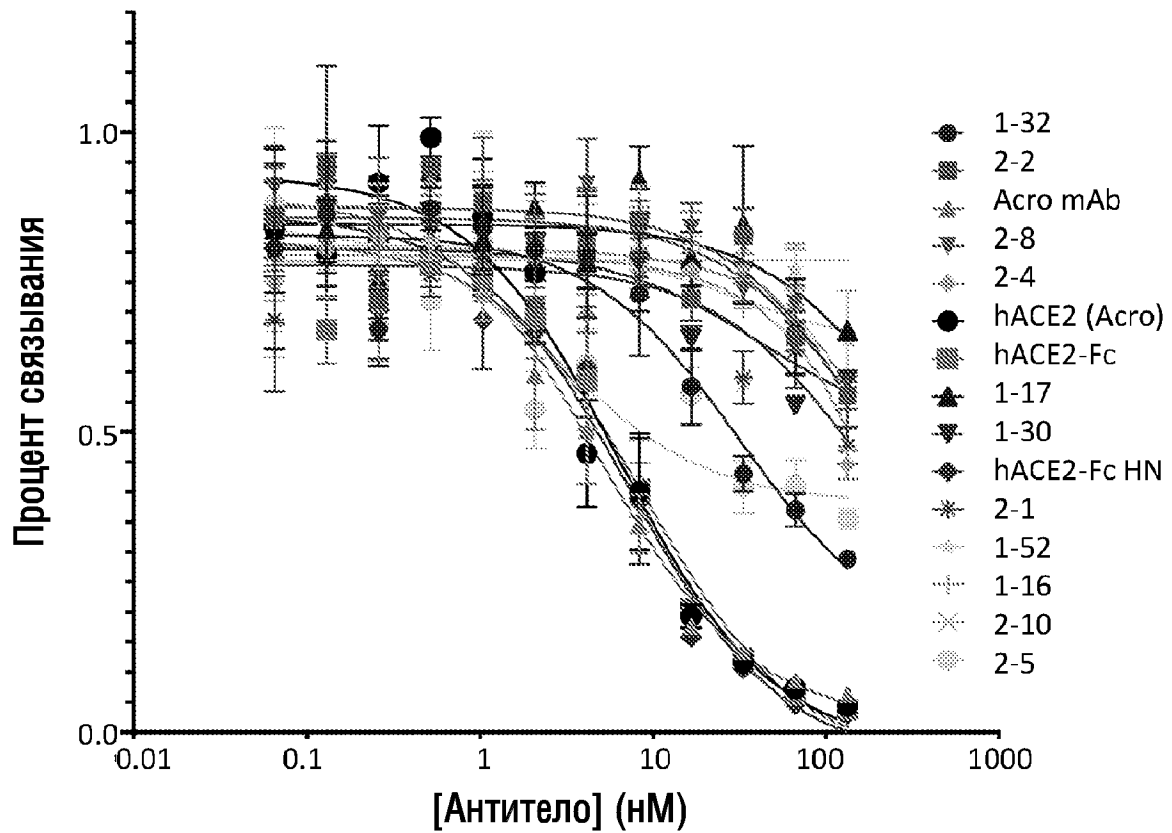
FIG. 14C

ФИГ.14D



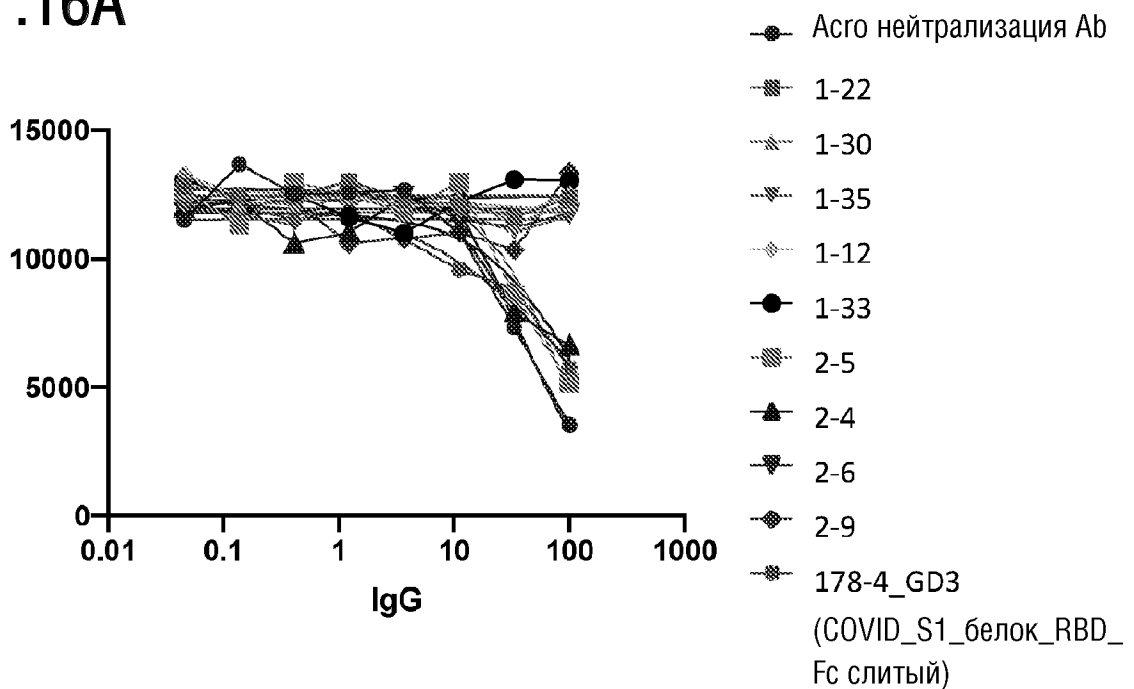
1-12	1-42	1-20	ACRO контроль
0.01170	0.02293	0.05196	1.011

ФИГ.15

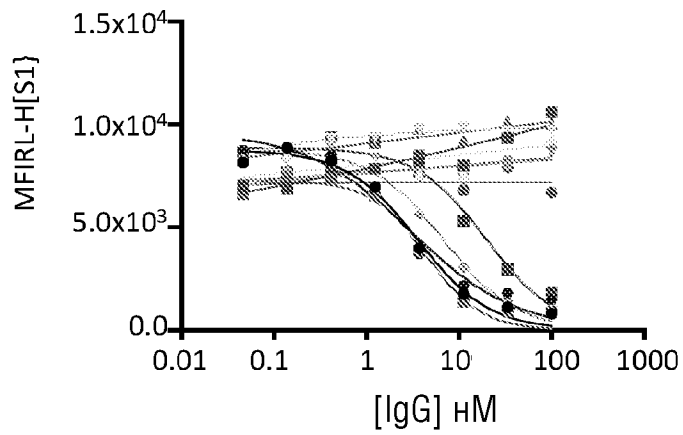


Клон	IC50 (нМ)	S1 SPR (нМ)	S1 RBD SPR (нМ)
1-32	32.2	184	-
2-5	2.9	0.78	0.31
Acro mAb	4.9	48	0.1

ФИГ.16А



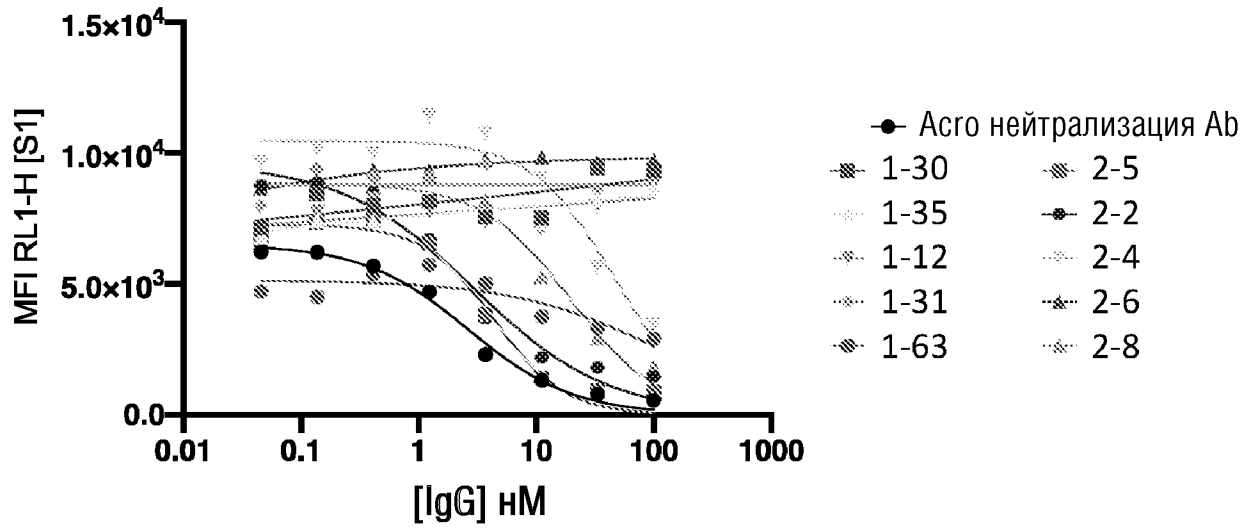
ФИГ.16В



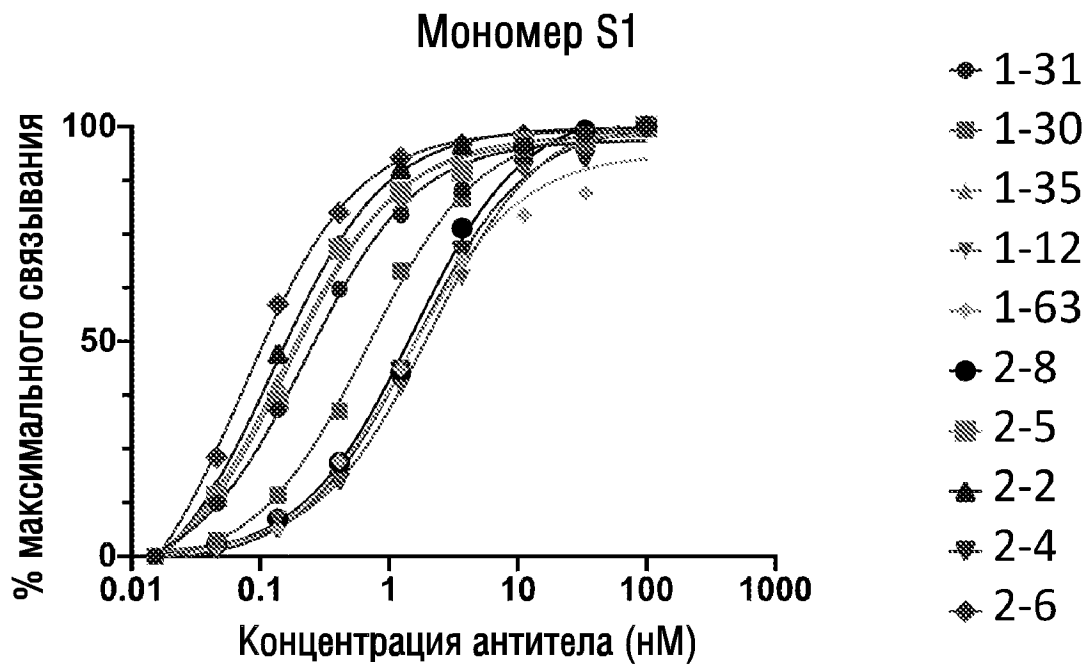
- ◆ 1-22 ◆ 2-5 ● Асро нейтрализация Ab
- ◆ 1-30 ◆ 2-2 ◆ 178-4_GD3 (COVID_S1_белок_RBD_Fc слитый)
- ◆ 1-35 ◆ 2-6
- ◆ 1-12 ◆ 2-8
- ◆ 1-33 ◆ 2-9

Образец	1-22	1-30	1-35	1-12	1-33	2-5	2-2	2-6	2-8	2-9	178-4	Асро анти-S1
IC50 [нМ]	ND	ND	ND	ND	ND	4.39	3.0	ND	19.5	ND	6.75	3.58

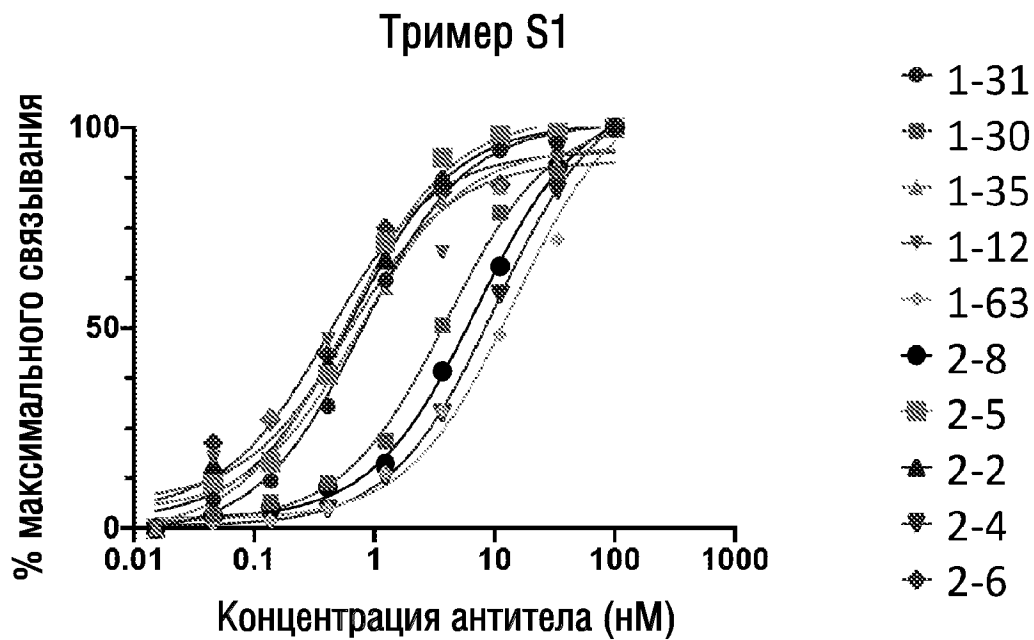
ФИГ.17А



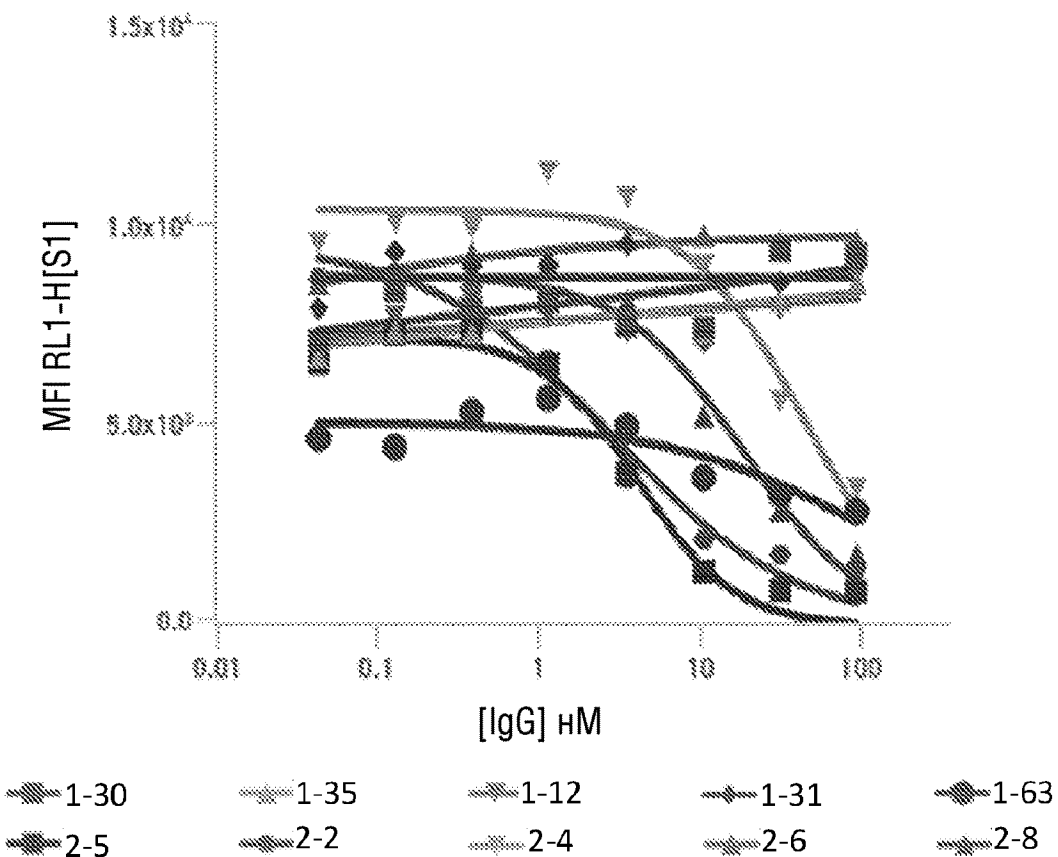
ФИГ.17В



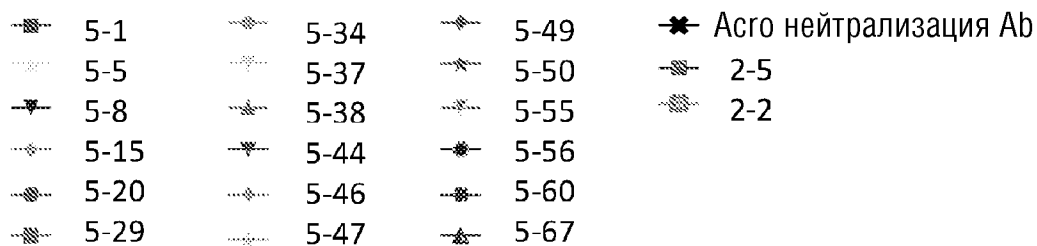
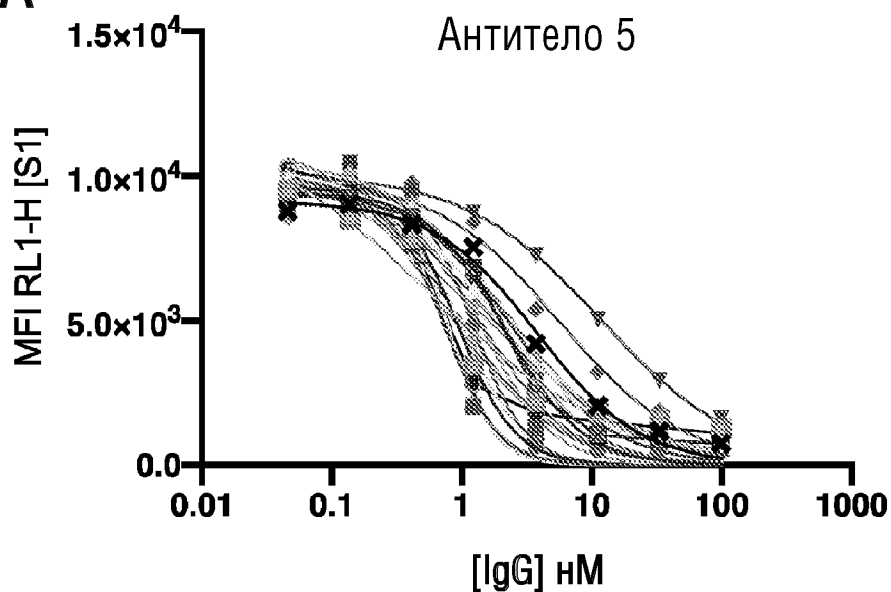
ФИГ.17С



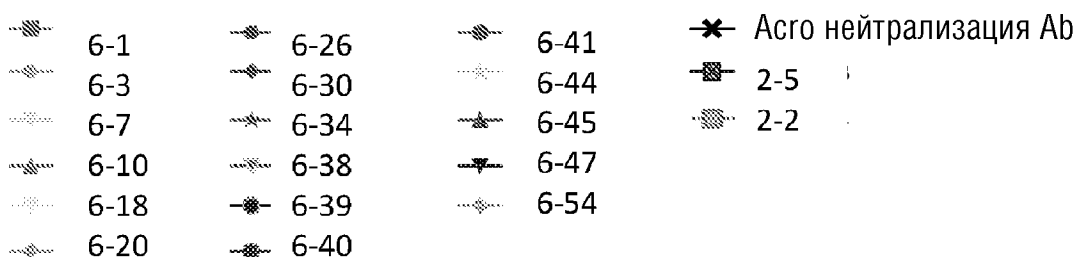
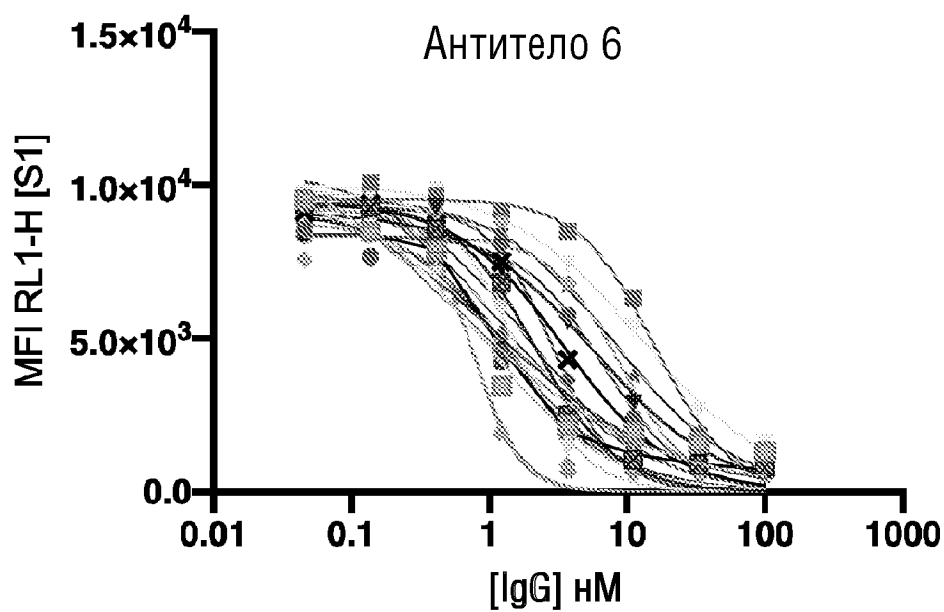
ФИГ.17D



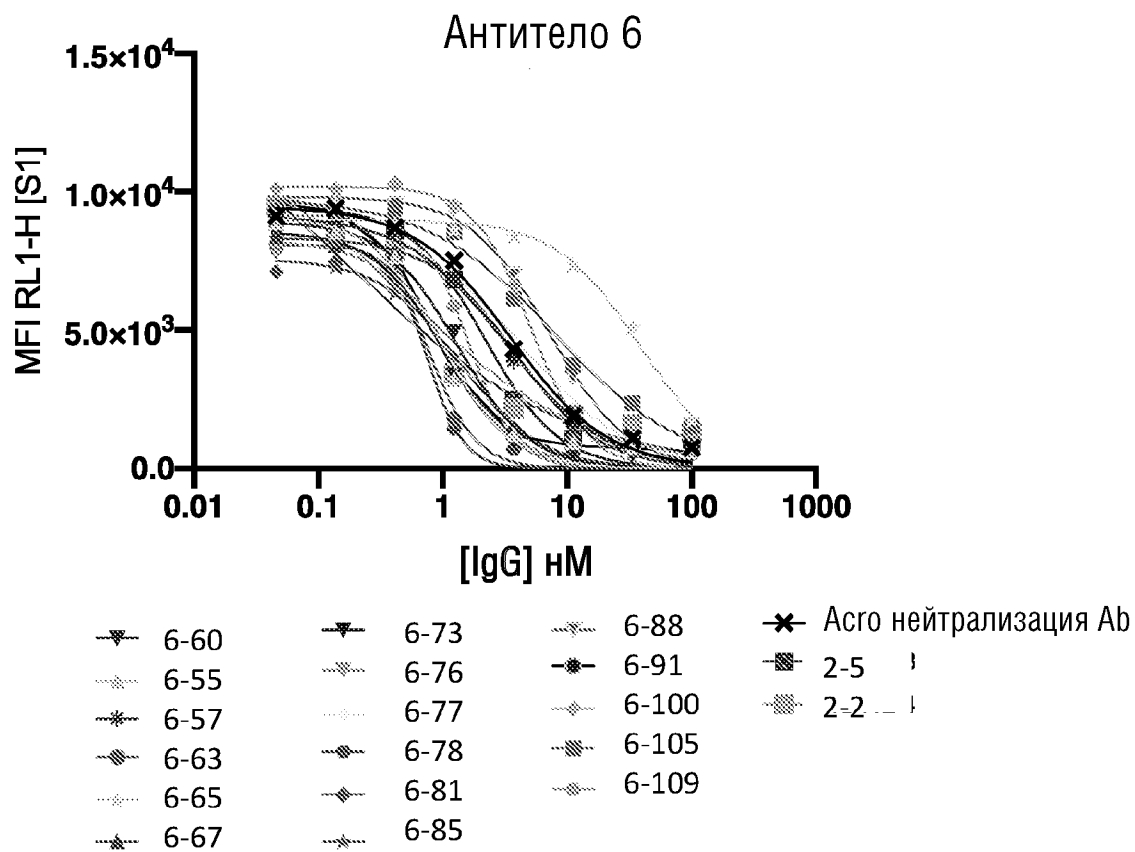
ФИГ.18А



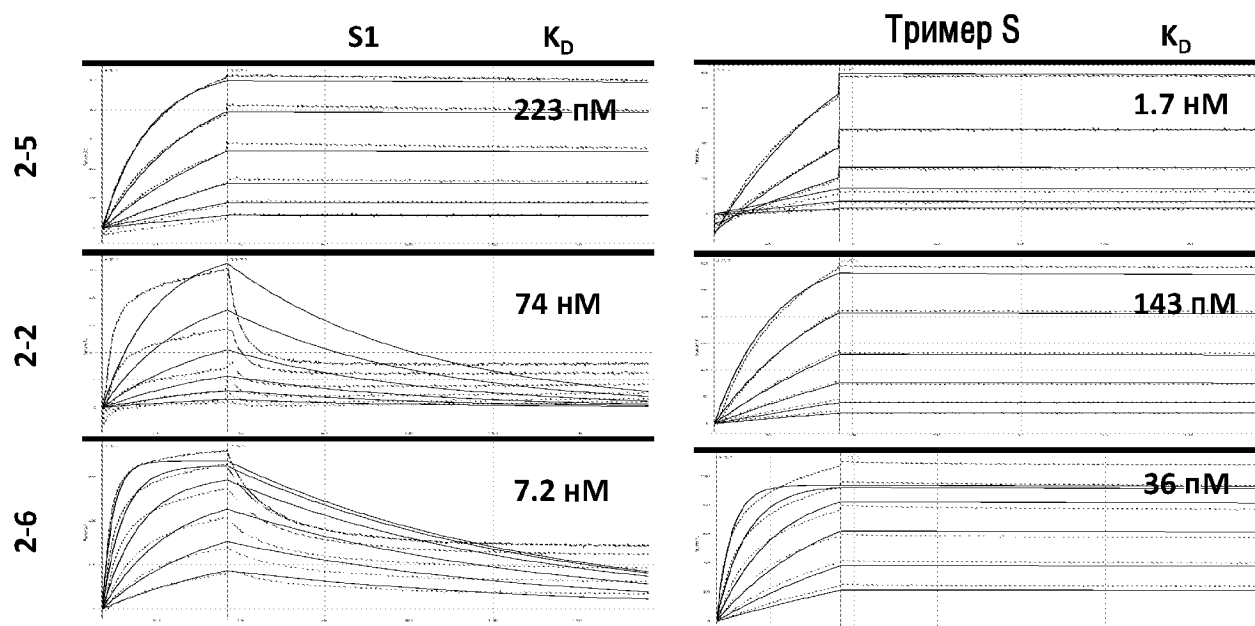
ФИГ.18В



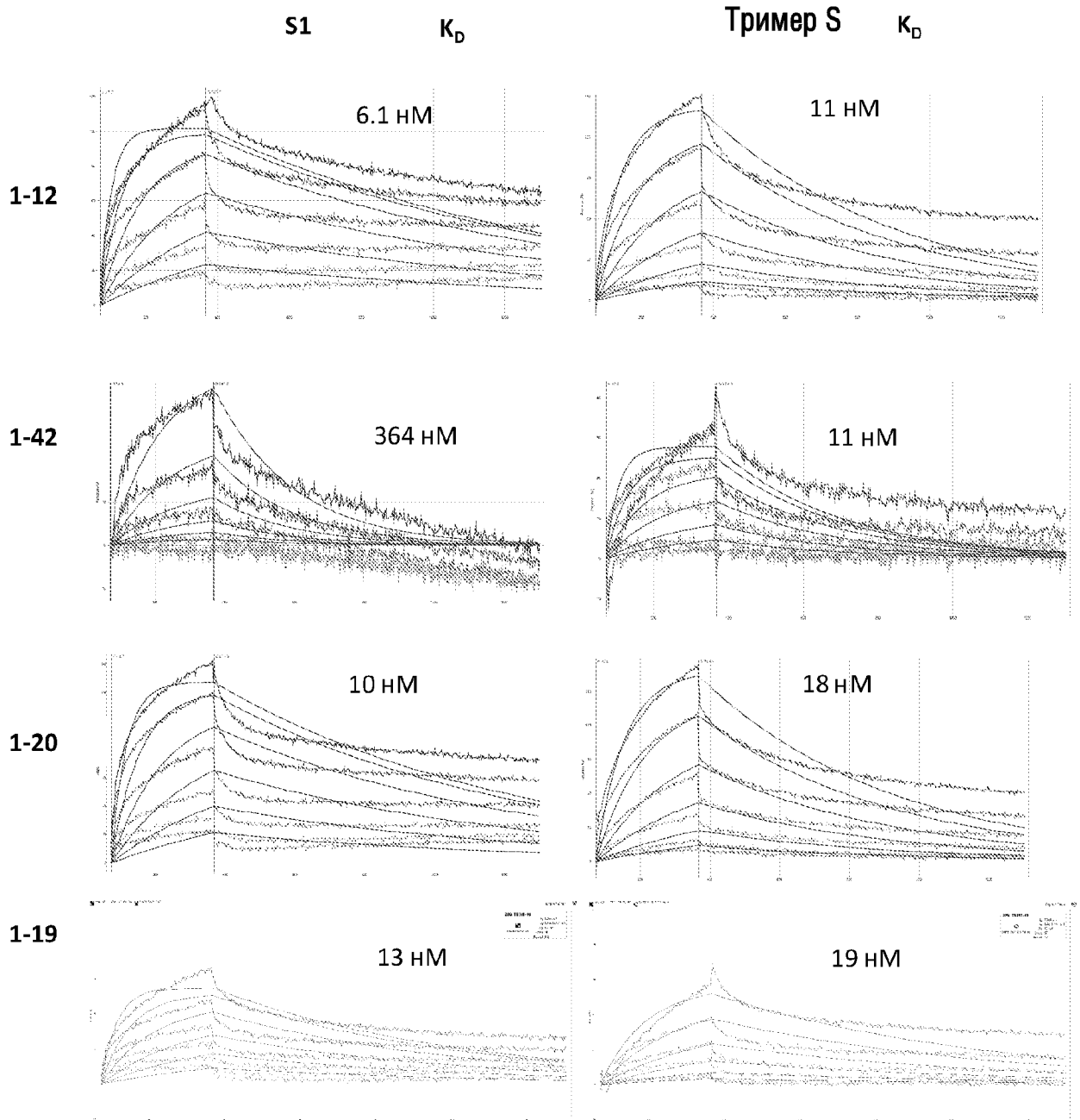
ФИГ.18С



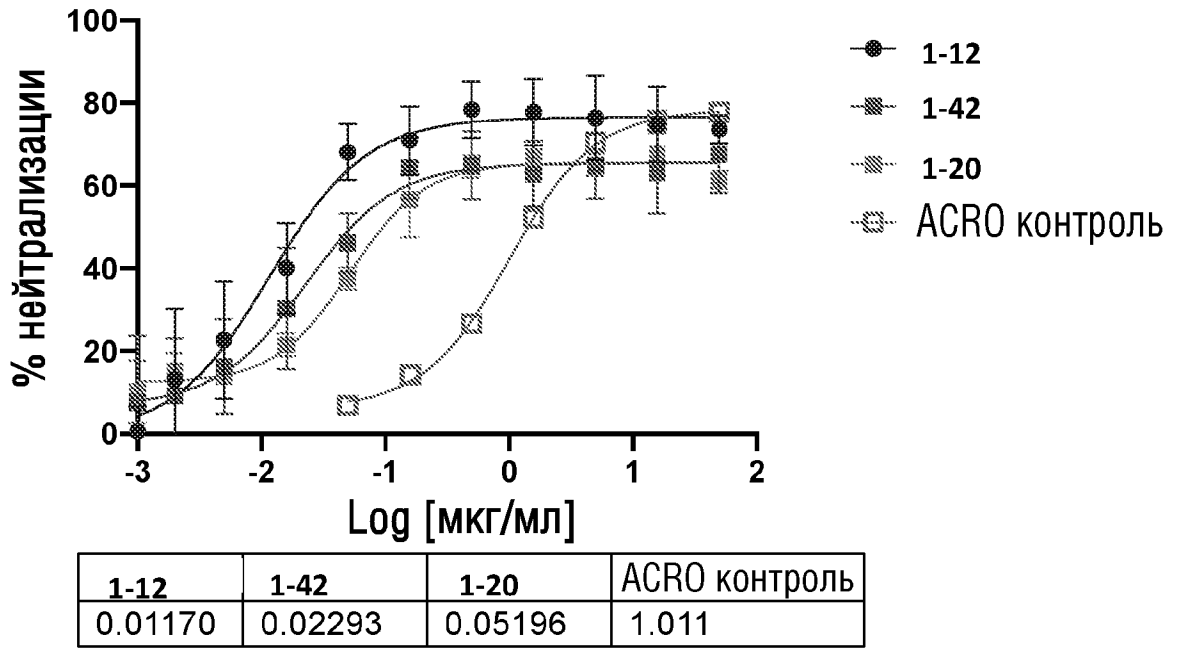
ФИГ.19А



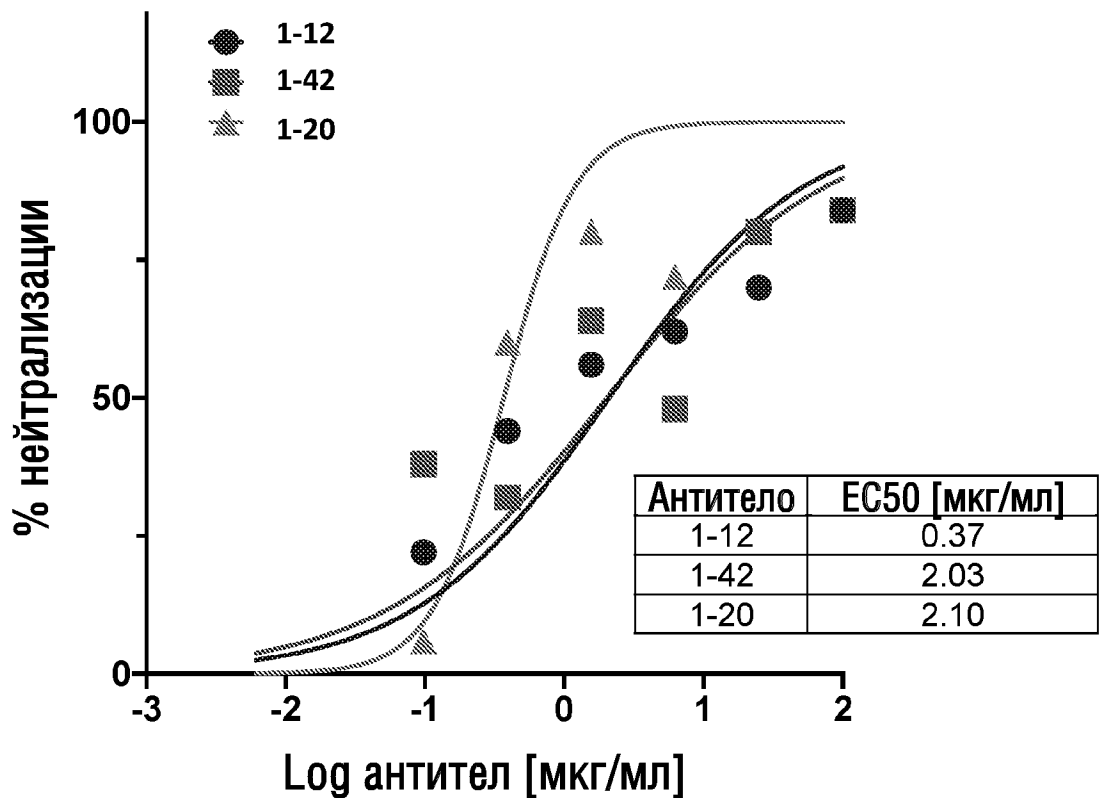
ФИГ.19В



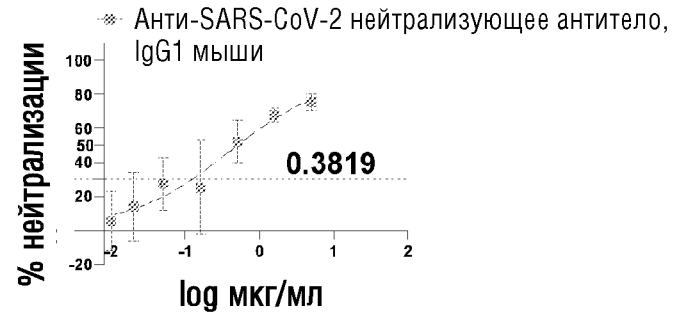
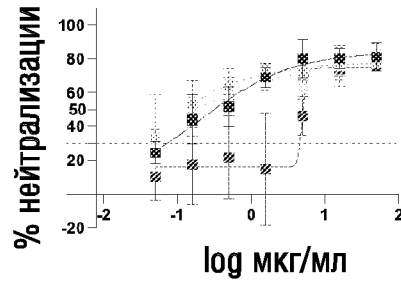
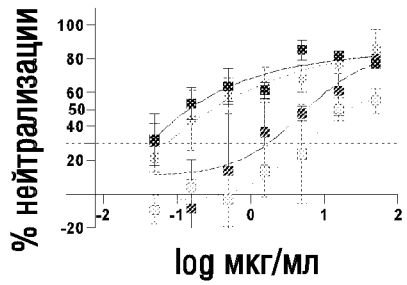
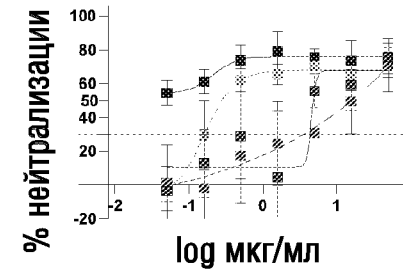
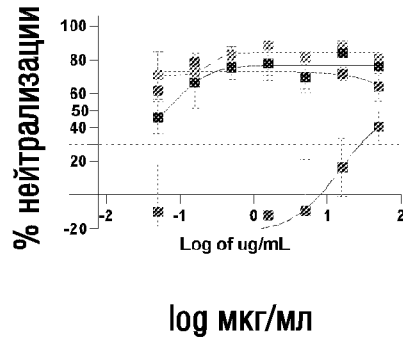
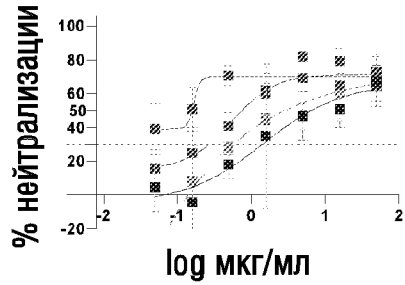
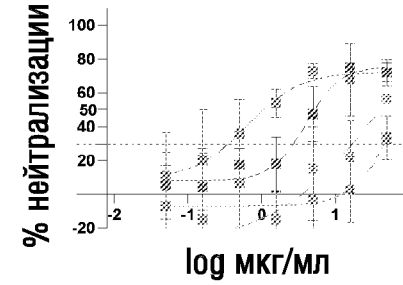
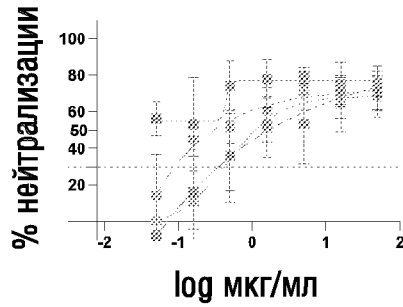
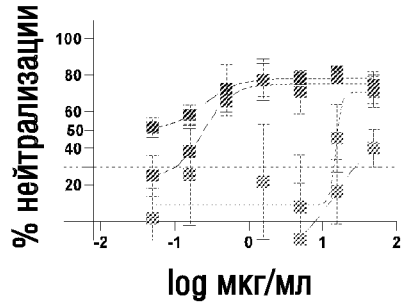
ФИГ.19С



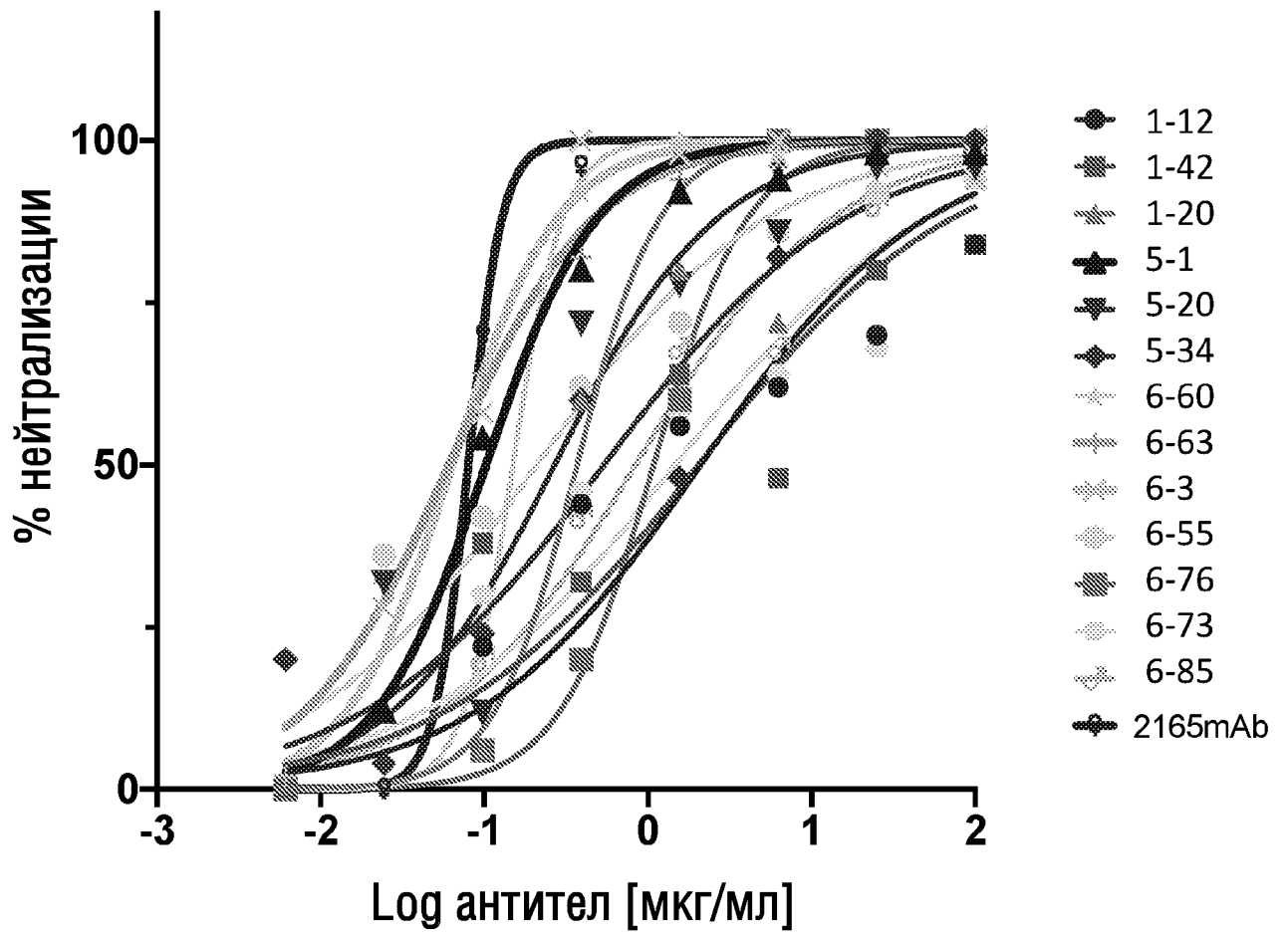
ФИГ.19D



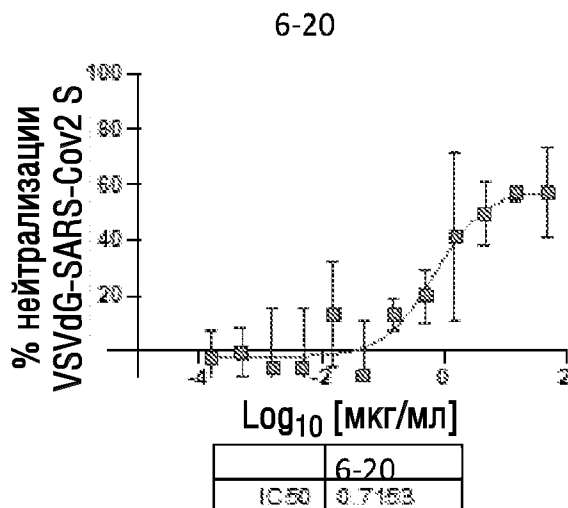
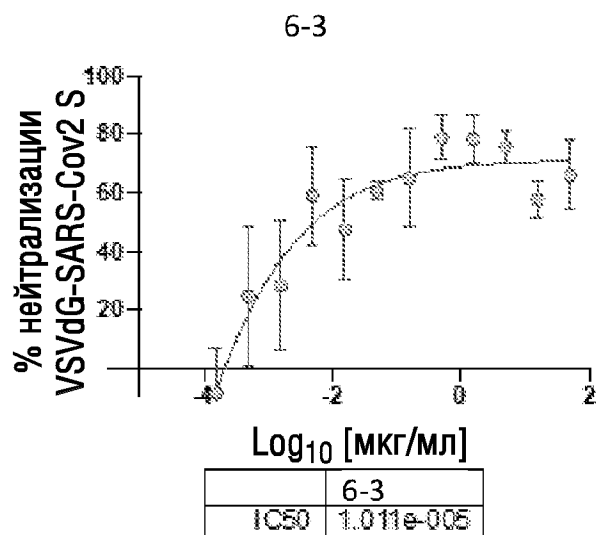
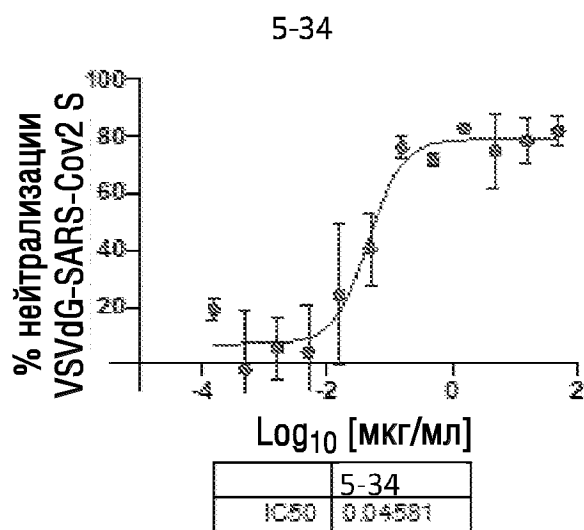
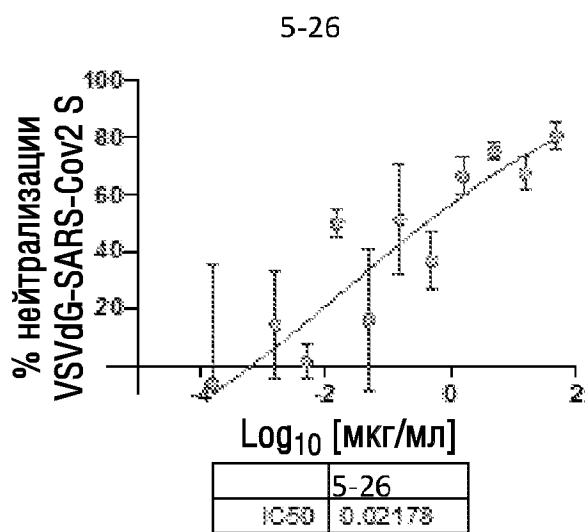
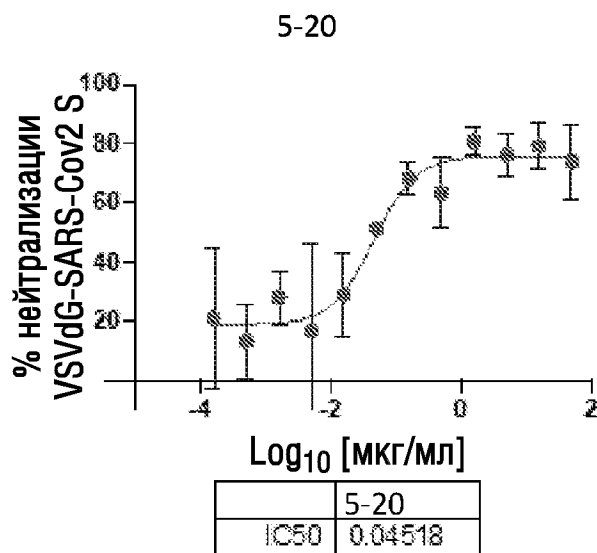
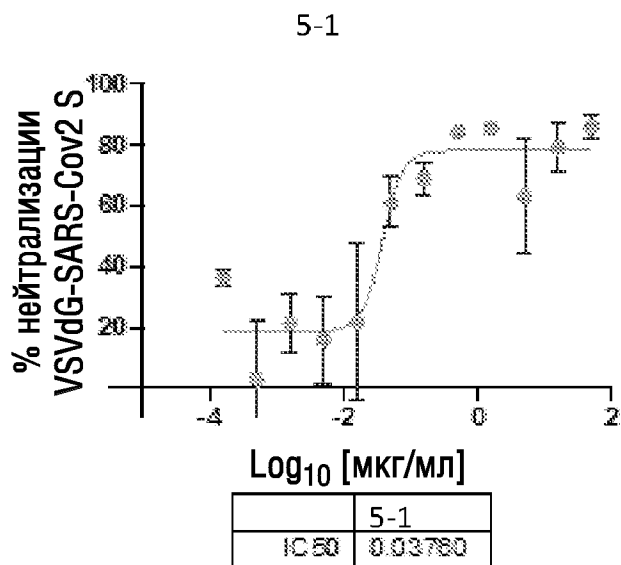
ФИГ.20А



ФИГ.20В

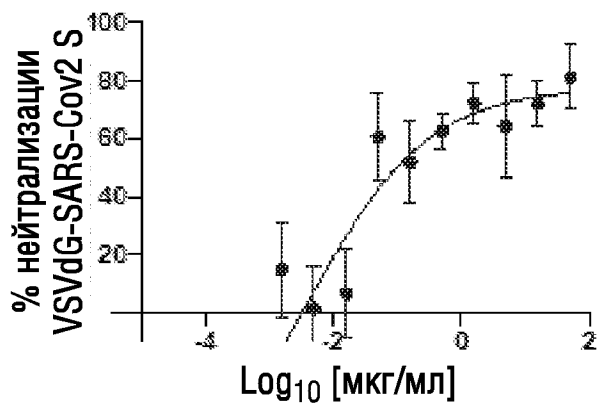


ФИГ.20С



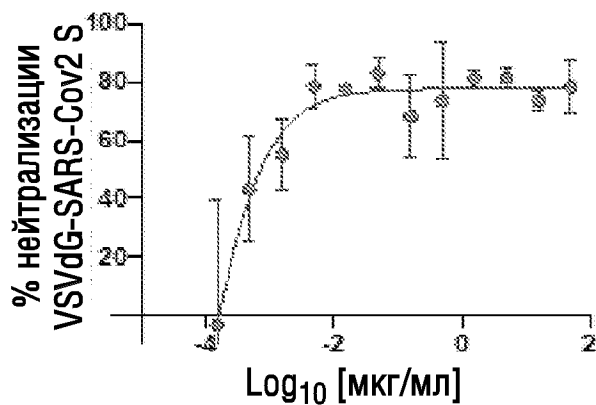
ФИГ.20D

6-55



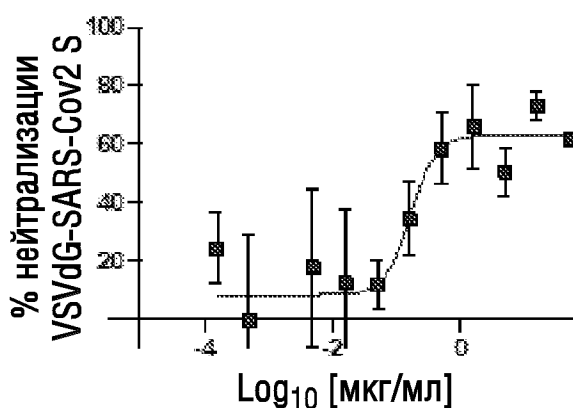
	6-55
IC50	0.003788

6-63



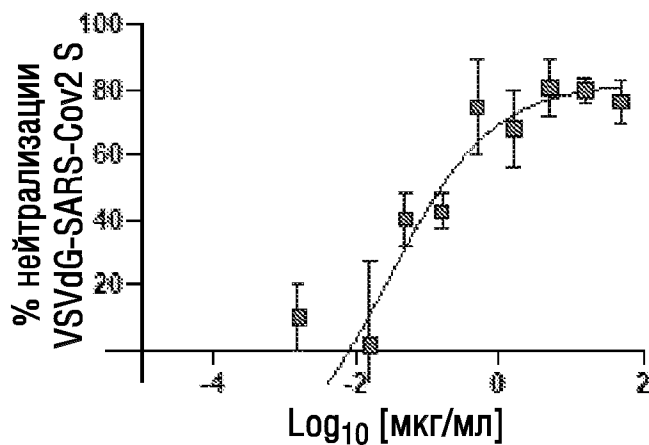
	6-63
IC50	0.150±005

6-73



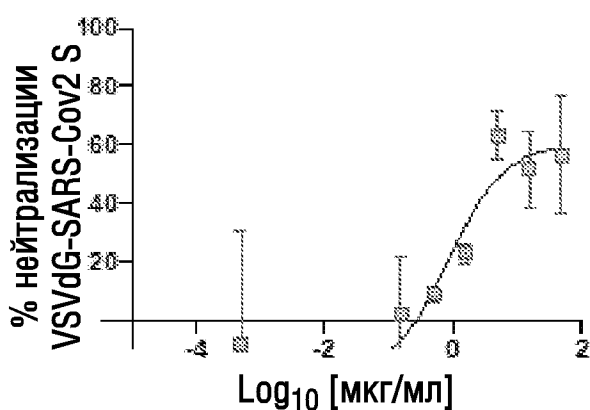
	6-73
IC50	0.1838

6-76



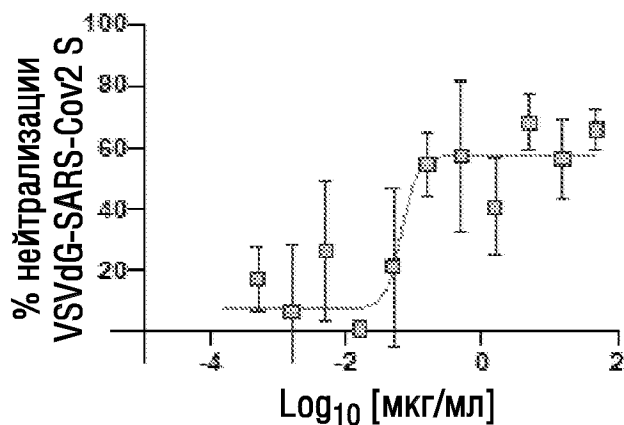
	6-76
IC50	0.02864

6-78



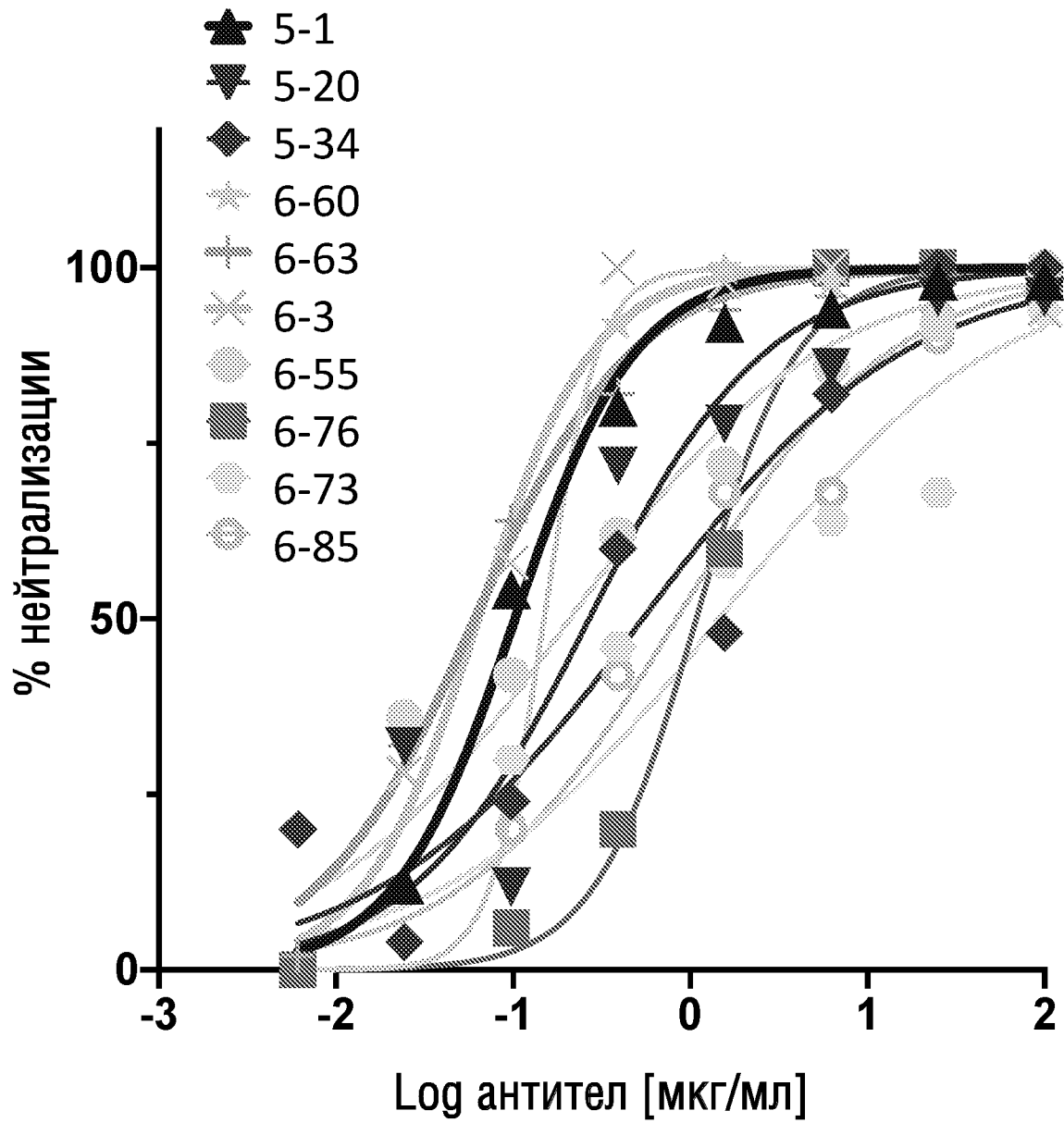
	6-78
IC50	0.8497

6-85

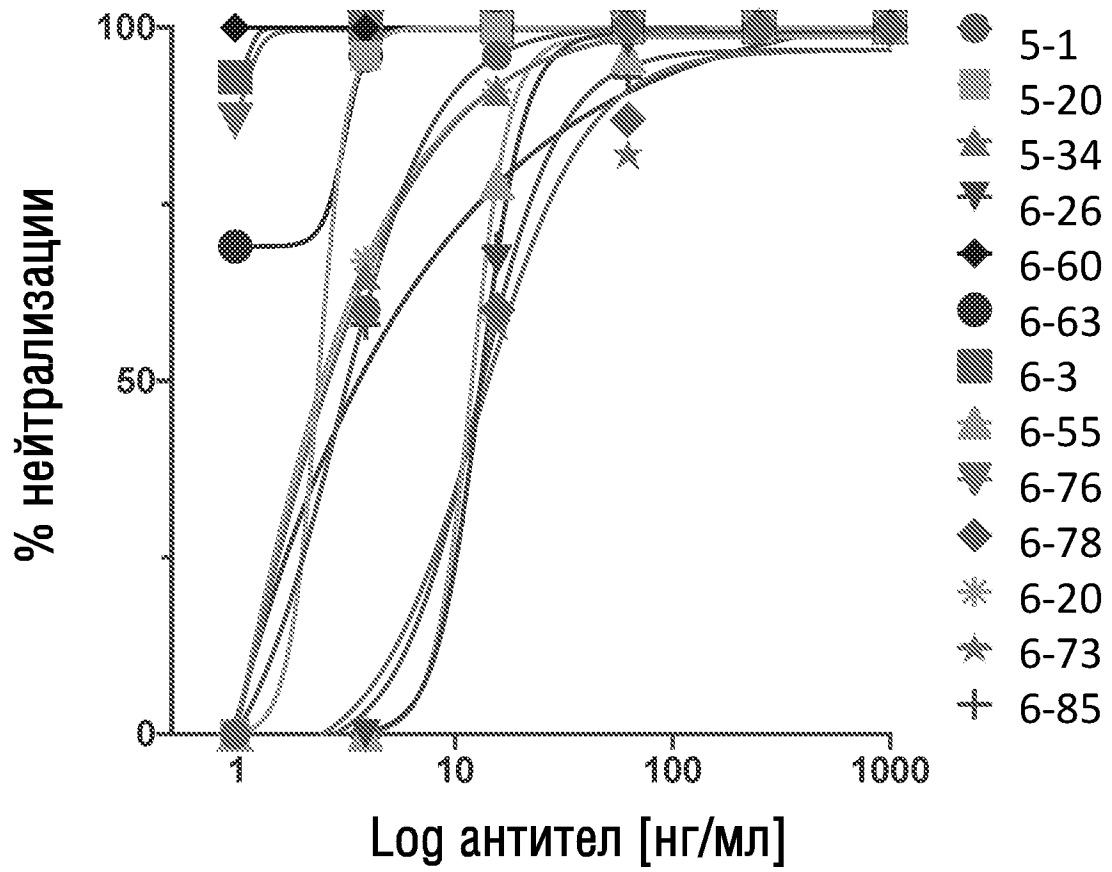


	6-85
IC50	0.06625

ФИГ.20Е

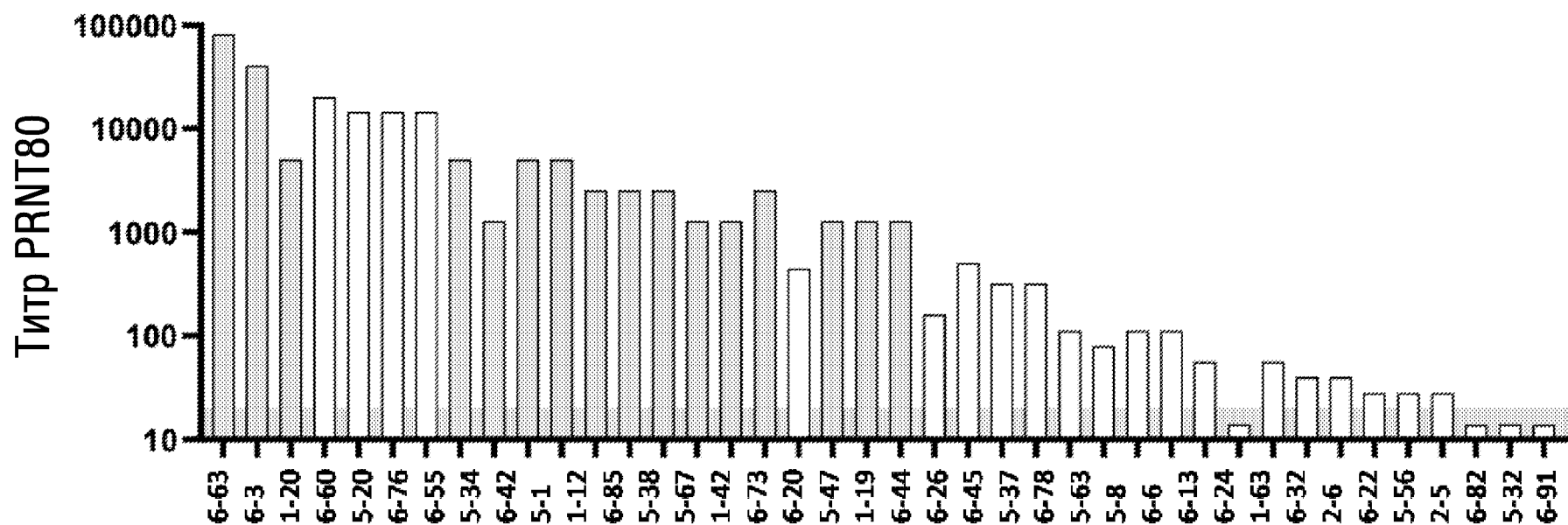


ФИГ.20F

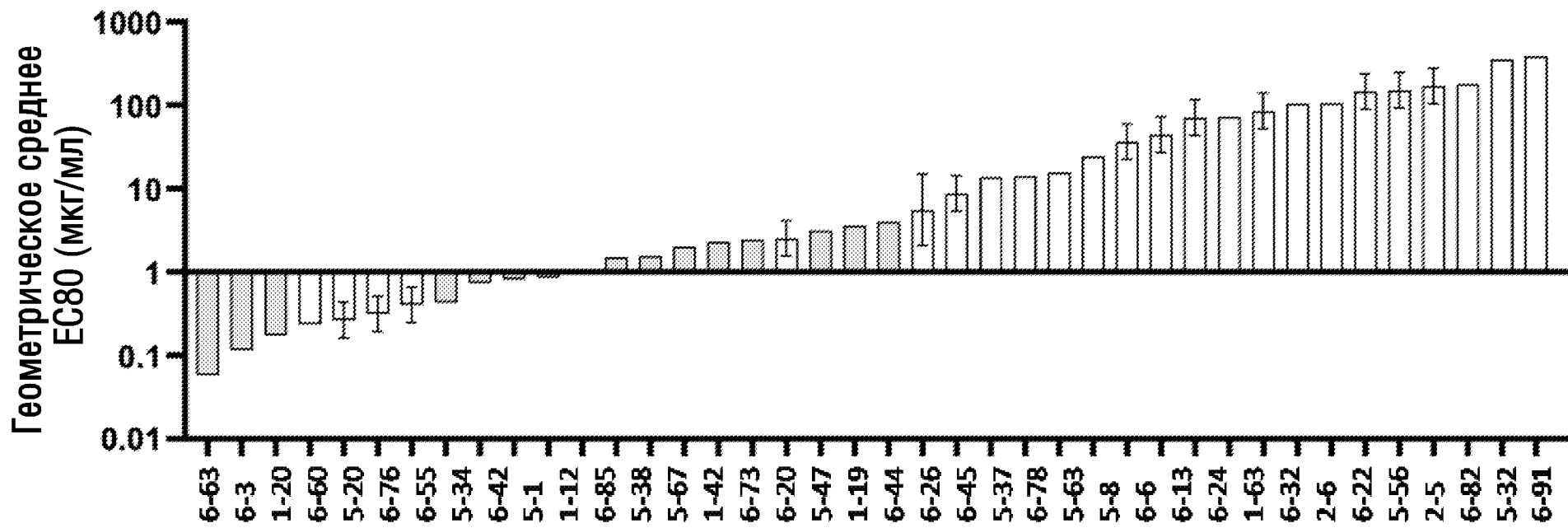


ФИГ.20G

Нейтрализующее антитело

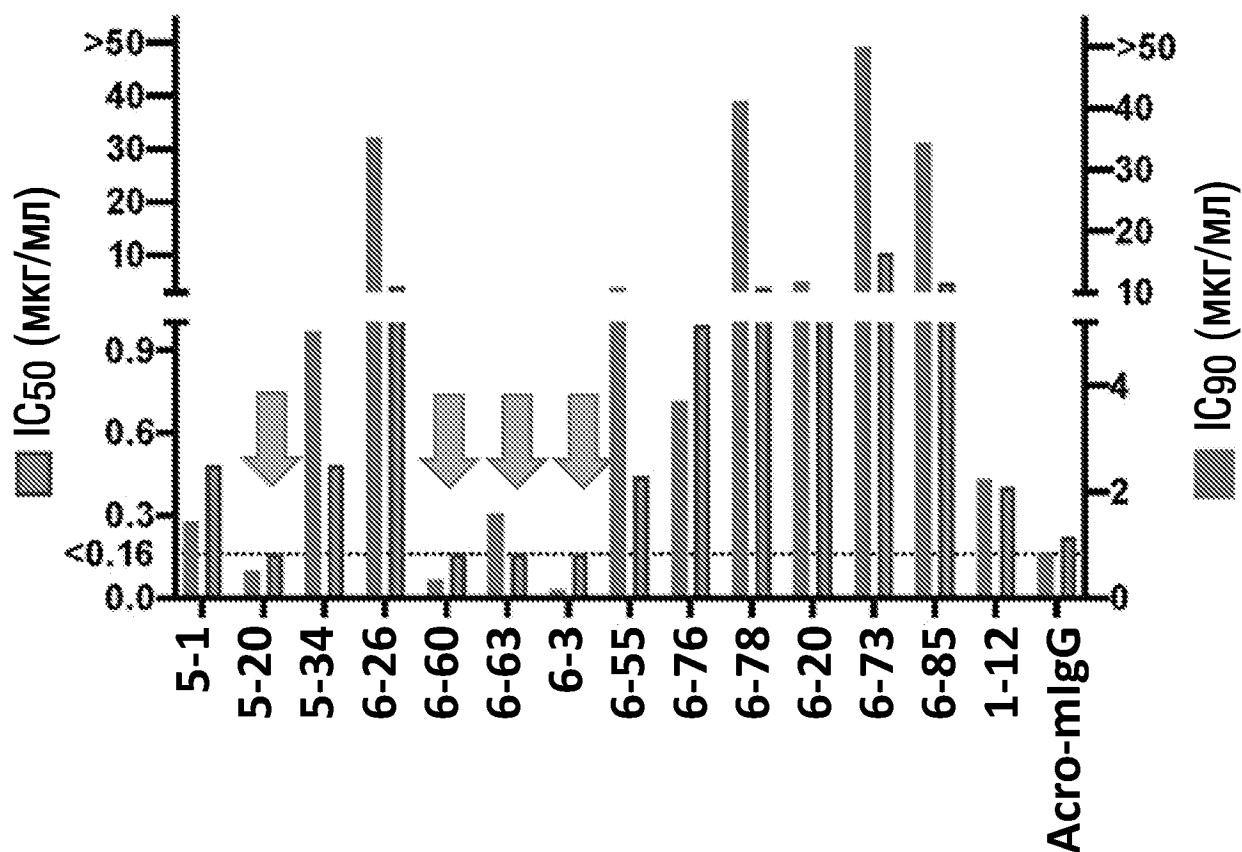


ФИГ.20Н



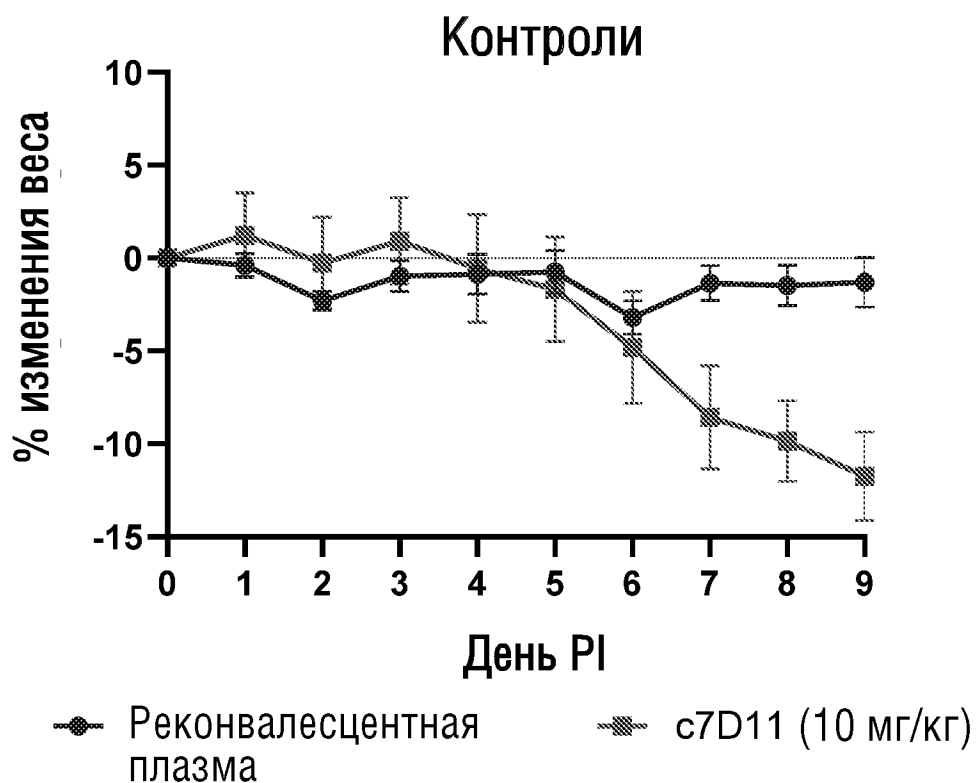
ФИГ.201

SARS-CoV-2 PRNT

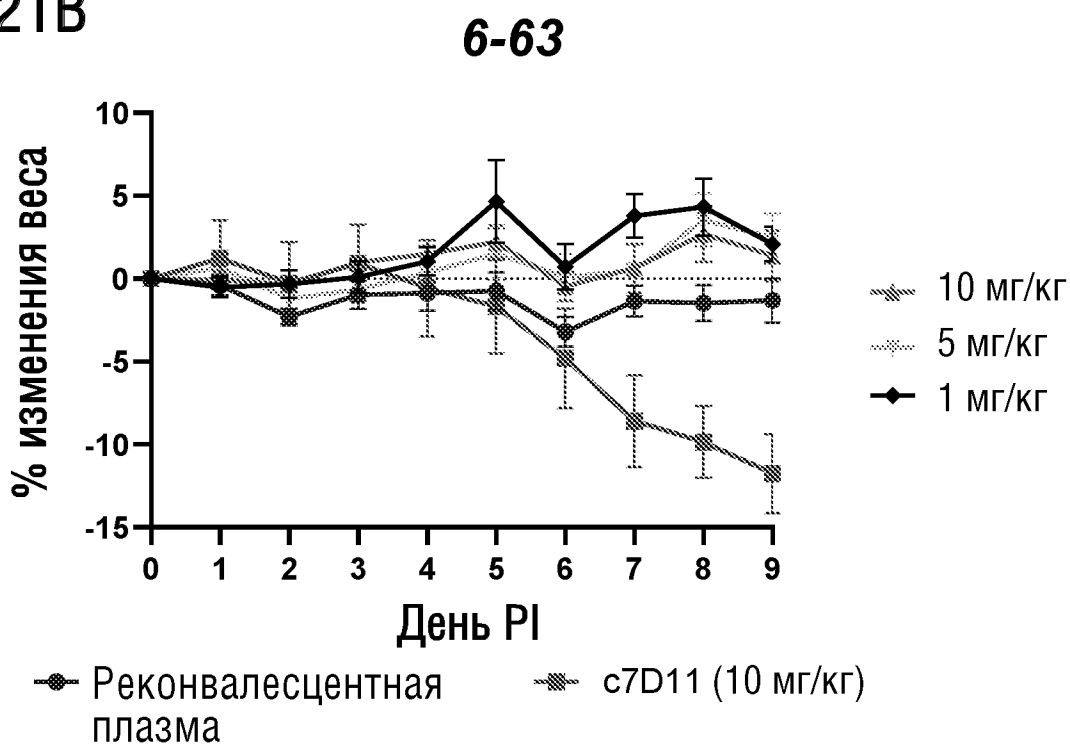


mAb	Реакция нейтрализации вируса		SARS-CoV-2 PRNT	
	NT50 (мкг/мл)	% нейтр., зарегистрированный при самой высокой испытанной концентрации (то есть 50 мкг/мл)	IC50 (мкг/мл)	IC90 (мкг/мл)
5-1	0.0376	85.92% ±4.25	0.48	1.44
5-20	0.04518	73.88% ±12.82	<0.16	0.50
5-34	0.04581	82.02% ±5.43	0.48	5.01
6-26	0.02178	80.53% ±4.64	4.15	35.19
6-60	0.01467	77.58% ±7.25	<0.16	0.34
6-63	0.00104	78.71% ±9.23	<0.16	1.58
6-3	0.007	66.14% ±11.79	<0.16	0.16
6-55	0.158	81.38% ±11.04	0.44	10.85
6-76	0.02864	76.21% ±6.94	0.99	3.70
6-78	0.8497	56.6% ±19.95	3.79	41.11
6-20	0.7153	56.83% ±16.48	1.49	11.68
6-73	0.1636	61.89% ±1.03	10.42	>50
6-85	0.06625	65.8% ±6.9	4.72	34.28
1-12	0.01941	73.6% ±3.4	0.40	2.23

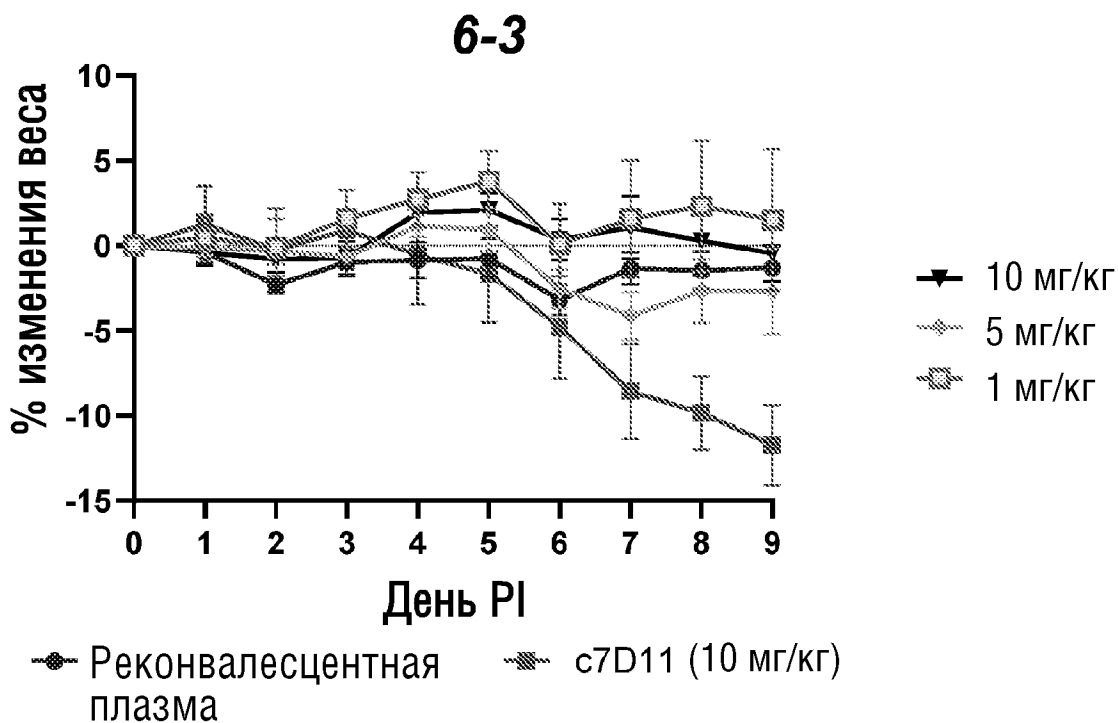
ФИГ.21А



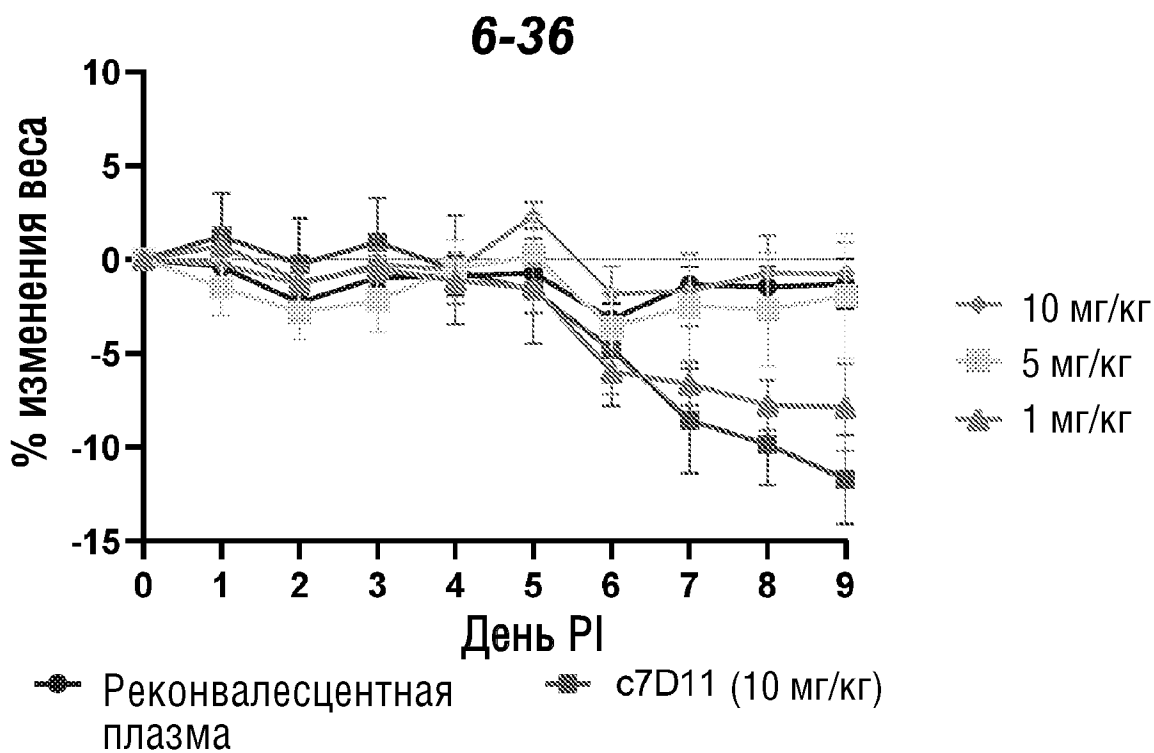
ФИГ.21В



ФИГ.21С

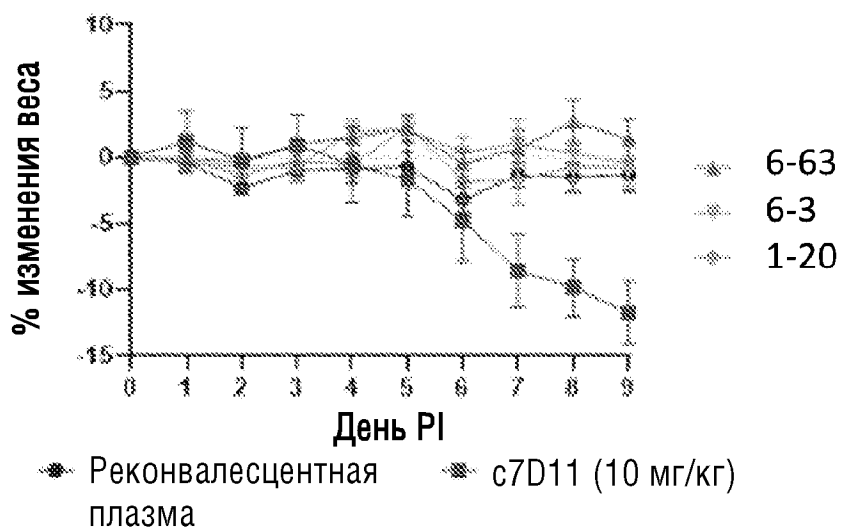


ФИГ.21D

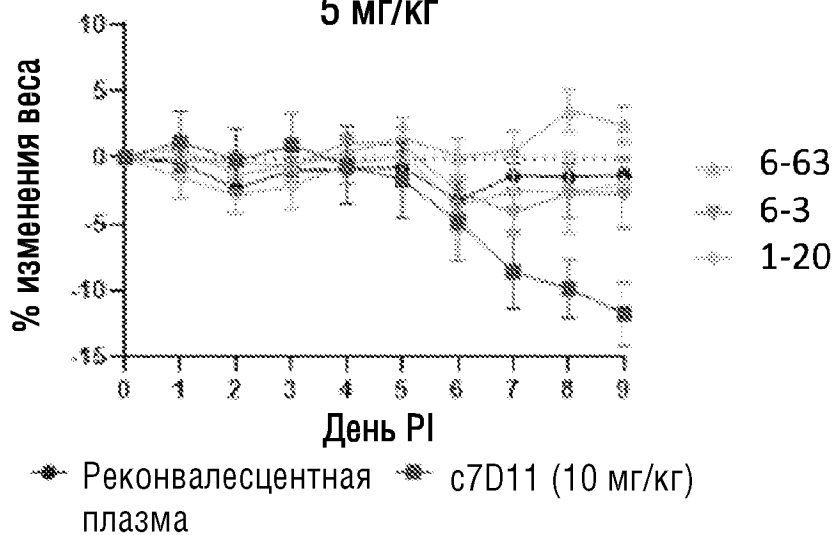


ФИГ.21Е

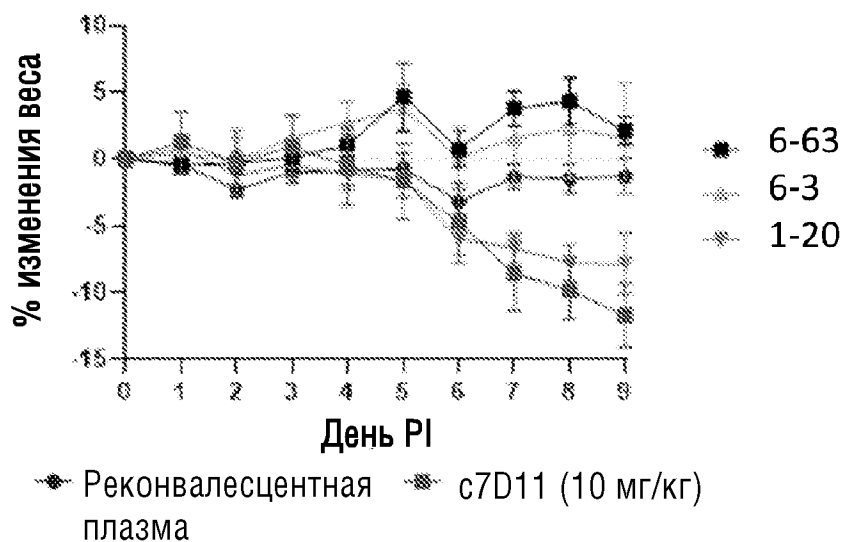
10 мг/кг



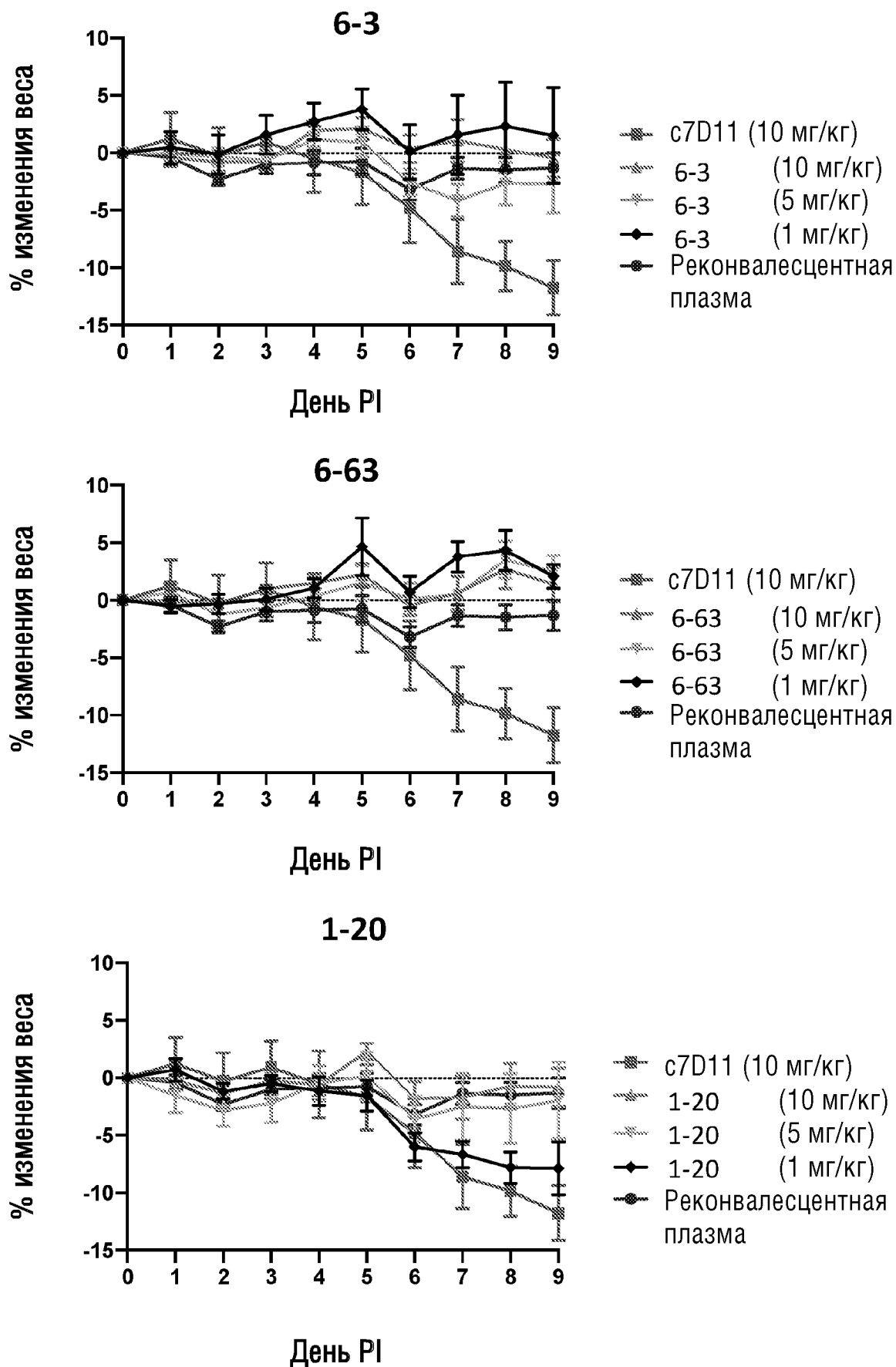
5 мг/кг



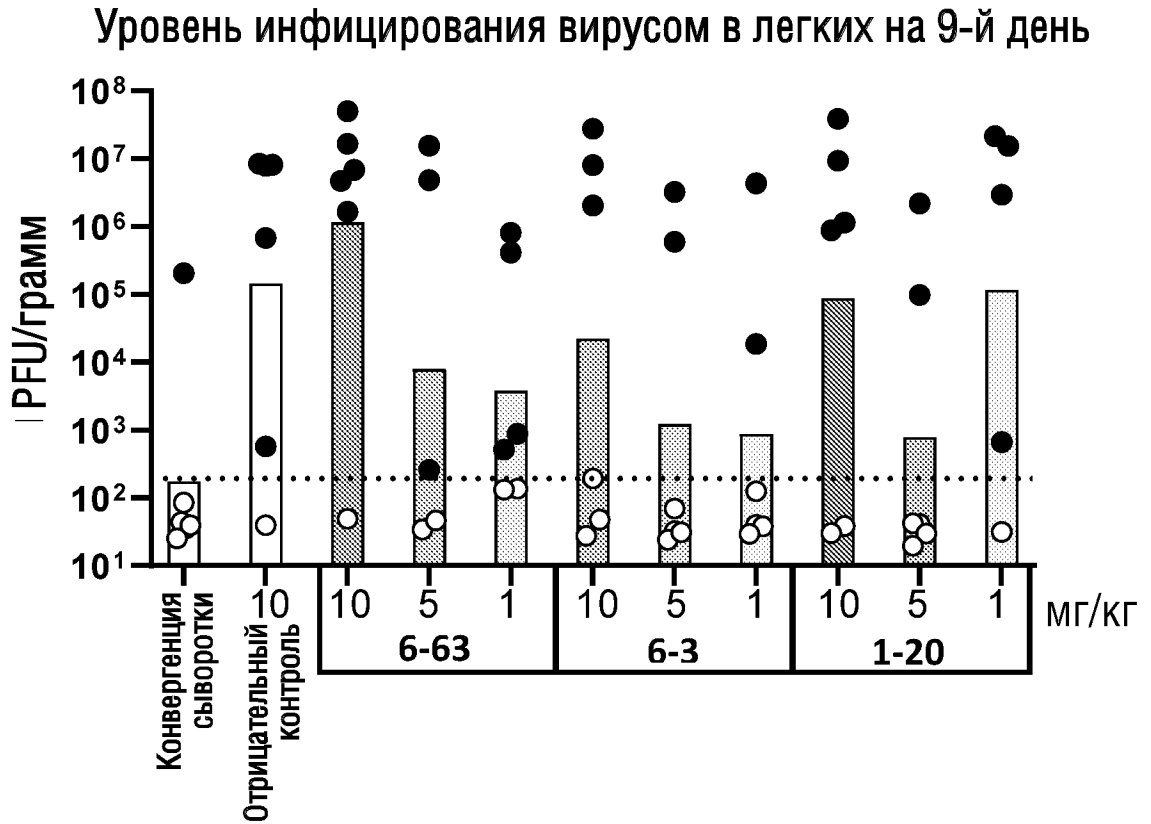
1 мг/кг



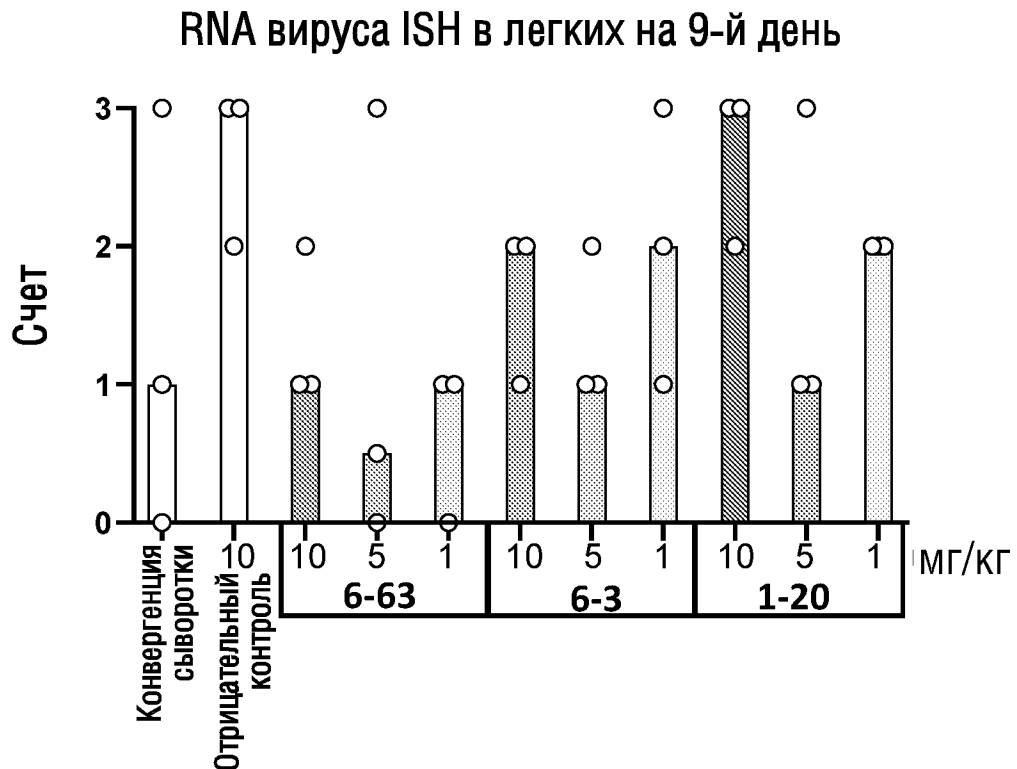
ФИГ.21F



ФИГ.21G

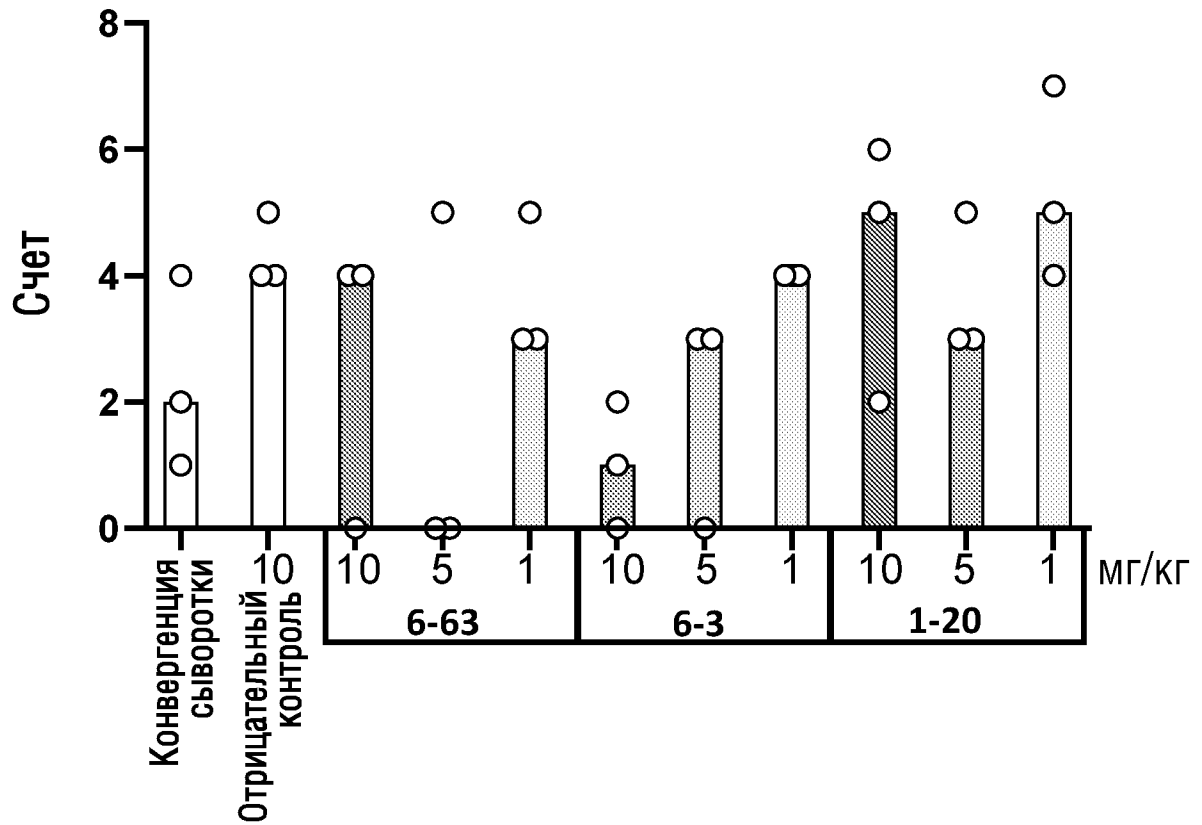


ФИГ.21H

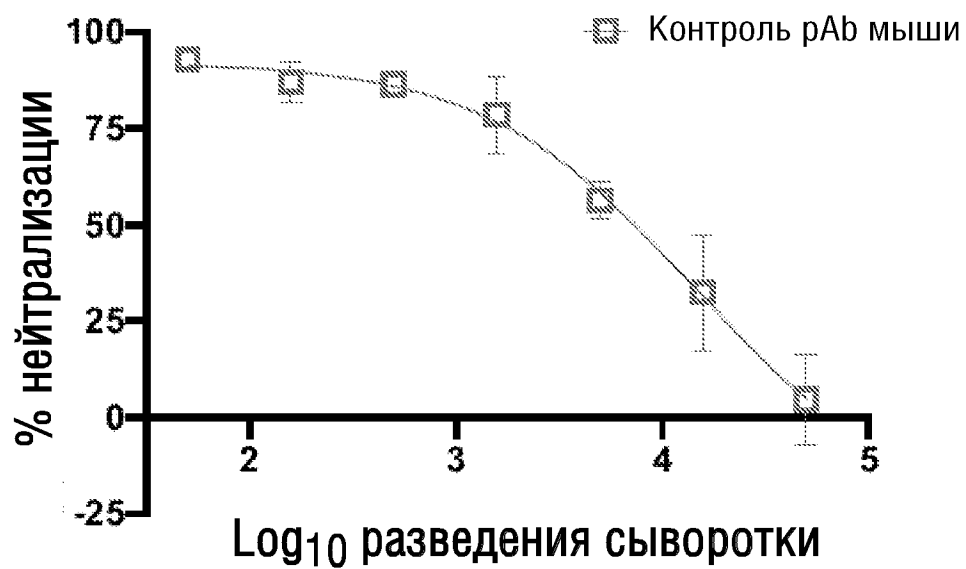


ФИГ.211

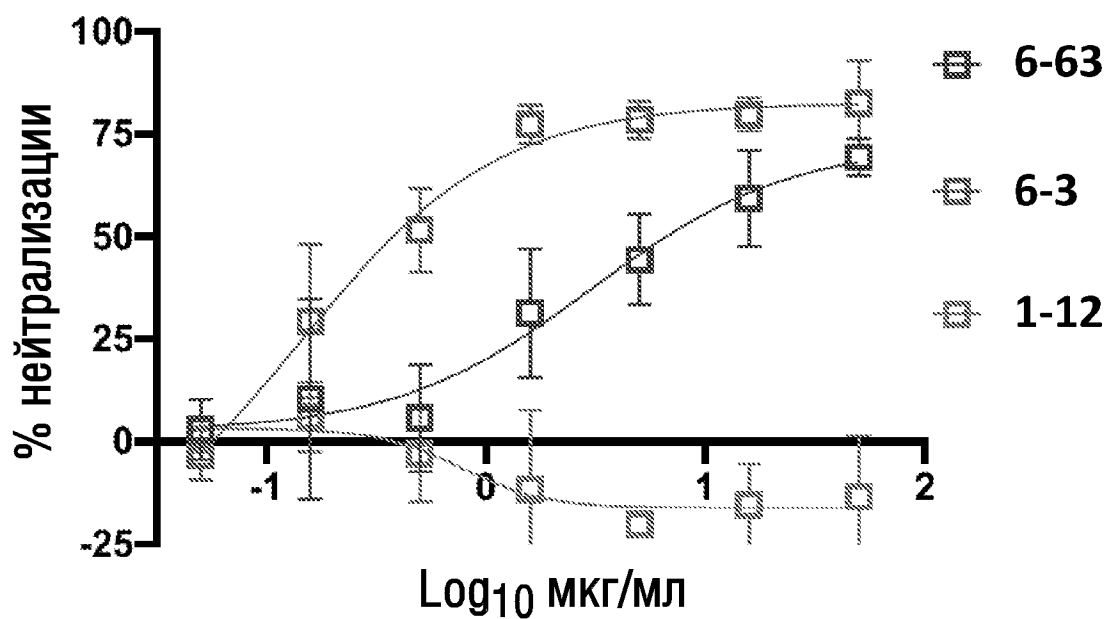
Воспаление и отек легких на 9-ый день



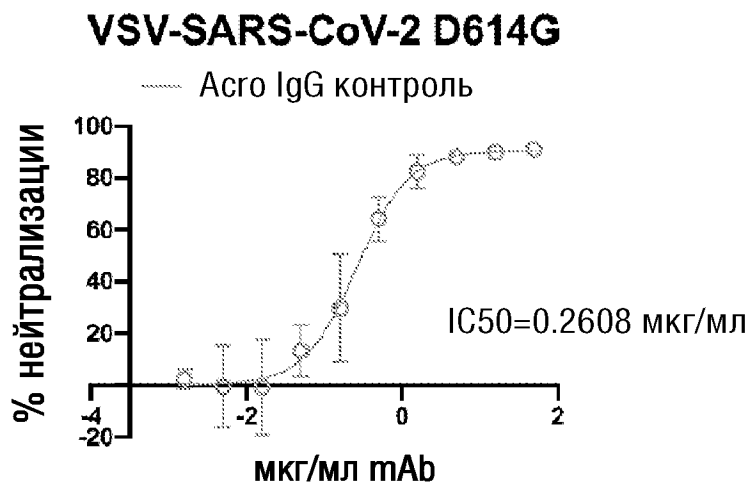
ФИГ.22А



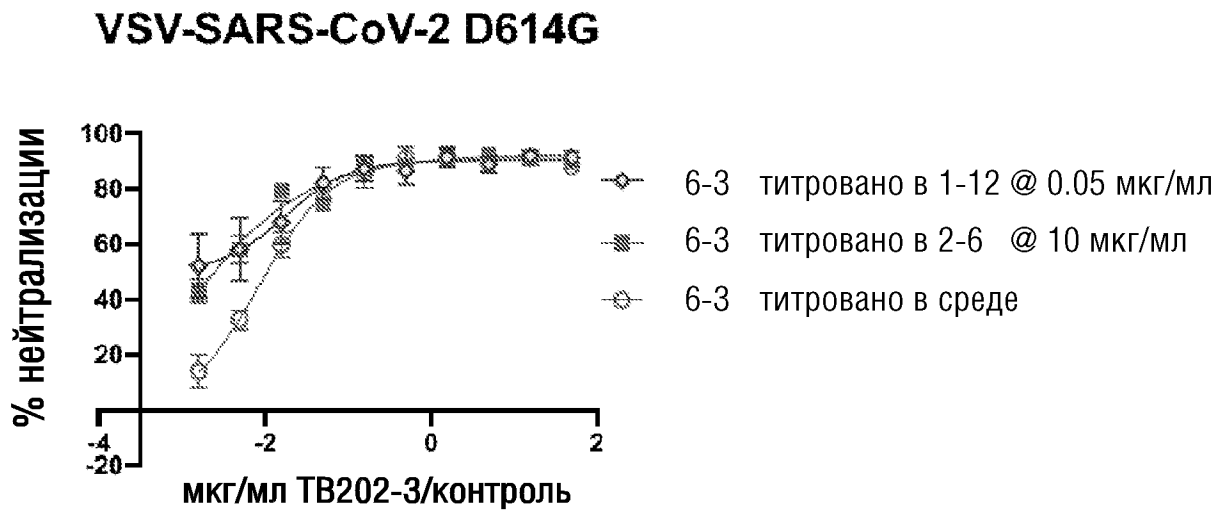
ФИГ.22В



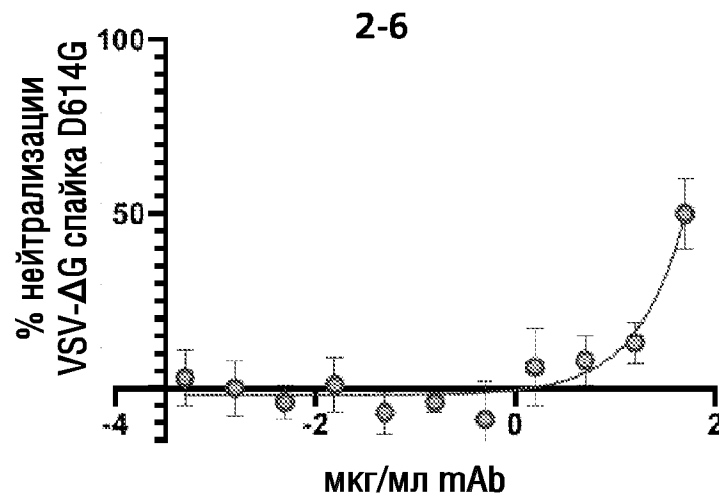
ФИГ.23А



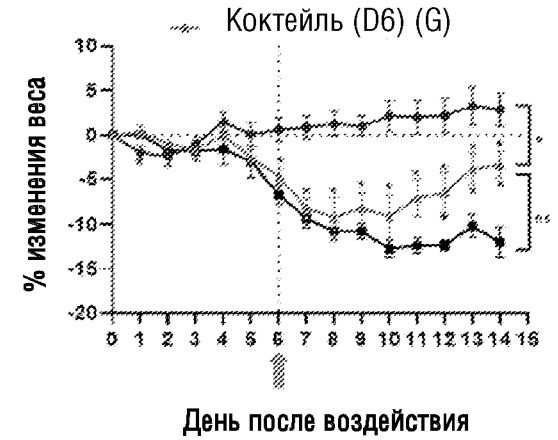
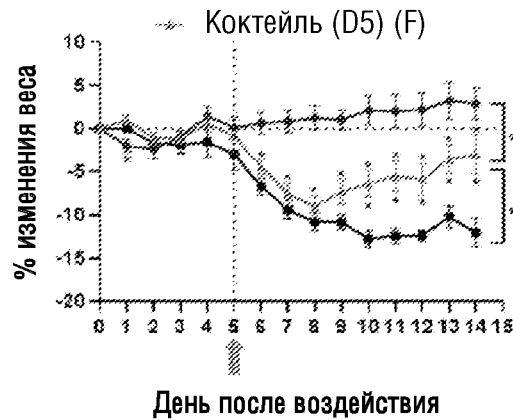
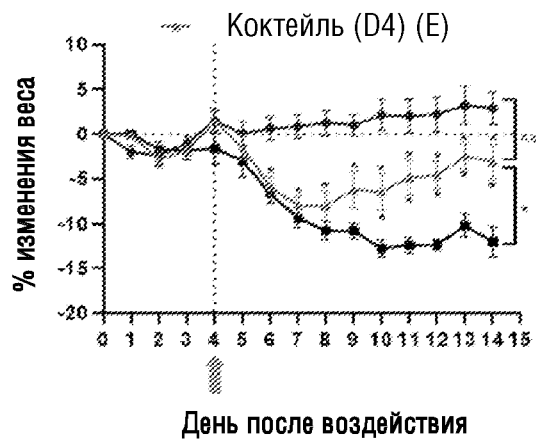
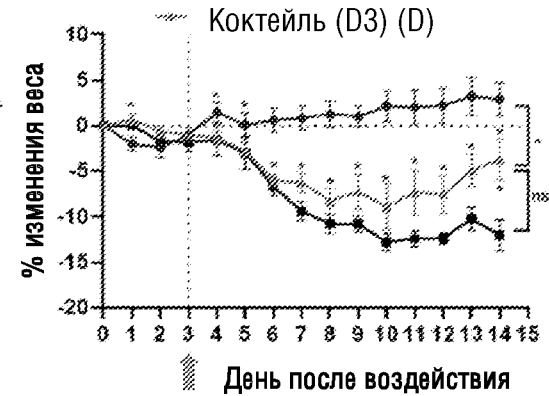
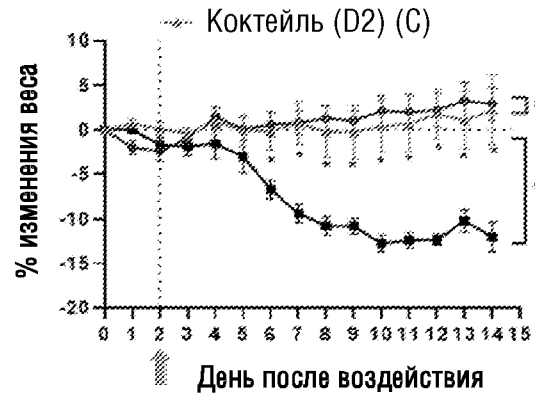
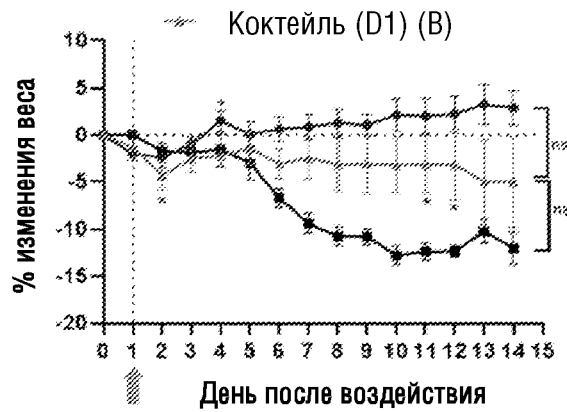
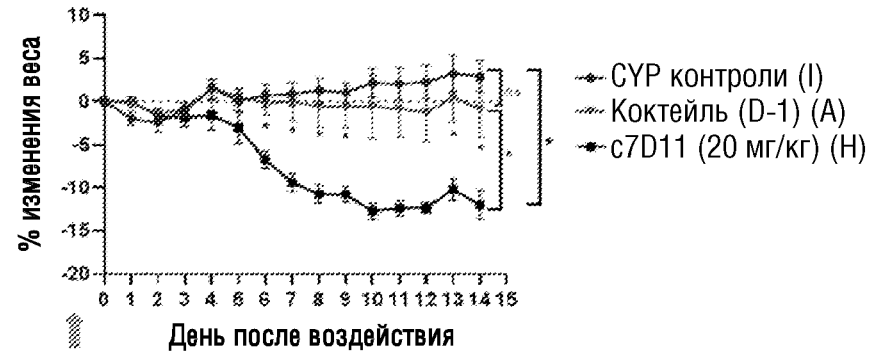
ФИГ.23В



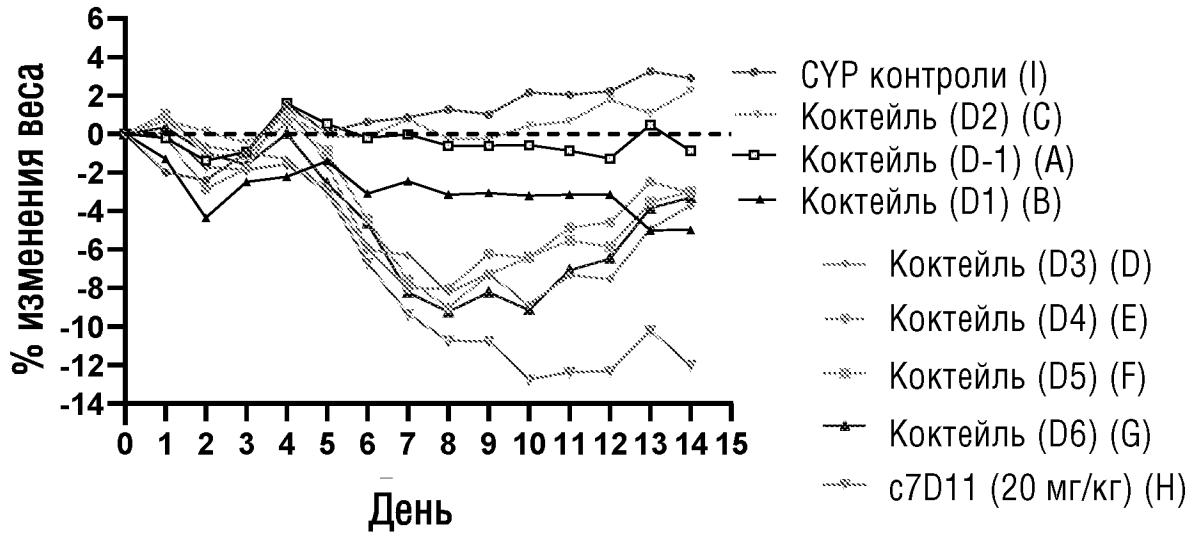
ФИГ.23С



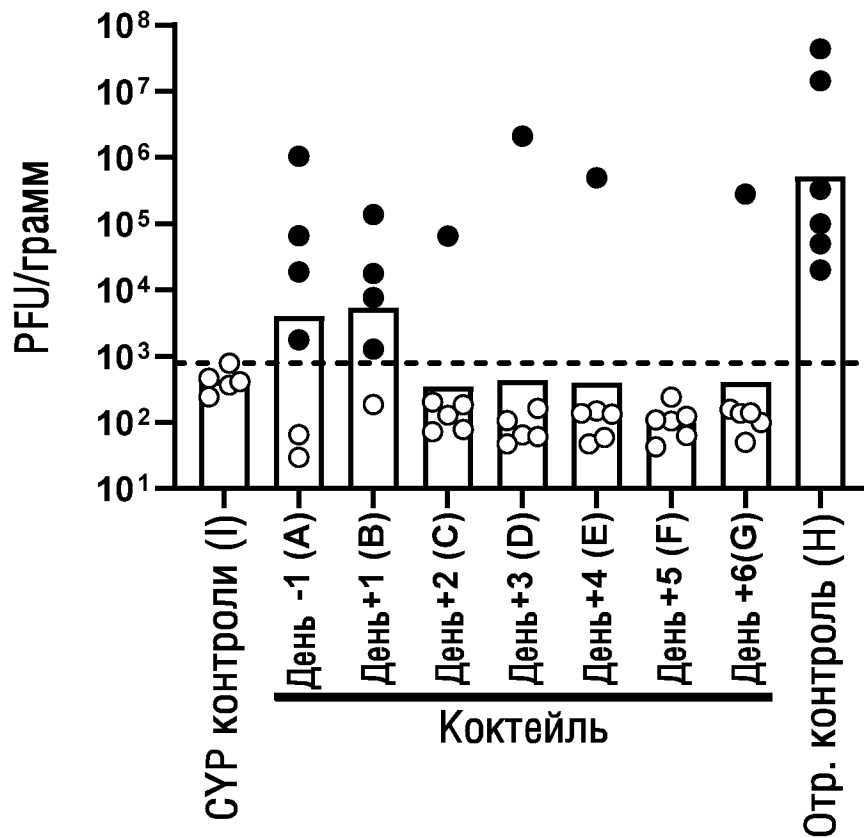
ФИГ.24А



ФИГ.24В



ФИГ.24С



ФИГ.24D

