

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293221 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.07

(51) Int. Cl. A61P 31/14 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.17

(54) АНТИТЕЛА К SARS-CoV-2 И СПОСОБЫ ИХ ОТБОРА И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/026,121

(32) 2020.05.17

(33) US

(86) PCT/EP2021/063008

(87) WO 2021/233834 2021.11.25

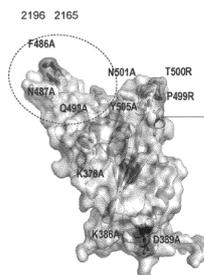
(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА ЮК ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Эссер Марк, Штайнхардт Джеймс,
Мактамни II Патрик, Лу Юэ-Мин,
Варки Рина М., Ду Цунь, Раджан
Сараванан (US)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

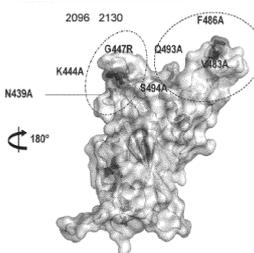
(57) В настоящем изобретении предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, и способы их получения и отбора. Антитела можно применять, например, при профилактике, профилактике после заражения или лечении инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Антитела также можно применять для выявления инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта.

Секция 1: область взаимодействия с ACE2



Внутренняя поверхность тримера

Секция 5: верхушечный домен



Внешняя поверхность тримера

A1

202293221
177867507

202293221

A1

АНТИТЕЛА К SARS-COV-2 И СПОСОБЫ ИХ ОТБОРА И ПРИМЕНЕНИЯ

1. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/026121, поданной 17 мая 2020 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

2. ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТОК, СПОНСИРУЕМЫХ НА ФЕДЕРАЛЬНОМ УРОВНЕ

[2] Настоящее изобретение было сделано при поддержке правительства в соответствии с HR00 11-18-2-0001, выданным Управлением перспективных исследовательских проектов Министерства обороны США (DARPA), и контрактом HHS 75N93019C00074, выданным Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний в составе Национальных институтов здравоохранения США. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

3. НАЗВАНИЯ СТОРОН СОГЛАШЕНИЯ О СОВМЕСТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

[3] Для целей параграфа 103(c)(2) раздела 35 USC между AstraZeneca Pharmaceuticals LP и Медицинским центром Университета Вандербильта было заключено соглашение о совместных исследованиях в отношении изобретения, связанного с антителами к COVID и путями их применения.

4. ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[4] Содержание перечня последовательностей, поданного в электронном виде в текстовом файле в формате ASCII (название 2943-153PC01_SL_ST25.txt; размер: 40379 байтов и дата создания: 11 мая 2021 г.), поданного вместе с настоящей заявкой, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

5. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[5] Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, и к способам их получения, отбора и применения.

6. ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Возникла пандемия коронавирусной инфекции 2019 г. (COVID 19), вызванная коронавирусом 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2). SARS-CoV-2 был впервые идентифицирован в Ухане, Китай, в декабре 2019 года, и он быстро вызвал инфекции во всем мире. Уровень смертности от вируса в настоящее время неизвестен, но

количество случаев заболевания и смертей в мире ошеломляет: по состоянию на май 2020 года во всем мире было подтверждено более четырех миллионов случаев заболевания и трехсот тысяч смертей. Вирус способен передаваться от человека к человеку через мелкие капли из носа или рта, которые выделяются, когда инфицированный человек кашляет, чихает или говорит. Инкубационный период (время от заражения до появления симптомов) находится в диапазоне от 0 до 24 дней, составляя в среднем 3-5 дней, но в этот период после выздоровления носитель может быть заразным. У большинства людей, заразившихся SARS-CoV-2, симптомы проявляются в течение 11,5 дня после заражения. Симптомы включают лихорадку, кашель и затрудненное дыхание. Вирус оказывает большее влияние на пациентов пожилого возраста, страдающих сахарным диабетом 2 типа, сердечными заболеваниями, хроническим обструктивным заболеванием легких (COPD) и/или ожирением. Большинство пациентов, заразившихся вирусом, имеют легкие симптомы, но у некоторых пациентов инфекция в легких протекает тяжело, вызывая тяжелый респираторный дистресс или даже смерть.

[7] По состоянию на май 2020 года не существует одобренной вакцины и специфического лечения, получившего одобрение научного и медицинского сообщества, хотя в настоящее время исследуются несколько подходов к вакцинам и противовирусным препаратам. Например, поскольку моноклональные антитела (mAb) человека к вирусному поверхностному шиповидному (S) гликопротеину опосредуют иммунитет к другим коронавирусным инфекциям, включая SARS-CoV-2 и ближневосточный респираторный синдром 68 (MERS), было высказано предположение, что mAb человека, нацеленные на шиповидные белки SARS-CoV-2, могут быть перспективны для применения в предупреждении и лечении инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Вспышка была объявлена Всемирной организацией здравоохранения (WHO) чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение (PHEIC), на основании возможных последствий, к которым может привести вирус, если он распространится в страны с более слабыми системами здравоохранения. Таким образом, существует острая потребность в лекарственных препаратах, способных предупреждать и лечить COVID-19.

7. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[8] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком (например, SEQ ID NO: 63) SARS-CoV-2, связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоты F486 и/или N487 (например, F486 и N487). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибируют

последовательность под SEQ ID NO: 61, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 41-46 соответственно или SEQ ID NO: 55-60 соответственно. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH под SEQ ID NO: 47 и/или VL под SEQ ID NO: 48 или содержат VH под SEQ ID NO: 61 и/или VL под SEQ ID NO: 62. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH под SEQ ID NO: 61 и/или VL под SEQ ID NO: 62.

[9] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоты G447 и/или K444 (например, G447 и K444). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибируют связывание с шиповидным белком SARS-CoV-2 антитела, содержащего (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; или (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; или (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с тем же эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, что и антитело, содержащее (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; или (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) переменную

область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; или (ii) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

[10] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно реагируют с SARS-CoV. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не реагируют перекрестно с SARS-CoV.

[11] В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибируют связывание SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2).

[12] В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент нейтрализуют SARS-CoV-2.

[13] В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются полностью человеческими. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

[14] В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи. В некоторых аспектах константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей тяжелой цепи иммуноглобулинов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 человека, где константная область тяжелой цепи необязательно относится к IgG1 человека. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи. В некоторых аспектах константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей легкой цепи иммуноглобулинов IgG κ и IgG λ человека, где константная область легкой цепи необязательно представляет собой константную область легкой цепи IgG κ человека. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) константную область тяжелой цепи IgG1 человека и (ii) константную область легкой цепи IgG κ человека. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию YTE, где константная область тяжелой цепи человека необязательно представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1 человека, и константную область легкой цепи, где константная область легкой цепи необязательно представляет собой константную область легкой цепи IgG κ человека. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию TM, где константная область тяжелой цепи

человека необязательно представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1 человека, и константную область легкой цепи, где константная область легкой цепи необязательно представляет собой константную область легкой цепи IgGк человека.

[15] В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полноразмерное антитело. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент включает в себя Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), Fv, стабилизированный дисульфидными связями, домен V-NAR, IgNar, IgGΔCH₂, миниантитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, (scFv)₂ или scFv-Fc.

[16] В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются выделенными. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются моноклональными. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются рекомбинантными.

[17] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат детектируемую метку.

[18] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, выделенный полинуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предусмотренных в данном документе.

[19] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, выделенный вектор содержит полинуклеотид, предусмотренный в данном документе.

[20] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, предусмотренный в данном документе, вектор, предусмотренный в данном документе, или первый вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи, и второй вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предусмотренных в данном документе.

[21] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, включает культивирование клетки-хозяина, предусмотренной в данном документе, таким образом, чтобы экспрессировалась молекула нуклеиновой кислоты и продуцировались антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых

аспектах способ дополнительно включает выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

[22] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают посредством способа, предусмотренного в данном документе.

[23] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ отбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включает определение того, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащим аминокислоты F486 и/или N487 (например, F486 и N487), и отбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах определение включает измерение способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим F486A и/или N487, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не отбирают, если они связываются с мутантным белком. В некоторых аспектах определение включает измерение способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим F486A и/или N487A (например, F486A и N487A), и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не отбирают, если они связываются с мутантным белком. Как используется во всем настоящем раскрытии, "способ отбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента" может быть предназначен для отбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для применения в любом из следующего: (i) ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2; (ii) способа нейтрализации SARS-CoV-2; (iii) способа лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2; (iv) способа снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2; (v) способа выявления SARS-CoV-2 в образце.

[24] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент отбирают посредством способа, предусмотренного в данном документе.

[25] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ отбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включает определение того, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащим аминокислоты G447 и/или K444 (например, G447 и K444), и отбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах определение включает измерение способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим G447R и/или K444 (например, G447R и K444), и антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент не отбирают, если они связываются с мутантным белком. В некоторых аспектах определение включает измерение способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим G447R и/или K444A (например, G447R и K444A), и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не отбирают, если они связываются с мутантным белком.

[26] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент отбирают посредством способа, предусмотренного в данном документе.

[27] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе. В некоторых аспектах композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[28] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, композиция содержит (i) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка.

[29] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, композиция содержит (i) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444).

[30] В некоторых аспектах первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с неперекрывающимися эпитопами, и/или при этом первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны одновременно связываться с тримером шиповидного домена SARS-CoV-2.

[31] В некоторых аспектах первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, и/или второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе.

[32] В некоторых аспектах композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

[33] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ отбора комбинации антител или их антигенсвязывающих фрагментов для применения при лечении или предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, включает определение того, что первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащим аминокислоты F486 и/или N487 (например, F486 и N487), определение того, что второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащим аминокислоты G447 и/или K444 (например, G447 и K444), и отбор двух антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых аспектах определение включает измерение способности первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим F486A и/или N487A, и/или измерение способности второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим G447R и/или K444A, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не отбирают, если они связываются с мутантным белком.

[34] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, композиция содержит комбинацию антител или их антигенсвязывающих фрагментов, отобранных посредством способа, предусмотренного в данном документе.

[35] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2 включает приведение SARS-CoV-2 в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом или композицией, предусмотренными в данном документе. Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанным антителу или антигенсвязывающему фрагменту или композиции, предусмотренным в данном документе, для применения в указанном способе ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2.

[36] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2 включает приведение SARS-CoV-2 в контакт с (i) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые

специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка. Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанному первому и указанному второму антителу или антигенсвязывающему фрагменту для применения в указанном способе ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2.

[37] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2 включает приведение SARS-CoV-2 в контакт с (i) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), и (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444). Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанному первому и указанному второму антителу или антигенсвязывающему фрагменту для применения в указанном способе ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2.

[38] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ нейтрализации SARS-CoV-2 включает приведение SARS-CoV-2 в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом или композицией, предусмотренными в данном документе. Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанным антителу или антигенсвязывающему фрагменту или композиции, предусмотренным в данном документе, для применения в указанном способе нейтрализации SARS-CoV-2.

[39] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ нейтрализации SARS-CoV-2 включает приведение SARS-CoV-2 в контакт с (i) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка. Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанному первому и указанному второму антителу или антигенсвязывающему фрагменту для применения в указанном способе нейтрализации SARS-CoV-2.

[40] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ нейтрализации SARS-CoV-2 включает приведение SARS-CoV-2 в контакт с (i) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), и (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444). Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанному первому и указанному второму антителу или антигенсвязывающему фрагменту для применения в указанном способе нейтрализации SARS-CoV-2.

[41] В некоторых аспектах приведение в контакт осуществляют *in vitro*. В некоторых аспектах приведение в контакт осуществляют в организме субъекта.

[42] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта включает введение субъекту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента или композиции, предусмотренных в данном документе. Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанным антителу или антигенсвязывающему фрагменту или композиции, предусмотренным в данном документе, для применения в указанном способе лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.

[43] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта включает введение субъекту (i) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка. Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к

указанному первому и указанному второму антителу или антигенсвязывающему фрагменту для применения в указанном способе лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.

[44] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта включает введение субъекту (i) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), и (ii) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444). Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанному первому и указанному второму антителу или антигенсвязывающему фрагменту для применения в указанном способе лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.

[45] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, включает введение субъекту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента или композиции, предусмотренных в данном документе. Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанным антителу или антигенсвязывающему фрагменту или композиции, предусмотренным в данном документе, для применения в указанном способе снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2.

[46] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, включает введение субъекту (i) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка. Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанному первому и указанному второму антителу или антигенсвязывающему фрагменту

для применения в указанном способе снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2.

[47] В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, способ снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, включает введение субъекту (i) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), и (ii) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444). Также предусмотрен соответствующий аспект, относящийся к указанному первому и указанному второму антителу или антигенсвязывающему фрагменту для применения в указанном способе снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2.

[48] В некоторых аспектах первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с неперекрывающимися эпитопами, и/или при этом первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны одновременно связываться с тримером шиповидного домена SARS-CoV-2. В некоторых аспектах первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе.

[49] В некоторых аспектах первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно. В некоторых аспектах первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в отдельных фармацевтических композициях. В некоторых аспектах первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят последовательно.

[50] В некоторых аспектах субъект был заражен SARS-CoV-2 или имеет риск заражения SARS-CoV-2. В некоторых аспектах субъектом является человек.

[51] В некоторых аспектах способ (например, способ *in vitro*) выявления SARS-CoV-2 в образце (например, выделенном образце, полученном от субъекта) включает приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или композицией,

предусмотренными в данном документе. Примеры подходящих образцов включают образец из носоглотки (например, образец мазка) и образец слюны. Образец может представлять собой выделенный образец, полученный от субъекта (например, человека).

[52] В некоторых аспектах набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или композицию, предусмотренные в данном документе, и а) реагент для выявления, б) антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, с) уведомление, отражающее одобрение для применения или продажи для введения человеку, или d) их комбинацию.

8. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[53] На **фиг. 1** показана активность различных антител при нейтрализации SARS-CoV-2 дикого типа (слева) и псевдовируса (справа).

[54] На **фиг. 2** показана корреляция между анализами нейтрализации псевдовируса и SARS-CoV-2 дикого типа.

[55] На **фиг. 3** показана способность различных антител связываться с RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 (слева) и тримером шиповидного белка SARS-CoV-2 (справа).

[56] На **фиг. 4** обобщенно представлена активность различных комбинаций антител при нейтрализации псевдовируса.

[57] На **фиг. 5A и 5B** показан синергизм комбинации антитела 2196 и антитела 2130 (фиг. 5A) и антитела 2196 и антитела 2096 (фиг. 5B) при различных концентрациях. В рамке указана область с максимальным синергизмом.

[58] На **фиг. 6A-6E** показаны результаты сканирующего анализа мутаций для идентификации сайтов связывания в шиповидном белке SARS-CoV-2 для антител 2615 (фиг. 6A), 2130 (фиг. 6B), 2094 (фиг. 6C), 2196 (фиг. 6D) и 2096 (фиг. 6E).

[59] На **фиг. 7** показаны результаты сканирующего анализа мутаций для идентификации сайтов связывания антител в шиповидном белке SARS-CoV-2 в области взаимодействия с ACE2 (антител секции 1).

[60] На **фиг. 8** показаны результаты сканирующего анализа мутаций для идентификации сайтов связывания в шиповидном белке SARS-CoV-2 для антител секции 4 (2094) и секции 5 (2096 и 2130).

[61] На **фиг. 9** показаны трехмерные структуры тримера шиповидного белка SARS-CoV-2 и выделены остатки тримера, с которыми контактируют антитела.

9. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[62] В данном документе предусмотрены антитела (например, моноклональные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с

шиповидным белком SARS-CoV-2, и способы их получения, отбора и применения. SARS-CoV-2 (например, имеющий последовательность под регистрационным номером NCBI: NC_045512) также может называться "штаммом коронавируса, вызывающим COVID-19", а также может использоваться взаимозаменяемо с терминами "новый коронавирус 2019 г." (2019-nCoV) и "коронавирус человека 2019 г." (hCoV-19 или hCoV-19).

9.1 Терминология

[63] Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает мишень, такую как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеуказанного, и специфично связывается с ней посредством по меньшей мере одного антигенраспознающего центра в пределах варибельной области молекулы иммуноглобулина. Термин "антитело", используемый в данном документе, охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые белки, содержащие антитело, а также любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина при условии, что антитела проявляют требуемую биологическую активность. Антитело может относиться к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) на основании идентичности их константных доменов тяжелой цепи, обозначаемых соответственно как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю. Разные классы иммуноглобулинов имеют различные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные пространственные конфигурации. Антитела могут быть "голыми" или конъюгированными с другими молекулами, такими как токсины, радиоактивные изотопы и т. д.

[64] Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела. "Антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающий домен" или "антигенсвязывающая область" относится к части интактного антитела, которая связывается с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать области интактного антитела, распознающие антиген (например, определяющие комплементарность области (CDR)). Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают без ограничения Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, линейные антитела и одноцепочечные антитела. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен из любого вида животных, таких как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк), и у людей или может быть получен искусственно.

[65] Термины "антитело к шиповидному белку SARS-CoV-2", "антитело против шиповидного белка SARS-CoV-2" и "антитело, которое связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения

антитела, которое способно связываться с шиповидным белком SARS-CoV-2 с достаточной аффинностью, так что это антитело является применимым в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на SARS-CoV-2. Степень связывания антитела к шиповидному белку SARS-CoV-2 с неродственным шиповидным белком, не относящимся к SARS-CoV-2, может составлять менее чем приблизительно 10% от связывания антитела с шиповидным белком SARS-CoV-2 согласно измерению, например, с помощью ForteBio или Biacore. В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, антитело к шиповидному белку SARS-CoV-2 также способно связываться с шиповидным белком SARS-1. В некоторых аспектах, предусмотренных в данном документе, антитело к шиповидному белку SARS-CoV-2 не связывается с шиповидным белком SARS-1.

[66] "Моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к гомогенной популяции антител или их антигенсвязывающих фрагментов, участвующих в высокоспецифичном распознавании и связывании одной антигенной детерминанты или эпитопа. Этим они отличаются от поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант. Термин "моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент охватывает как интактные и полноразмерные моноклональные антитела, так и фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) мутантные формы, слитые белки, содержащие часть антитела, и любые другие модифицированные молекулы иммуноглобулина, содержащие антигенраспознающий центр. Кроме того, "моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к таким антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые получены любым из ряда методов, в том числе без ограничения с помощью гибридомы, отбора с использованием фагового дисплея, рекомбинантной экспрессии и трансгенных животных.

[67] Используемые в данном документе термины "вариабельная область" или "вариабельный домен" используются взаимозаменяемо и являются общепринятыми в данной области техники. Вариабельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой или тяжелой цепи, обычно к приблизительно 110-120 аминоконцевым аминокислотам или 110-125 аминоконцевым аминокислотам в зрелой тяжелой цепи и к приблизительно 90-115 аминоконцевым аминокислотам в зрелой легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и определения специфичности конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Вариабельность последовательности сосредоточена в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), тогда как

более высококонсервативные области в переменном домене называются каркасными областями (FR). Не желая ограничиваться каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие и специфичность антитела в отношении антигена. В некоторых аспектах переменная область представляет собой переменную область человека. В некоторых аспектах переменная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) человека. В некоторых аспектах переменная область представляет собой переменную область приматов (например, приматов, отличных от человека). В некоторых аспектах переменная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) приматов (например, приматов, отличных от человека).

[68] Термин "определяющая комплементарность область" или "CDR", используемый в данном документе, относится к каждой из областей переменного домена антитела, которые являются гиперпеременными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли (гиперпеременные петли) и/или содержат остатки, контактирующие с антигеном. Антитела могут содержать шесть CDR, например, три в VH и три в VL.

[69] Термины "VL" и "VL-домен" используются взаимозаменяемо для обозначения переменной области легкой цепи антитела.

[70] Термины "VH" и "VH-домен" используются взаимозаменяемо для обозначения переменной области тяжелой цепи антитела.

[71] Термин "нумерация по Kabat" и подобные термины общепризнаны в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в переменных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах CDR могут быть определены в соответствии с системой нумерации по Kabat (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) *Ann NY Acad Sci* 190: 382-391 и Kabat EA *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Согласно используемой системе нумерации по Kabat CDR в молекуле тяжелой цепи антитела, как правило, присутствуют в положениях аминокислот с 31 по 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие после 35 (обозначены в схеме нумерации по Kabat как 35A и 35B) (CDR1), положениях аминокислот с 50 по 65 (CDR2) и положениях аминокислот с 95 по 102 (CDR3). Согласно используемой системе нумерации по Kabat CDR в молекуле легкой цепи антитела, как правило, присутствуют в положениях аминокислот с 24 по 34 (CDR1), в положениях аминокислот с 50 по 56 (CDR2) и в положениях аминокислот с 89 по 97 (CDR3).

[72] В отличие от этого, Chothia ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьируется от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что в соответствии со схемой нумерации по Kabat вставки расположены в H35A и H35B; при этом если не присутствуют ни 35A, ни 35B, то петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, то петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, то петля заканчивается на 34). Определение гипервариабельных областей по AbM представляет собой компромисс между определением CDR по Kabat и структурных петель по Chothia и используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular.

Петля	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		<u>(нумерация по Kabat)</u>	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		<u>(нумерация по Chothia)</u>	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[73] Используемые в данном документе термины "константная область" или "константный домен" являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятое в данной области техники значение. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но может демонстрировать различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область или ее часть, достаточную для антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC).

[74] Используемый в данном документе термин "тяжелая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, альфа (α),

дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основании аминокислотной последовательности константного домена, которые служат основанием для выделения классов антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей хорошо известны из уровня техники. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека.

[75] Используемый в данном документе термин "легкая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легких цепей хорошо известны из уровня техники. В некоторых аспектах легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

[76] Термин "химерные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, где аминокислотная последовательность происходит из двух или более видов. Варибельная область как легкой, так и тяжелой цепей, как правило, соответствует варибельной области антител или их антигенсвязывающих фрагментов, происходящих из одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), с требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью, тогда как константные области гомологичны последовательностям в антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, происходящих из другого вида (обычно человека), во избежание вызывания иммунного ответа у этого вида.

[77] Термин "гуманизированное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам отличным от человеческих (например, мышинных) антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальные отличные от человеческих (например, мышинные) последовательности. Как правило, гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки определяющей комплементарности области (CDR) заменены остатками CDR видов, отличных от человека (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые характеризуются необходимой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью ("с привитыми CDR") (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)). В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками антитела или его фрагмента из вида, отличного от человека, которые характеризуются

требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью. Гуманизированные антитела или его антигенсвязывающий фрагмент можно дополнительно модифицировать посредством замены дополнительных остатков в каркасной области Fv и/или в замененных остатках нечеловеческого происхождения для усовершенствования и оптимизации специфичности, аффинности и/или способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В целом, гуманизированные антитела или его антигенсвязывающий фрагмент будут содержать практически все из по меньшей мере одного, и, как правило, двух или трех переменных доменов, содержащих все или практически все CDR-области, которые соответствуют таковым в иммуноглобулине, отличном от человеческого, тогда как все или практически все из FR-областей являются таковыми из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированные антитела или его антигенсвязывающий фрагмент также могут содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Примеры способов, применяемых для получения гуманизированных антител, описаны в патенте США 5225539; Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994), и Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). В некоторых аспектах "гуманизированное антитело" представляет собой антитело с измененной поверхностью.

[78] Термин "антитело человека" или его антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие аминокислотную последовательность, полученную из локуса гена иммуноглобулина человека, где такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получены с использованием любой методики, известной из уровня техники. Это определение антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента включает интактные или полноразмерные антитела и их фрагменты.

[79] "Аффинность связывания" в целом относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, как используется в данном документе, "аффинность связывания" относится к внутренне присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y в целом может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить и/или выразить рядом способов, известных из уровня техники, включая без ограничения равновесную константу диссоциации (K_D) и равновесную константу

ассоциации (K_A). K_D рассчитывается как соотношение k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывается как соотношение k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, и k_{off} относится к диссоциации, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента от антигена. k_{on} и k_{off} можно определить посредством методик, известных среднему специалисту в данной области, таких как BIAcore® или KinExA.

[80] Используемый в данном документе термин "эпитоп" известен из уровня техники и относится к локализованной области антигена, с которой может специфично связываться антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, происходить из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или непрерывный эпитоп). В некоторых аспектах эпитоп, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурных кристаллографических исследований, анализов методом ELISA, водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализов методом сканирования олигопептидов на основе микроматриц и/или картирующего мутагенеза (например, картирующего сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно выполнять с использованием любой из известных из уровня техники методик (например, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Кристаллы антитела/его антигенсвязывающий фрагмент:антиген можно изучать с использованием хорошо известных методик рентгеноструктурного анализа и можно уточнять с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; US 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed. Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования методом картирующего мутагенеза можно выполнять с использованием любого способа, известного специалисту в данной области. См., например, Champe M *et al.*, (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 в отношении описания методик мутагенеза, включая методики аланин-сканирующего мутагенеза.

[81] Антитело, которое "связывается с тем же эпитопом", что и эталонное антитело, относится к антителу, которое связывается с теми же аминокислотными остатками, что и эталонное антитело. Способность антитела связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, можно определить с помощью анализа водородно-дейтериевого обмена (см., например, Coales et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 639-647).

[82] Используемые в данном документе термины "иммуноспецифично связывается", "иммуноспецифично распознает", "специфично связывает" и "специфично распознает" являются аналогичными терминами применительно к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам. Эти термины указывают на то, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что связывание предполагает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Соответственно, в некоторых аспектах антитело, которое "специфично связывается" с шиповидным белком SARS-CoV-2, может также связываться с шиповидным белком одного или нескольких родственных вирусов (например, SARS-1) и/или также может связываться с вариантами шиповидного белка SARS-CoV-2, но степень связывания с неродственным шиповидным белком, не относящимся к SARS-CoV-2, составляет менее чем приблизительно 10% от связывания антитела с шиповидным белком SARS-CoV согласно измерению, например, с помощью ForteBio или Biacore.

[83] Говорят, что антитело "конкурентно ингибирует" связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно преимущественно связывается с этим эпитопом или перекрывающимся эпитопом в такой степени, что оно в некоторой степени блокирует связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определить с помощью любого способа, известного из уровня техники, например, с помощью конкурентных анализов методом ELISA. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 50%.

[84] Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые являются "выделенными", представляют собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которые представлены в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают таковые, которые были очищены до такой степени, что они больше не представлены в такой форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых аспектах антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые являются

выделенными, являются практически чистыми. Используемый в данном документе термин "практически чистый" относится к материалу, который является на по меньшей мере 50% чистым (т. е. свободным от контаминантов), на по меньшей мере 90% чистым, на по меньшей мере 95% чистым, на по меньшей мере 98% чистым или на по меньшей мере 99% чистым.

[85] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к полимерам из аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться компонентами, не являющимися аминокислотами. Данные термины также охватывают полимер из аминокислот, который был модифицирован естественным путем или посредством вмешательства; например, посредством образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгирование с метящим компонентом. В объем данного определения также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислот (в том числе, например, неприродные аминокислоты и т.п.), а также другие модификации, известные из уровня техники. Следует понимать, что поскольку в основе полипептидов согласно настоящему изобретению лежат антитела, в некоторых аспектах данные полипептиды могут встречаться в виде одиночных цепей или ассоциированных цепей.

[86] "Процент идентичности" относится к степени идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот). Процент идентичности может быть определен путем выравнивания двух последовательностей с введением гэпов для доведения до максимума идентичности между последовательностями. Выравнивание можно построить с использованием программ, известных из уровня техники. Для целей данного документа выравнивание нуклеотидных последовательностей может быть выполнено с помощью программы `blastn` с установленными параметрами по умолчанию, а выравнивание аминокислотных последовательностей может быть выполнено с помощью программы `blastp` с установленными параметрами по умолчанию (см. Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во Всемирной паутине, ncbi.nlm.nih.gov).

[87] Используемые в данном документе аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями включают аланин (A), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V), фенилаланин (F), триптофан (W) и тирозин (Y). Аминокислоты с алифатическими гидрофобными боковыми цепями включают аланин (A), изолейцин (I), лейцин (L),

метионин (M) и валин (V). Аминокислоты с ароматическими гидрофобными боковыми цепями включают фенилаланин (F), триптофан (W) и тирозин (Y).

[88] Используемые в данном документе аминокислоты с полярными нейтральными боковыми цепями включают аспарагин (N), цистеин (C), глутамин (Q), серин (S) и треонин (T).

[89] Используемые в данном документе аминокислоты с электрически заряженными боковыми цепями включают аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), аргинин (R), гистидин (H) и лизин (K). Аминокислоты с кислыми электрически заряженными боковыми цепями включают аспарагиновую кислоту (D) и глутаминовую кислоту (E). Аминокислоты с основными электрически заряженными боковыми цепями включают аргинин (R), гистидин (H) и лизин (K).

[90] Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" может относиться к любому типу клеток, например, первичной клетке, клетке в культуре или клетке из линии клеток. В некоторых аспектах термин "клетка-хозяин" относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным исходной клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например, ввиду мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут возникнуть в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[91] Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который представлен в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить состав. Состав может быть стерильным.

[92] Термины "вводить", "осуществление введения", "введение" и т. п., используемые в данном документе, относятся к способам, которые можно применять для осуществления доставки лекарственного средства, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, к требуемому месту биологического действия (например, к внутривенному введению). Методики введения, которые можно использовать в отношении средств и способов, описанных в данном документе, можно найти, например, в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, текущее издание, Pergamon; and Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, текущее издание, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

[93] Используемые в данном документе термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо. Субъектом может быть животное. В некоторых аспектах

субъектом является млекопитающее, такое как отличное от человека животное (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса, мышь, обезьяна или другой примат и т. д.). В некоторых аспектах субъектом является яванский макак. В некоторых аспектах субъектом является человек.

[94] Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, например, одного или нескольких антител или их антигенсвязывающих фрагментов, эффективно для лечения заболевания или нарушения у субъекта.

[95] Такие термины, как "осуществление лечения", или "лечение", или "лечить", или "облегчение", или "облегчать", относятся к терапевтическим мерам, с помощью которых излечивают, замедляют, ослабляют симптомы диагностированного патологического состояния или нарушения и/или останавливают их прогрессирование. Таким образом, нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже диагностировано нарушение, или тех, в отношении которых имеется подозрение на наличие у них нарушения. Нуждающиеся в лечении пациенты или субъекты могут включать тех, у кого диагностирована коронавирусная инфекция 2019 г. (COVID-19), и тех, кто был инфицирован коронавирусом 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2). Любой аспект, относящийся к способу лечения, описанному в данном документе, может упоминаться посредством ссылки на лекарственное средство (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию) согласно данному аспекту для применения в способе лечения заболевания/состояния согласно данному аспекту.

[96] В качестве альтернативы фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, т. е. эффект обеспечивает полное или частичное предупреждение заболевания или его симптома. В этом отношении раскрытый способ включает введение "профилактически эффективного количества" лекарственного средства (например, одного или нескольких антител или их антигенсвязывающих фрагментов). "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективно в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого профилактического результата (например, предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или начала проявления заболевания).

[97] Используемые в настоящем раскрытии и формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[98] Следует понимать, что во всех случаях, если аспекты описываются в данном документе формулировкой "содержащий", также предусмотрены в иных отношениях

аналогичные аспекты, описываемые терминами "состоящий из" и/или "состоящий по сути из". В настоящем изобретении термины "содержит", "содержащий", "состоящий" и "имеющий" и т. п. могут означать "включает", "включающий" и т. п.; термины "состоящий по сути из" или "состоит по сути" являются открытыми, допускающими наличие не только того, что упоминается, при условии, что основные или новые характеристики того, что упоминается, не изменяются благодаря наличию не только того, что упоминается, но исключают аспекты из предшествующего уровня техники.

[99] Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин "или" понимают как включающий. Термин "и/или", используемый в данном документе в такой фразе, как "А и/или В", предполагает включение "как А, так и В", "А или В", "А" и "В". Аналогичным образом, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", предполагает охват каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[100] Используемые в данном документе термины "приблизительно" и "примерно", в случае их использования для модификации числового значения или числового диапазона, указывают на то, что отклонения на величину до 10% выше и до 10% ниже значения или диапазона остаются в пределах предусматриваемой величины приведенного значения или диапазона. Следует понимать, что во всех случаях, если аспекты описываются в данном документе формулировкой "приблизительно" или "примерно" в отношении числового значения или диапазона, также предусмотрены в иных отношениях аналогичные аспекты, относящиеся к конкретному числовому значению или диапазону (без "приблизительно").

[101] Любые композиции или способы, предусмотренные в данном документе, можно использовать в комбинации с одним или несколькими из любых других композиций и способов, предусмотренных в данном документе.

9.2 Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

[102] В конкретном аспекте в данном документе предусмотрены антитела (например, моноклональные антитела, такие как антитела человека) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2. Аминокислотная последовательность шиповидного белка SARS-CoV-2 представлена под SEQ ID NO: 63:
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS
NVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSKTQSLIV
NNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMD
LEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT
LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLKYNENGTITDAVDCALDPLSET

KCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISN
CVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIA
DNYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFERDISTEIQAGST
PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKN
KCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS
VITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEN
VNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPT
NFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDK
NTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQY
GDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIP
FAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLQDVVNQN
AQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA
EIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTVPAQEK
FTTAPAICHGKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVN
NTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLN
ESLIDLQELGKYEYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCC
KFDEDDSEPVKGVKLYHT (SEQ ID NO: 63).

Если начальный аминокислотный остаток Met или соответствующий начальный кодон (например, "стартовый" кодон) указан под любым из SEQ ID NO, описанных в данном документе (в частности, под SEQ ID NO: 63), указанный остаток/кодон является необязательным. Поскольку наличие остатка метионина в положении 1 SEQ ID NO: 63 является необязательным, специалист в данной области примет во внимание наличие/отсутствие остатка метионина при определении нумерации аминокислотных остатков. Например, если SEQ ID NO: 63 содержит метионин, нумерация положений будет такой, как определено выше (например, F486 будет соответствовать F486 в SEQ ID NO: 63; N487 будет соответствовать N487 в SEQ ID NO: 63; G447 будет соответствовать G447 в SEQ ID NO: 63; и K444 будет соответствовать K444 в SEQ ID NO: 63). В качестве альтернативы, если метионин отсутствует в SEQ ID NO: 63, то нумерация аминокислотных остатков должна быть модифицирована на -1 (например, F486 будет соответствовать F485 в SEQ ID NO: 63; N487 будет соответствовать N486 в SEQ ID NO: 63; G447 будет соответствовать G446 в SEQ ID NO: 63; и K444 будет соответствовать K443 в SEQ ID NO: 63). Аналогичные соображения применимы, когда присутствует/отсутствует метионин в положении 1 других полипептидных последовательностей, описанных в данном документе, и специалист в данной области легко определит правильную нумерацию аминокислотных остатков, используя методики, стандартные в данной области техники.

[103] Аминокислоты 1-12 в SEQ ID NO: 63 представляют собой сигнальный пептид шиповидного белка. Таким образом, зрелый вариант шиповидного белка SARS-CoV-2 содержит аминокислоты 13-1273 из SEQ ID NO: 63. Аминокислоты 13-1213 в SEQ ID NO: 63 соответствуют внеклеточному домену; аминокислоты 1214-1234 соответствуют трансмембранному домену; и аминокислоты 1235-1273 соответствуют цитоплазматическому домену.

[104] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2.

[105] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоту F486. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоту N487. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоту F486 или N487. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоты F486 и N487 (например, F486 и N487).

[106] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка.

[107] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоту G447. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоту K444. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоту G447 или K444. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе,

связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоты G447 и K444.

[108] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, перекрестно реагируют с SARS-CoV. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, не реагируют перекрестно с SARS-CoV.

[109] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат шесть CDR антитела, представленных в таблице 1 (т. е. три CDR VH антитела и три VL CDR того же антитела).

Таблица 1. Последовательности антител

Клон	SEQ ID NO		Последовательность вариабельной области	CDR1	CDR2	CDR3
2094	7	HC	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFIFDDYDMTWV RQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAVIMSPIPRYSGYDW AGDAFDIWGQGTMTVTVSS	GFIFDDYD (SEQ ID NO: 1)	INWNGGST (SEQ ID NO: 2)	AVIMSPIPRY SGYDWAGDA FDI (SEQ ID NO: 3)
	8	LC	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQK PGQVPILVIYDKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQ AEDEADYYCNSRDSSGNAVVFGGGTKLTVL	SLRSYY (SEQ ID NO: 4)	DKN (SEQ ID NO: 5)	NSRDSSGNA VV (SEQ ID NO: 6)
2096	15	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGSFDINWV RQATGQGLEWMGRMNSNSGNTAYAQKFQGRVTMTRD TSTNTAYMELSSLRSEDAMYYCARMRSGWPTHGRPD DFWGRGTLVTVSS	GYTFGSFD (SEQ ID NO: 9)	MNSNSGNT (SEQ ID NO: 10)	ARMRSGWPT HGRPDDF (SEQ ID NO: 11)
	16	LC	QSVLTQAPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSYTINWYQQ LPGTAPKLLIYGNDQRTSGVPDRFSGSKFGTSASLAISGL QSEDENNYCAVWDDSLNGLVFGGGTKLTVL	NSNIGSYT (SEQ ID NO: 12)	GND (SEQ ID NO: 13)	AVWDDSLNG LV (SEQ ID NO: 14)
2130	23	HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDVWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKIDGGTTDYAAPVKGRFTISR DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTAGSYYYYDTVGP LPEGKFDYWGQGTMTVTVSS	GFTFRDVW (SEQ ID NO: 17)	IKSKIDGGT T (SEQ ID NO: 18)	TTAGSYYYYD TVGPGLPEGK FDY (SEQ ID NO: 19)
	24	LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL	QSVLYSSN	WAS (SEQ	QQYYSTLT

			AWYQQKPGQPPKLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGAE FTLTISSLQAEDVAIYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK	NKNY (SEQ ID NO: 20)	ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 22)
2165	31	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTVRSNYMTWV RQTPGKGLEWVSVIYSGGSTFYADSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVITYGLDVWGQGT TVTVSS	GLTVRSNY (SEQ ID NO: 25)	IYSGGST (SEQ ID NO: 26)	ARDLVITYGL DV (SEQ ID NO: 27)
	32	LC	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQK PGTAPNLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP EDFATYYCQLLNSHPLTFGQGTRLEIK	QGISNY (SEQ ID NO: 28)	AAS (SEQ ID NO: 29)	QLLNSHPLT (SEQ ID NO: 30)
2196	39	HC	QMQLVQSGPEVKKPGTSSVKVCKASGFTFMSSAVQWV RQARGQRLEWIGWIVIGSGNTNYAQKFQERVITITRDM TSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAPYCSSISCNDGFDI WQGMVTVSS	GFTFMSSA (SEQ ID NO: 33)	IVIGSGNT (SEQ ID NO: 34)	AAPYCSSISC NDGFDI (SEQ ID NO: 35)
	40	LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQHYGSSRGWTFGQGTKVEIK	QSVSSSY (SEQ ID NO: 36)	GAS (SEQ ID NO: 37)	QHYGSSRGW T (SEQ ID NO: 38)
CVH- 6	47	HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFSDYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISRSSTYIYYADSLKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKWELPRGYFDYWGQ GTLVTVSS	DYSMN (SEQ ID NO: 41)	SISRSSTYIY YADSLKG (SEQ ID NO: 42)	DKWELPRGY FDY (SEQ ID NO: 43)

	48	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFISSL QPEDIATYYCQHYDNLPITFGQGTKVEIK	QASQDISNY LN (SEQ ID NO: 44)	DASNLET (SEQ ID NO: 45)	QHYDNLPIT (SEQ ID NO: 46)
2103	53	HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHWMTWV RQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRLTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGFYYGGADYWG QGTLVTVSS	GFTFSRHW (SEQ ID NO: 65)	IKQDGSEK (SEQ ID NO: 66)	ARLGFYYGG ADY (SEQ ID NO: 49)
	54	LC	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQ RPGSAPTTVISEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISG LKTEDEADYYCQSYDGINRAWVFGGGTKLTVL	SGSIASNY (SEQ ID NO: 50)	EDN (SEQ ID NO: 51)	QSYDGINRA WV (SEQ ID NO: 52)
CVH- 5	61	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMHW VRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTIYAQKFRGRVTMTRD TSISTAYMDLSRLRSDDTAVYYCARGDGDYPDADFIDWG QGSMVTVSS	GYFMH (SEQ ID NO: 55)	WINPNSGG TIYAQKFRG (SEQ ID NO: 56)	GDGDYPDADF DI (SEQ ID NO: 57)
	62	LC	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYFN WLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTL KISRVEAEDVGIYHCMQATHFPLTFGGGKTKVEIK	RSSQSLVHS DGNTYFN (SEQ ID NO: 58)	KISNRFS (SEQ ID NO: 59)	MQATHFPLT (SEQ ID NO: 60)

[110] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат VH антитела, представленную в таблице 1. Например, описанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать VH, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 61. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат VL антитела, представленную в таблице 1. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VL, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 62.

[111] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат VH и VL антитела, представленные в таблице 1 (т. е. VH антитела и VL того же антитела). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 (что может быть примером второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444)). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24 (что может быть примером второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444)). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 (что может быть примером первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487)). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и VL,

содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 (что может быть примером первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487)). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62.

[112] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут быть описаны только их VL-доменом, или только их VH-доменом, или только их 3 CDR VL, или только их 3 CDR VH. См., например, Rader C *et al.*, (1998) PNAS 95: 8910-8915, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, описывающую гуманизацию антитела к $\alpha\beta 3$ мыши посредством идентификации дополняющей легкой цепи или тяжелой цепи соответственно из библиотеки легких или тяжелых цепей человека, что приводит к получению гуманизованных вариантов антител, характеризующихся столь же высокими или более высокими значениями аффинности по сравнению с аффинностью исходного антитела. См. также Clackson T *et al.*, (1991) Nature 352: 624-628, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, описывающую способы получения антител, которые связывают конкретный антиген, с использованием конкретного VL-домена (или VH-домена) и скрининга библиотеки на наличие комплементарных варибельных доменов. В результате скрининга было получено 14 новых партнеров для конкретного VH-домена и 13 новых партнеров для конкретного VL-домена, которые, как было определено с помощью ELISA, были сильными связывающими средствами. См. также Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, описывающую способы получения антител, которые связывают конкретный антиген, с использованием конкретного VH-домена и скрининга библиотеки (например, библиотеки VL человека) на наличие комплементарных VL-доменов; отобранные VL-домены, в свою очередь, можно использовать для направления отбора дополнительных комплементарных VH-доменов (например, человека). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-

CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 1-6 соответственно. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 9-14 соответственно (что может быть примером второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444)). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 17-22 соответственно (что может быть примером второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444)). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 25-30 соответственно (что может быть примером первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487)). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 33-38 соответственно (что может быть примером первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487)). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 41-46 соответственно. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 9-14 соответственно. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 65, 66, 49, 50, 51 и 52 соответственно. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут содержать VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 55-60 соответственно.

[113] В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации по Chothia, которая относится к местоположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), *J Mol Biol* 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) *J Mol Biol* 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) *J Mol Biol* 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) *J Mol Biol* 215(1):

175-82 и патент США № 7709226). Как правило, при использовании системы нумерации по Kabat петля CDR-H1 по Chothia присутствует по аминокислотам тяжелой цепи в положениях с 26 по 32, 33 или 34, петля CDR-H2 по Chothia присутствует по аминокислотам тяжелой цепи в положениях с 52 по 56, и петля CDR-H3 по Chothia присутствует по аминокислотам тяжелой цепи в положениях с 95 по 102, тогда как петля CDR-L1 по Chothia присутствует по аминокислотам легкой цепи в положениях с 24 по 34, петля CDR-L2 по Chothia присутствует по аминокислотам легкой цепи в положениях с 50 по 56, и петля CDR-L3 по Chothia присутствует по аминокислотам легкой цепи в положениях с 89 по 97. Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьируется от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что в соответствии со схемой нумерации по Kabat вставки расположены в H35A и H35B; при этом если не присутствуют ни 35A, ни 35B, то петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, то петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, то петля заканчивается на 34).

[114] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат CDR VH и VL антитела по Chothia, представленные в таблице 1. В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержат одну или несколько CDR, в которых CDR по Chothia и Kabat имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат комбинации CDR по Kabat и CDR по Chothia.

[115] В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc MP, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136, и Lefranc M-P *et al.*, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212. В соответствии со схемой нумерации IMGT VH-CDR1 находится в положениях 26-35, VH-CDR2 находится в положениях 51-57, VH-CDR3 находится в положениях 93-102, VL-CDR1 находится в положениях 27-32, VL-CDR2 находится в положениях 50-52, и VL-CDR3 находится в положениях 89-97. В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат CDR VH и VL антитела в соответствии с IMGT, представленные в таблице 1, например, как описано в Lefranc M-P (1999) *выше* и Lefranc M-P *et al.*, (1999) *выше*.

[116] В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены согласно MacCallum RM *et al.*, (1996) J Mol Biol 262: 732-745. См. также, например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат CDR VH и VL антитела, представленные в таблице 1, которые определены посредством способа в MacCallum RM *et al.*

[117] В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям по AbM, которые представляют собой компромисс между определением CDR по Kabat и структурных петель по Chothia и используются в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат CDR VH и VL антитела, представленные в таблице 1, которые определены посредством схемы нумерации AbM.

[118] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены антитела, которые содержат тяжелую цепь и/или легкую цепь. Неограничивающие примеры последовательностей константной области человека были описаны в уровне техники, например, см. патент США № 5693780 и Kabat EA *et al.*, (1991) выше.

[119] Что касается тяжелой цепи, в некоторых аспектах тяжелая цепь антитела, описанная в данном документе, может представлять собой тяжелую цепь альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В некоторых аспектах описанная тяжелая цепь антитела может включать в себя тяжелую цепь альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ) человека. В некоторых аспектах антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержит тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность VH-домена содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) человека (например, константную область тяжелой цепи IgG1 человека). В некоторых аспектах антитело, описанное в данном документе, которое специфично связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержит тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность VH-домена содержит последовательность, представленную в таблице 1, и где константная область тяжелой цепи содержит

аминокислоты тяжелой цепи человека, описанной в данном документе или известной из уровня техники.

[120] В некоторых аспектах легкая цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, представляет собой легкую каппа-цепь человека или легкую лямбда-цепь человека. В некоторых аспектах антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержит легкую цепь, где аминокислотная последовательность VL-домена содержит последовательность, представленную в таблице 1, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой каппа- или лямбда-цепи человека.

[121] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержат легкую цепь, где аминокислотная последовательность VL-домена содержит последовательность, представленную в таблице 1, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой каппа-цепи человека.

[122] В некоторых аспектах легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую лямбда-цепь. В некоторых аспектах антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержит легкую цепь, где аминокислотная последовательность VL-домена содержит последовательность, представленную в таблице 1, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой лямбда-цепи человека.

[123] В некоторых аспектах антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержит VH-домен и VL-домен, содержащие любую аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека. В некоторых аспектах антитело, описанное в данном документе, которое иммуноспецифично связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержит VH-домен и VL-домен, содержащие любую аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY, молекулы иммуноглобулина любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или

любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b). В некоторых аспектах константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека, молекулы иммуноглобулина любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b).

[124] Конструирование Fc-области используется в данной области техники, например, для продления периода полужизни терапевтических антител и их антигенсвязывающих фрагментов и защиты от разрушения *in vivo*. В некоторых аспектах Fc-область антитела IgG или антигенсвязывающего фрагмента может быть модифицирована для увеличения аффинности молекулы IgG по отношению к неонатальному Fc-рецептору (FcRn), который опосредует катаболизм IgG и защищает молекулы IgG от разрушения. Подходящие аминокислотные замены или модификации Fc-области известны из уровня техники и включают, например, тройную замену M252Y/S254T/T256E (обозначаемую как "YTE") (см., например, патент США 7658921; публикацию заявки на патент США 2014/0302058; и Yu et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61(1): e01020-16 (2017)). В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, моноклональное антитело или фрагмент), которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, содержат Fc-область, содержащую мутацию YTE.

[125] Тройная мутация (TM) L234F/L235E/P331S (согласно системе нумерации Европейского союза; Sazinsky et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:20167-20172 (2008)) в константной области тяжелой цепи может значительно снижать эффекторную функцию IgG. В некоторых аспектах последовательность IgG1, содержащая тройную мутацию, содержит последовательность под SEQ ID NO: 64.

EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 64)

[126] В некоторых аспектах одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в Fc-область антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе (например, в CH2-домен (остатки 231-340 IgG1 человека), и/или CH3-домен (остатки 341-447 IgG1 человека), и/или шарнирную область при нумерации в соответствии с системой нумерации по Kabat (например, EU-индексом согласно Kabat)) для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, таких как период полужизни в сыворотке крови,

фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность.

[127] В некоторых аспектах одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в шарнирную область Fc-области (СН1-домена), так что количество остатков цистеина в шарнирной области изменяется (например, увеличивается или уменьшается), как описано, например, в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области СН1-домена может быть изменено, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для изменения (например, увеличения или уменьшения) стабильности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[128] В некоторых аспектах одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в Fc-область антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе (например, в СН2-домен (остатки 231-340 IgG1 человека), и/или СН3-домен (остатки 341-447 IgG1 человека), и/или шарнирную область при нумерации в соответствии с системой нумерации по Kabat (например, EU-индексом согласно Kabat)) для увеличения или уменьшения аффинности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении Fc-рецептора (например, активированного Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области, которые приводят к уменьшению или увеличению аффинности в отношении Fc-рецептора, и методики введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области. Примеры мутаций в Fc-рецепторе, которые можно произвести для изменения аффинности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении Fc-рецептора, описаны, например, в Smith P *et al.*, (2012) PNAS 109: 6181-6186, патенте США № 6737056 и международных публикациях №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[129] В некоторых аспектах одну, две или больше аминокислотных мутаций (т. е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент, представляющий собой Fc-домен или домен шарнирная область-Fc) для изменения (например, уменьшения или увеличения) периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. См., например, международные публикации №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631; а также патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745 в отношении примеров мутаций, которые приводят к изменению (например, уменьшению или увеличению) периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. В некоторых аспектах одну, две или больше аминокислотных мутаций (т. е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно

фрагмент, представляющий собой Fc-домен или домен шарнирная область-Fc) для уменьшения периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. В некоторых аспектах одну, две или больше аминокислотных мутаций (т. е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно фрагмент, представляющий собой Fc-домен или домен шарнирная область-Fc) для увеличения периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vivo*. В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать одну или несколько аминокислотных мутаций (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или в третьем константном (CH3) домене (остатки 341-447 IgG1 человека) при нумерации в соответствии с EU-индексом согласно Kabat (Kabat EA *et al.*, (1991) выше). В некоторых аспектах константная область IgG1 содержит замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в положении 256 при нумерации в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. См. патент США № 7658921, который включен в данный документ посредством ссылки. Было показано, что данный тип мутантного IgG, называемый "мутантной формой YTE", демонстрирует четырехкратное увеличение периода полужизни по сравнению с вариантами дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua WF *et al.*, (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен IgG, содержащий одну, две, три или больше аминокислотных замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, пронумерованных в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

[130] В некоторых аспектах одну, две или больше аминокислотных замен вводят в Fc-область константного домена IgG для изменения эффекторной(эффекторных) функции(функций) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, пронумерованных в соответствии с EU-индексом согласно Kabat, можно заменить другим аминокислотным остатком так, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризовались измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохраняли антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого изменена, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 системы комплемента. Этот подход более подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260. В некоторых аспектах делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других способов) домена константной области может приводить к ослаблению связывания циркулирующего

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с Fc-рецептором, усиливая таким образом локализацию в опухоли. См., например, патенты США № 5585097 и 8591886 в отношении описания мутаций, которые приводят к удалению или инактивации константного домена и, таким образом, усилению локализации в опухоли. В некоторых аспектах одна или несколько аминокислотных замен могут быть введены в Fc-область для удаления потенциальных сайтов гликозилирования в Fc-области, что может привести к ослаблению связывания Fc-рецептора (см., например, Shields RL *et al.*, (2001) J Biol Chem 276: 6591-604).

[131] В некоторых аспектах одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 322, 329 и 331 в константной области, пронумерованных в соответствии с EU-индексом согласно Kabat, можно заменить другим аминокислотным остатком так, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризовались измененным связыванием C1q и/или уменьшенной или устраненной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Этот подход более подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie *et al*). В некоторых аспектах один или несколько аминокислотных остатков в положениях аминокислот с 231 по 238 в N-концевой области CH2-домена изменяют, чтобы таким образом изменить способность антитела к фиксации комплемента. Этот подход дополнительно описан в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых аспектах Fc-область модифицируют для увеличения способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении Fcγ-рецептора посредством осуществления мутации одной или нескольких аминокислот (например, введения аминокислотных замен) в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, пронумерованных в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. Этот подход дополнительно описан в международной публикации № WO 00/42072.

[132] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат константный домен IgG1 с мутацией (например, заменой) в положениях 267, 328 или их комбинации, пронумерованных в соответствии с EU-индексом согласно Kabat. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат константный домен IgG1 с мутацией (например, заменой), выбранной из группы, состоящей из S267E, L328F и их комбинации.

В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат константный домен IgG1 с мутацией S267E/L328F (например, заменой). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержащие константный домен IgG1 с мутацией S267E/L328F (например, заменой), характеризуются увеличенной аффинностью связывания в отношении Fc γ RIIA, Fc γ RIIB или Fc γ RIIA и Fc γ RIIB.

[133] Сконструированные гликоформы могут быть пригодными для разнообразных целей, в том числе без ограничения для повышения или снижения эффекторной функции. Способы получения сконструированных гликоформ в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, описанных в данном документе, включают без ограничения раскрытые, например, в Umaña P *et al.*, (1999) *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies J *et al.*, (2001) *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Shields RL *et al.*, (2002) *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Shinkawa T *et al.*, (2003) *J Biol Chem* 278: 3466-3473; Niwa R *et al.*, (2004) *Clin Cancer Res* 1: 6248-6255; Presta LG *et al.*, (2002) *Biochem Soc Trans* 30: 487-490; Kanda Y *et al.*, (2007) *Glycobiology* 17: 104-118; патентах США №№ 6602684, 6946292 и 7214775; публикациях заявок на патент США №№ US 2007/0248600, 2007/0178551, 2008/0060092 и 2006/0253928; международных публикациях №№ WO 00/61739, WO 01/292246, WO 02/311140 и WO 02/30954; технологии Potelligent™ (Biowa, Inc., Принстон, Нью-Джерси, США); и технологии конструирования гликозилирования GlycoMAb® (Glycart biotechnology AG, Цюрих, Швейцария). См. также, например, Ferrara C *et al.*, (2006) *Biotechnol Bioeng* 93: 851-861; международные публикации №№ WO 07/039818, WO 12/130831, WO 99/054342, WO 03/011878 и WO 04/065540.

[134] В некоторых аспектах любая из мутаций или модификаций константной области, описанных в данном документе, может быть введена в одну или обе константные области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, имеющих две константные области тяжелой цепи.

[135] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, ингибируют связывание SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2).

[136] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, нейтрализуют SARS-CoV-2. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфично

связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, нейтрализуют псевдовиром SARS-CoV-2.

[137] Анализы конкурентного связывания можно использовать для определения того, связываются ли два антитела с перекрывающимися эпитопами. Конкурентное связывание можно определить с помощью анализа, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как шиповидный белок SARS-CoV-2 или SARS-CoV-2. Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный "сэндвич"-анализ (см. Stahl C *et al.*, (1983) *Methods Enzymol* 9: 242-253); твердофазный прямой EIA с использованием системы авидин-биотин (см. Kirkland TN *et al.*, (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный "сэндвич"-анализ с прямым мечением (см. Harlow E & Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с прямым мечением с использованием I-125 в качестве метки (см. Morel GA *et al.*, (1988) *Mol Immunol* 25(1): 7-15); твердофазный прямой EIA с использованием системы авидин-биотин (Cheung RC *et al.*, (1990) *Virology* 176: 546-52) и RIA с прямым мечением (Moldenhauer G *et al.*, (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82). Как правило, такой анализ предусматривает применение очищенного антигена, связывающегося с твердой поверхностью или клетками, несущими либо немеченый тестируемый иммуноглобулин, либо меченый эталонный иммуноглобулин. Конкурентное ингибирование можно измерять посредством определения количества метки, связавшейся с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном на по меньшей мере 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или больше. Анализ конкурентного связывания можно организовать в большом количестве различных форматов с использованием меченого антигена либо меченого антитела. В обычной версии этого анализа антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете. Способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител с антигеном затем измеряют с использованием радиоактивных или ферментных меток. Дополнительные подробности см., например, в Wagener C *et al.*, (1983) *J Immunol* 130: 2308-2315; Wagener C *et al.*, (1984) *J Immunol Methods* 68: 269-274; Kuroki M *et al.*, (1990) *Cancer Res* 50: 4872-4879; Kuroki M *et al.*, (1992) *Immunol Invest* 21: 523-538; Kuroki M *et al.*, (1992) *Hybridoma* 11: 391-407 и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow E & Lane D editors, выше, pp. 386-389.

[138] В некоторых аспектах конкурентный анализ проводят с использованием поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), например, с помощью "тандемного подхода", такого как описанный в Abdiche YN *et al.*, (2009) *Analytical Biochem* 386: 172-180, в котором антиген иммобилизуют на поверхности чипа, например, сенсорного чипа CM5, а затем над чипом пропускают антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с антителом, которое связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2, описанным в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сначала пропускают над поверхностью чипа для достижения насыщения, а затем добавляют потенциально конкурирующее антитело. Затем можно определить и количественно оценить связывание конкурирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относительно неконкурирующего контроля.

[139] В другом аспекте в данном документе предусмотрены антитела, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание описанных антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с шиповидным белком SARS-CoV-2 или с SARS-CoV-2, как определено с использованием анализов, известных специалистам в данной области или описанных в данном документе (например, конкурентных анализов методом ELISA, или суспензионного анализа микроматриц, или анализа поверхностного плазмонного резонанса).

[140] В некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, который специфично связывается с шиповидным белком SARS-CoV-2, выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv, где Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv содержат последовательность варибельной области тяжелой цепи и последовательность варибельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 или с SARS-CoV-2. Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv можно получить с помощью любой методики, известной специалистам в данной области, включая без ограничения методики, обсуждаемые в разделе 7.4 ниже. В некоторых аспектах Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv дополнительно содержат компонент, который продлевает период полужизни антитела *in vivo*. Данный компонент также называют "компонентом, продлевающим период полужизни". Можно использовать любой компонент, известный специалистам в данной области, для продления периода полужизни Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv *in vivo*. Например, компонент, продлевающий период полужизни, может включать в себя Fc-область, полимер, альбумин или альбуминсвязывающие белок или соединение. Полимер может включать в себя природный или синтетический, необязательно замещенный имеющий прямую или

разветвленную цепь полиалкилен, полиалкенилен, полиоксилалкилен, полисахарид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, метоксиполиэтиленгликоль, лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные. Заместители могут включать в себя одну или несколько гидроксильных, метильных или метоксигрупп. В некоторых аспектах Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv можно модифицировать путем добавления одной или нескольких C-концевых аминокислот для присоединения фрагмента, продлевающего период полужизни. В некоторых аспектах фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой полиэтиленгликоль или сывороточный альбумин человека. В некоторых аспектах Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv слиты с Fc-областью.

[141] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, могут быть слиты или конъюгированы (например, ковалентно или нековалентно связаны) с детектируемыми меткой или веществом. Примеры детектируемых меток или веществ включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (¹²⁵I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹²¹In) и технеций (⁹⁹Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, а также биотин. Такие меченые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для выявления шиповидного белка SARS-CoV-2 или SARS-CoV-2. См., например, раздел 7.6.2 ниже.

9.3 Комбинации антител и их антигенсвязывающих фрагментов

[142] В некоторых аспектах композиция, предусмотренная в данном документе, содержит комбинацию антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, например, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2. В некоторых аспектах в способе, предусмотренном в данном документе, применяется комбинация антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, например, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2.

[143] В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2. В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в

данном документе, второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка. В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 RBD шиповидного белка SARS-CoV-2, а второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка.

[144] В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486. В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447. В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486, а второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447.

[145] В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487). В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444). В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), а второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444).

[146] В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486, а второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка. В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично

связываются с областью взаимодействия с ACE2 RBD шиповидного белка SARS-CoV-2, а второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447.

[147] В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), а второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка. В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с областью взаимодействия с ACE2 RBD шиповидного белка SARS-CoV-2, а второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444).

[148] В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое и второе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с неперекрывающимися эпитопами шиповидного белка SARS-CoV-2. В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое и второе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 или с тримером шиповидного белка SARS-CoV-2 одновременно.

[149] В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, первое и второе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты присутствуют или применяются в синергических количествах. В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, 2130) присутствуют или применяются в количестве, в приблизительно 240 раз превышающем количество первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2196). В некоторых аспектах композиций и способов, предусмотренных в данном документе, второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, 2096) присутствуют или применяются в количестве, в приблизительно 5 раз превышающем количество первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2196).

[150] В некоторых аспектах способов, предусмотренных в данном документе, первое и второе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представлены в одной и той же композиции. В некоторых аспектах способов, предусмотренных в данном документе, первое и второе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представлены в отдельных композициях.

9.4 Получение антител

[151] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, могут быть получены посредством любого известного из уровня техники способа синтеза антител и их антигенсвязывающих фрагментов, например, посредством методик химического синтеза или рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в данном документе, используются, если не указано иное, традиционные методики из молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей в пределах компетенции специалиста в данной области. Эти методики описаны, например, в литературных источниках, цитируемых в данном документе, и полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook J *et al.*, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные переиздания); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные переиздания) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[152] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые иммуноспецифично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе предусмотрен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые иммуноспецифично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, включающий осуществление экспрессии (например, рекомбинантной экспрессии) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе (например, клетки или клетки-хозяина, содержащих полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе). В некоторых аспектах клетка представляет собой выделенную клетку. В некоторых аспектах экзогенные полинуклеотиды были введены в клетку. В некоторых аспектах способ дополнительно включает стадию отделения или очистки антитела или антигенсвязывающего фрагмента, полученных из клетки, клетки-хозяина или культуры.

[153] Способы получения поликлональных антител известны из уровня техники (см., например, главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York).

[154] Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно получать с помощью широкого разнообразия методик, известных из уровня техники, включая применение гибридной, рекомбинантной технологий и технологии фагового дисплея, технологии презентации с использованием дрожжей или их комбинации. Например, моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием гибридных методик, включая методики, известные из уровня техники и изложенные, например, в Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, в *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, NY, 1981), или описанные в Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495. Примеры способов презентации с использованием дрожжей, которые можно использовать для отбора и получения описанных в данном документе антител, включают способы, раскрытые, например, в WO 2009/036379A2, WO 2010/105256 и WO 2012/009568, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[155] В некоторых аспектах моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемые клональной клеткой (например, гибридной или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело или антигенсвязывающий фрагмент), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, как определено, например, с помощью ELISA или других анализов связывания антигена, известных из уровня техники или в приведенных в данном документе примерах. В некоторых аспектах моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой Fab-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент. Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть получены, например, посредством гибридного способа, как описано в Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, или, например, могут быть выделены из фаговых библиотек с использованием, например, методик, описанных в данном документе. Другие способы получения клональных линий клеток и экспрессируемых ими моноклональных антител и их антигенсвязывающих фрагментов

хорошо известны из уровня техники (см., например, главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, выше).

[156] Антигенсвязывающие фрагменты антител, описанных в данном документе, могут быть получены с помощью любой методики, известной специалистам в данной области. Например, Fab- и F(ab')₂-фрагменты, описанные в данном документе, могут быть получены посредством протеолитического расщепления молекул иммуноглобулинов с использованием таких ферментов, как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения F(ab')₂-фрагментов). Fab-фрагмент соответствует одному из двух идентичных плеч тетрамерной молекулы антитела и содержит полную легкую цепь в паре с VH- и CH1-доменами тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих плеча тетрамерной молекулы антитела, связанных дисульфидными связями в шарнирной области.

[157] Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, также могут быть получены с использованием различных способов фагового дисплея и/или презентации с использованием дрожжей, известных из уровня техники. В способах фагового дисплея белки представлены на поверхности фаговых частиц, которые несут последовательности полинуклеотидов, кодирующие их. В частности, последовательности ДНК, кодирующие VH- и VL-домены, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, из библиотек кДНК пораженных тканей человека или мыши). ДНК, кодирующую VH- и VL-домены, рекомбинируют вместе с линкером scFv посредством ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор вводят в *E. coli* путем электропорации, и *E. coli* инфицируют фагом-помощником. Фаг, используемый в этих способах, обычно представляет собой нитевидный фаг, в том числе fd и M13, и VH- и VL-домены обычно сливают рекомбинантным путем с геном III либо с геном VIII фага. Фаг, экспрессирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с конкретным антигеном, может быть отобран или идентифицирован с помощью антигена, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного с твердой поверхностью или гранулой или зафиксированного на них. Примеры способов фагового дисплея, которые можно применять для получения антител или фрагментов, описанных в данном документе, включают способы, раскрытые в Brinkman U *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.*, (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L *et al.*, (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; заявке согласно РСТ № РСТ/GB91/001134; международных публикациях №№ WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и патентах США №№

5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

9.4.1 Полинуклеотиды

[158] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, или их домен (например, переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи), которые иммуноспецифично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, клетках *E. coli* и млекопитающих).

[159] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2 и содержат аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, а также антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с такими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с SARS-CoV-2 (например, дозозависимым образом) или которые связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты.

[160] В данном документе также предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, которые являются оптимизированными, например, посредством оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, или их домен (например, тяжелую цепь, легкую цепь, VH-домен или VL-домен), для рекомбинантной экспрессии посредством введения изменений кодонов (например, изменения кодона, который кодирует ту же аминокислоту вследствие вырожденности генетического кода) и/или устранения ингибиторных областей в мРНК могут быть осуществлены посредством адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США №№ 5965726; 6174666; 6291664; 6414132 и 6794498 соответственно.

[161] Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, или их домен, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с применением способов,

хорошо известных из уровня техники (например, ПЦР и других способов молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификацию с использованием синтетических праймеров, способных гибридизироваться с 3'- и 5'-концами известной последовательности, можно проводить с использованием геномной ДНК, полученной из клеток гибридомы, продуцирующих антитело, представляющее интерес. Такие способы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Такие способы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

[162] Предусмотренные в данном документе полинуклеотиды могут быть представлены, например, в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, и ДНК может быть двухнитевой или однонитевой. Если ДНК является однонитевой, она может представлять собой кодирующую нить или некодирующую (антисмысловую) нить. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, в которой отсутствуют один или несколько эндогенных интронов. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, не встречающийся в природе. В некоторых аспектах полинуклеотид получен рекомбинантным путем. В некоторых аспектах полинуклеотиды являются выделенными. В некоторых аспектах полинуклеотиды являются практически чистыми. В некоторых аспектах полинуклеотид очищен от природных компонентов.

9.4.2 Клетки и векторы

[163] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты или их домен, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, например, в клетках млекопитающих. В данном документе также предусмотрены клетки, например, клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов), которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2. В конкретном

аспекте в данном документе предусмотрены способы получения антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, включающие обеспечение экспрессии такого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине.

[164] В некоторых аспектах рекомбинантная экспрессия антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или их домена, описанных в данном документе (например, тяжелой или легкой цепи, описанных в данном документе), которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, предусматривает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или их домен. После получения полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или их домен (например, переменный домен тяжелой или легкой цепи), описанные в данном документе, вектор для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть получен посредством технологии рекомбинантных ДНК с использованием методик, хорошо известных из уровня техники. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем обеспечения экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или их домен (например, легкую цепь или тяжелую цепь). Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или их домен (например, легкую цепь или тяжелую цепь), и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, методики рекомбинантных ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также в данном документе предусмотрены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, тяжелую или легкую цепь, переменный домен тяжелой или легкой цепи или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанную с промотором. Такие векторы могут, например, содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (см., например, международные публикации №№ WO 86/05807 и WO 89/01036 и патент США № 5122464), и переменные домены антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии всей тяжелой цепи, всей легкой цепи или как всей тяжелой цепи, так и всей легкой цепи.

[165] Вектор экспрессии можно переносить в клетку (например, клетку-хозяина) посредством традиционных методик, и полученные в результате клетки затем можно культивировать посредством традиционных методик для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих шесть CDR, VH, VL, VH и VL, тяжелую цепь, легкую цепь или тяжелую и легкую цепи антитела, представленные в таблице 1), или их домена (например, VH, VL, VH и VL, тяжелой цепи или легкой цепи антитела, представленных в таблице 1). Таким образом, в данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR, VH, VL, VH и VL, тяжелую цепь, легкую цепь или тяжелую и легкую цепи антитела, представленные в таблице 1), или их домен (например, VH, VL, VH и VL, тяжелую цепь или легкую цепь антитела, представленные в таблице 1), функционально связанный с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых аспектах для экспрессии двухцепочечных антител или их антигенсвязывающих фрагментов векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи отдельно, могут совместно экспрессироваться в клетке-хозяине для экспрессии всего иммуноглобулина, как подробно изложено ниже. В некоторых аспектах клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела, описанного в данном документе (например, тяжелую и легкую цепи антитела, представленные в таблице 1), или его домен (например, VH и VL антитела, представленные в таблице 1). В некоторых аспектах клетка-хозяин содержит два разных вектора: первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в данном документе (например, антитела, содержащего шесть CDR антитела, представленных в таблице 1), или его домен. В некоторых аспектах первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих шесть CDR антитела, представленных в

таблице 1). В некоторых аспектах тяжелая цепь/вариабельная область тяжелой цепи, экспрессируемая первой клеткой, ассоциирована с легкой цепью/вариабельной областью легкой цепи из второй клетки с образованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих шесть CDR антитела, представленных в таблице 1). В некоторых аспектах в данном документе предусмотрена популяция клеток-хозяев, содержащая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

[166] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих CDR антитела, представленные в таблице 1). В качестве альтернативы можно применять один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепей.

[167] Для экспрессии антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих CDR антитела, представленные в таблице 1), можно использовать разнообразные векторные системы экспрессии в хозяине (см., например, патент США № 5807715). Такие системы экспрессии в хозяине представляют носители, с помощью которых кодирующие последовательности, представляющие интерес, можно получать и впоследствии очищать, но также представляют клетки, которые могут, будучи трансформированными или трансфицированными с помощью подходящих нуклеотидных кодирующих последовательностей, экспрессировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, *in situ*. Они включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии на основе ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитела; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии в дрожжах, содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии на основе вируса (например, бакуловируса), содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы растительных клеток (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные

рекомбинантными векторами экспрессии на основе вируса (например, вируса мозаики цветной капусты CaMV; вируса табачной мозаики TMV) или трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии на основе плазмиды (например, Ti-плазмиды), содержащими последовательности, кодирующие антитела; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), содержащие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор гена металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса осповакцины 7,5K). В некоторых аспектах клетки для экспрессии антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих CDR антитела, представленные в таблице 1), представляют собой клетки CHO, например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). В некоторых аспектах клетки для экспрессии антител, описанных в данном документе, представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. В некоторых аспектах вектор экспрессии в клетках млекопитающих представляет собой pOptiVEC™ или pcDNA3.3. В некоторых аспектах бактериальные клетки, такие как клетки *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), в частности, для экспрессии полной молекулы рекомбинантного антитела, применяют для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), совместно с вектором, таким как главный промоторный элемент гена средне-раннего ответа из цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии для антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-105; и Cockett MI *et al.*, (1990) *Biotechnology* 8: 662-667). В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, продуцируются клетками CHO или клетками NS0.

[168] Кроме того, можно выбрать такой штамм клеток-хозяев, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и осуществляет процессинг продукта гена определенным желаемым способом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут способствовать функции белка. В связи с этим можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования продукта гена. Такие клетки-хозяева, являющиеся клетками млекопитающих, включают без ограничения клетки

CHO, VERO, ВНК, HeLa, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линию клеток миеломы мыши, которая не продуцирует эндогенно каких-либо цепей иммуноглобулинов), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

[169] После получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, путем рекомбинантной экспрессии их можно очистить любым известным из уровня техники способом очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности по аффинности к конкретному антигену после обработки белком А, и эксклюзионной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или с помощью любой другой стандартной методики очистки белков. Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе или иным образом известными из уровня техники, для облегчения очистки.

[170] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, выделены или очищены. Как правило, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент практически не содержат других антител или их антигенсвязывающих фрагментов с антигенной специфичностью, отличной от антигенной специфичности выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, в некоторых аспектах препарат на основе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, практически не содержит клеточного материала и/или химических предшественников.

9.5 Фармацевтические композиции

[171] В данном документе предусмотрены композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, или комбинацию антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, характеризующиеся желаемой степенью чистоты в физиологически приемлемом носителе, наполнителе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для получающих их пациентов в используемых дозах и концентрациях.

[172] В некоторых аспектах композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком

SARS-CoV-2, представлены в составах с фармацевтически приемлемым носителем (см., например, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippincott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000). В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит два антитела или антигенсвязывающих фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, например, два антитела или их антигенсвязывающих фрагмента, которые связываются с разными эпитопами шиповидного белка SARS-CoV-2. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит два антитела или антигенсвязывающих фрагмента, которые связываются с разными эпитопами рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит два антитела или антигенсвязывающих фрагмента, которые связываются с неперекрывающимися эпитопами RBD шиповидного белка SARS-CoV-2. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит два антитела или антигенсвязывающих фрагмента, которые могут связываться с SARS-CoV-2 одновременно. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит два антитела или антигенсвязывающих фрагмента, которые связываются с разными эпитопами RBD шиповидного белка SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), шиповидного белка SARS-CoV-2, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444), шиповидного белка SARS-CoV-2. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит синергическое количество первого и второго антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит в приблизительно 240 раз больше второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2130), чем первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2196). В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит в приблизительно 5 раз больше второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2096), чем первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2196).

[173] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть применимы в блокировании связывания шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 с рецептором клетки-хозяина, т. е. с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2).

[174] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть применимы в предупреждении и/или лечении инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у пациента или одного или нескольких состояний или осложнений, связанных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, у пациента. В некоторых аспектах пациент мог быть заражен SARS-CoV-2. Примеры инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или одного или нескольких состояний или осложнений, связанных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, которые можно предупреждать и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают без ограничения лихорадку, кашель, усталость, одышку, затрудненное дыхание, мышечные боли, озноб, боль в горле, потерю вкуса или обоняния, головную боль, боль в груди, тошноту, рвоту и диарею. Дополнительные примеры одного или нескольких состояний или осложнений, связанных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, у пациента, которые можно лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают без ограничения сердечные осложнения, респираторные осложнения, осложнения диабета, недостаточность органа и образование тромбов. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, может быть применима в лечении или предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или одного или нескольких состояний или осложнений, связанных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, описанных в данном документе, у пациента с одним или несколькими факторами риска развития инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. В некоторых аспектах факторы риска включают без ограничения возраст 65 лет или старше, ослабленный иммунитет, страдание одним или несколькими из хронического заболевания легких, астмы или диабета.

[175] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, в некоторых аспектах предназначены для применения в качестве лекарственного препарата. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, в некоторых аспектах предназначены для применения в качестве диагностического средства, например, для выявления присутствия SARS-CoV-2 в образце (например, выделенном образце), полученном от пациента (например, пациента-человека). Примеры подходящих образцов включают образец из носоглотки (например, образец мазка) и образец слюны.

[176] Композиции, предусмотренные в данном документе для применения для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко достигается посредством фильтрации через, например, мембраны для стерилизующей фильтрации.

[177] В некоторых аспектах предусмотрены фармацевтические композиции, где фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно (например, одно или два) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным

белком SARS-CoV-2 (например, два антитела или их антигенсвязывающих фрагмента, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), шиповидного белка SARS-CoV-2, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444), шиповидного белка SARS-CoV-2), и фармацевтически приемлемый носитель. Примеры подходящих антител или их антигенсвязывающих фрагментов представлены выше.

9.6 Пути применения и способы

9.6.1 Пути терапевтического применения и способы

[178] В некоторых аспектах в данном документе представлены способы блокирования связывания шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 с рецептором клетки-хозяина, т. е. ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2), у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции на их основе, как описано выше и в данном документе.

[179] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены способы предупреждения и/или лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у пациента или одного или нескольких состояний или осложнений, связанных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, у пациента. Способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, может включать введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, нуждающемуся в этом пациенту (например, пациенту-человеку).

[180] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены способы снижения вероятности развития инфекции у субъекта, имеющего риск заражения инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2. Способ снижения вероятности развития инфекции у субъекта, имеющего риск заражения инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, может включать введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2.

[181] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены способы предупреждения и/или лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или одного или нескольких состояний или осложнений, связанных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2. Состояния или осложнения, связанные с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, включают без ограничения лихорадку, кашель, усталость, одышку, затрудненное дыхание, мышечные боли, озноб, боль в горле, потерю вкуса или обоняния, головную боль, боль в груди, тошноту, рвоту и диарею. В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены

способы предупреждения и/или лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у пациента с одним или несколькими факторами риска развития инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. В некоторых аспектах факторы риска включают без ограничения возраст 65 лет или старше, ослабленный иммунитет, страдание одним или несколькими из хронического заболевания легких, астмы или диабета и/или ослабленный иммунитет. В некоторых аспектах такие способы включают введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, предусмотренных в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, предусмотренной в данном документе, нуждающемуся в этом пациенту (например, пациенту-человеку). В некоторых аспектах такие способы включают введение двух антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, предусмотренных в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей два антитела или их антигенсвязывающих фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, предусмотренной в данном документе, нуждающемуся в этом пациенту (например, пациенту-человеку). Два антитела или их антигенсвязывающих фрагмента могут представлять собой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, содержащим F486 и/или N487 (например, F486 и N487), шиповидного белка SARS-CoV-2, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом, содержащим G447 и/или K444 (например, G447 и K444), шиповидного белка SARS-CoV-2. В некоторых аспектах вводят синергические количества первого и второго антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых аспектах вводят в приблизительно 240 раз больше второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2130), чем первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2196). В некоторых аспектах вводят в приблизительно 5 раз больше второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2096), чем первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, 2196).

[182] В некоторых аспектах такие способы включают введение композиции, содержащей одно или несколько антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, предусмотренных в данном документе, нуждающемуся в этом пациенту (например, пациенту-человеку). В некоторых аспектах пациент страдает от факторов риска, включая без ограничения возраст 65 лет или старше, ослабленный иммунитет, страдание одним или несколькими из хронического заболевания легких, астмы или диабета.

[183] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, или фармацевтическую композицию вводят пациенту (например, пациенту-человеку), у которого диагностирована инфекция, вызванная SARS-CoV-2, для блокирования связывания шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 с рецептором клетки-хозяина, т. е. ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2), у пациента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, или фармацевтическую композицию вводят субъекту (например, субъекту-человеку), имеющему риск заражения SARS-CoV-2.

[184] Обычно пациент является человеком, однако также можно лечить млекопитающих, отличных от человека, в том числе трансгенных млекопитающих.

[185] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, предусмотренным в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, предусмотренным в данном документе, для применения в способе предупреждения или лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или фармацевтической композиции, предусмотренным в данном документе, для применения в способе лечения инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, предусмотренных в данном документе.

[186] Количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции, которое будет эффективным при лечении состояния, будет зависеть от природы заболевания. Точная доза, которую следует использовать в композиции, также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания.

9.6.2 Пути применения для выявления и диагностики

[187] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, описанные в данном документе (см., например, раздел 7.2), можно применять для анализа уровней белка SARS-CoV-2 или уровней SARS-CoV-2 в биологическом образце (например, образце из носоглотки, образце слюны) с помощью классических способов, известных специалистам в данной области, включая иммунологические анализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализа антител

известны из уровня техники и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, а также биотин. Такие метки можно использовать для мечения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе. В качестве альтернативы второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с шиповидным белком SARS-CoV-2, описанные в данном документе, можно пометить и применять в комбинации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающимися с шиповидным белком SARS-CoV-2, для выявления уровней белка SARS-CoV-2.

[188] Предполагается, что анализ уровня экспрессии белка SARS-CoV-2 включает качественное или количественное измерение или оценивание уровня белка SARS-CoV-2 в первом биологическом образце либо напрямую (например, путем определения или оценивания абсолютного уровня белка), либо относительно (например, путем сравнения с уровнем белка, ассоциированного с заболеванием, во втором биологическом образце). Уровень экспрессии белка SARS-CoV-2 в первом биологическом образце можно измерить или оценить и сравнить со стандартным уровнем белка SARS-CoV-2, при этом стандарт берут из второго биологического образца, полученного от индивидуума, у которого отсутствует нарушение, или определяют путем усреднения уровней из популяции индивидуумов, у которых отсутствует нарушение.

[189] Используемый в данном документе термин "биологический образец" относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта (например, выделенному образцу, полученному от субъекта), линии клеток, ткани или другому источнику клеток, потенциально экспрессирующих SARS-CoV-2. Способы получения биоптатов тканей и биологических жидкостей от животных (например, людей) хорошо известны из уровня техники. Примеры подходящих образцов включают образец из носоглотки (например, образец мазка) и образец слюны.

[190] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, описанные в данном документе, могут нести детектируемую или функциональную метку. При использовании флуоресцентных меток для идентификации и количественной оценки участников специфического связывания можно использовать процедуры, известные из уровня техники — доступную в настоящее время микроскопию и анализ методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) или комбинацию обоих способов. Антитела или их антигенсвязывающие

фрагменты, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, описанные в данном документе, могут нести флуоресцентную метку. Иллюстративные флуоресцентные метки включают, например, реактивные и конъюгированные зонды, например, аминкумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, могут нести радиоактивную метку, такую как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . При использовании радиоактивных меток можно использовать доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные из уровня техники, для идентификации и количественной оценки специфичного связывания антител или их антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2. В том случае, когда метка представляет собой фермент, выявление может быть осуществлено с помощью любой из используемых в настоящее время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методик, известных из уровня техники. Этого можно достичь посредством приведения образца или контрольного образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, в условиях, которые допускают образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и шиповидным белком SARS-CoV-2. Любые комплексы, образовавшиеся между антителами или антигенсвязывающими фрагментами и шиповидными белками SARS-CoV-2, выявляются и сравниваются в образце (и необязательно в контроле). С учетом специфичного связывания антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, описанных в данном документе в отношении SARS-CoV-2, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно применять для специфичного выявления SARS-CoV-2 (например, у субъекта).

[191] В данный документ также включена система анализа, которая может быть подготовлена в форме тест-набора для количественного анализа степени присутствия, например, шиповидных белков SARS-CoV-2. Система или тест-набор могут содержать меченый компонент, например, меченое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и один или несколько дополнительных иммунохимических реагентов. См., например, раздел 7.7 ниже для получения дополнительной информации о наборах.

[192] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены способы выявления шиповидных белков SARS-CoV-2 в образце *in vitro*, включающие приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых аспектах в

данном документе предусмотрено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предусмотренных в данном документе, для выявления шиповидных белков SARS-CoV-2 в образце *in vitro*. В одном аспекте в данном документе предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, для применения при выявлении шиповидных белков SARS-CoV-2 у субъекта или в образце, полученном от субъекта. В одном аспекте в данном документе предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, для применения в качестве диагностического средства. В некоторых аспектах антитело содержит детектируемую метку. В некоторых аспектах субъектом является человек.

9.7 Наборы

[193] В данном документе предусмотрены наборы, содержащие одно или несколько антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, или их конъюгаты. В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены фармацевтическая упаковка или набор, содержащие один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одно или несколько антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предусмотренных в данном документе. Необязательно вместе с таким(такими) контейнером(контейнерами) может прилагаться уведомление в форме, предписанной правительственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических препаратов, и такое уведомление отражает одобрение данным органом производства, применения или продажи для введения человеку.

[194] Также в данном документе предусмотрены наборы, которые можно применять в диагностических способах. В некоторых аспектах набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, предпочтительно очищенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в одном или нескольких контейнерах. В некоторых аспектах наборы, описанные в данном документе, содержат в значительной степени выделенный антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, который можно применять в качестве контроля. В некоторых аспектах наборы, описанные в данном документе, дополнительно содержат контрольное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые не реагируют с антигеном, представляющим собой шиповидный белок SARS-CoV-2. В некоторых аспектах наборы, описанные в данном документе, содержат один или несколько элементов для выявления связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, представляющим собой шиповидный белок SARS-CoV-2 (например, антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть конъюгированы с детектируемым субстратом). В некоторых аспектах набор, предусмотренный в данном документе, может содержать полученный рекомбинантным путем или синтезированный химическим путем антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2. Антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, предоставляемый в наборе, также может быть прикреплен к твердой подложке. В некоторых аспектах средство выявления из описанного выше набора содержит твердую подложку, к которой прикреплен антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2. Такой набор может также содержать неприкрепленное имеющее репортерную метку антитело к иммуноглобулину человека или его антигенсвязывающий фрагмент или антитело к иммуноглобулину мыши/крысы или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом аспекте связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, с антигеном, представляющим собой шиповидный белок SARS-CoV-2, можно выявить по связыванию имеющего репортерную метку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[195] Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

10. ПРИМЕРЫ

[196] Примеры в этом разделе "Примеры" (т. е. в разделе 10) предлагаются в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

10.1 Пример 1. Получение шиповидного белка SARS-CoV-2

[197] Шиповидный (S) белок SARS-CoV-2 представляет собой гликопротеиновый тример с 3 рецепторсвязывающими доменами (RBD), расположенными в центре вверху шипа. S-белку требуется несколько стадий для достижения активной конформации, способной связываться с рецептором ACE2. Для экспрессии шиповидных (S) белков SARS-CoV-2 RBD (остатки 334-526), варианты RBD с одиночными мутациями и N-концевой домен (NTD) (остатки 16-305) (GenBank: MN908947) клонировали с N-концевой лидерной последовательностью CD33 и C-концевым линкером GSSG, AviTag, линкером GSSG и 8xHis-меткой. Шиповидные белки экспрессировали в клетках FreeStyle 293 (Thermo Fisher) и выделяли с помощью аффинной хроматографии с использованием колонки HisTrap (GE Healthcare) с последующей эксклюзионной хроматографией с колонкой Superdex200 (GE

Healthcare). Очищенные белки анализировали с помощью SDS-PAGE для обеспечения чистоты и соответствующей молекулярной массы.

10.2 Пример 2. Получение антител, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2

[198] Чтобы получить нейтрализующие антитела, специфичные в отношении COVID-19, гуманизированных мышей иммунизировали рецепторсвязывающим доменом (RBD) шиповидного (S) белка SARS-CoV-2 в соответствии с протоколом иммунизации RIMMS (Kilpatrick KE et al., *Hybridoma* 1997 Aug;16(4):381-9). В-клетки из лимфатических узлов и селезенки выделяли у мышей и использовали для получения гибридом (как описано в Tkaczyk et al., *Clin Vaccine Immunol* 2012 Mar;19(3):377-85). После скрининга в отношении связывания с RBD и активности в анализах с использованием псевдовируса гены V из выбранных лунок выделяли и объединяли в пары комбинаторно с использованием транскрипции и трансляции *in vitro*, как описано в Xiao et al., *MAbs* 2016 Jul;8(5):916-27, для подтверждения правильного связывания пар VH и VL.

[199] Дополнительные антитела получали, как описано в Zost *et al.* "Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein," *bioRxiv* (2020) (доступной по адресу <https://doi.org/10.1101/2020.05.12.091462>).

[200] Последовательности иллюстративных антител представлены в таблице 1.

10.3 Пример 3. Активность антител

[201] Ключевым критерием отбора антител является активность. Таким образом, активность антител тестировали в анализах нейтрализации. В анализах нейтрализации использовали SARS-CoV-2 дикого типа и лентивирус, псевдотипированный S-белком, и они описаны ниже. Заявленные антитела продемонстрировали особенно высокую активность, что свидетельствует об улучшенной способности подавлять инфекцию.

Получение лентивируса, псевдотипированного S-белком

[202] Суспендированные клетки 293 высевали и трансфицировали лентивирусным вектором третьего поколения на основе HIV, экспрессирующим люциферазу, вместе с упаковочными плазмидами, кодирующими следующее: шиповидный белок SARS2 с С-концевой делецией 19aa, Rev и Gag-pol. Среду меняли через 16-20 часов после трансфекции, и содержащую вирус надосадочную жидкость собирали через 24 часа. Клеточный дебрис удаляли посредством низкоскоростного центрифугирования, и надосадочную жидкость пропускали через фильтрующий блок с размером пор 0,45 мкм. Псевдовирус осаждали путем ультрацентрифугирования и ресуспендировали в PBS с получением исходного раствора со 100-кратной концентрацией.

Анализ нейтрализации псевдовируса

[203] Серийные разведения моноклональных антител получали в 384-луночном титрационном микропланшете и предварительно инкубировали с псевдовиром в течение 30 минут при 37°C, и к ним добавляли клетки 293, стабильно экспрессирующие ACE2. Планшет возвращали в инкубатор при 37°C на 48 часов, и люциферазную активность измеряли на многорежимном планшет-ридере EnVision 2105 (Perkin Elmer) с использованием системы анализа люциферазы Bright-Glo™ (Promega) в соответствии с рекомендациями производителя. Процент ингибирования рассчитывали относительно контроля с псевдовиром в отдельности. Значения IC50 определяли с помощью нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Graphpad Prism версии 8.1.0. Среднее значение IC50 для каждого антитела определяли на основании минимум 3 независимых экспериментов.

Антитело	IC50 для нейтрализации псевдовируса (нг/мл)
2082	7,8
2094	3,0
2096	3,3
2103	54,6
2130	1,6
2165	1,2
2196	0,7
CVH-6	7,6

[204] Результаты при использовании SARS-CoV-2 дикого типа и псевдовируса показаны на левой и правой панелях фигуры 1 соответственно. Данные на фигуре 2 показывают, что корреляция между псевдовиром и SARS-CoV-2 дикого типа является стойкой.

10.4 Пример 4. Сортировка антител

[205] Неконкурирующие антитела можно применять в комбинации для снижения вероятности устойчивости или "ускользания" вируса. Таким образом, тестировали способность антител одновременно связываться с RBD и с тримером шиповидного белка. Результаты показаны на фигуре 3.

10.5 Пример 5. Синергические пары антител

[206] Пары антител, которые действуют синергически, могут повышать активность. Поэтому исследовали способность комбинаций антител, которые связываются с разными

эпитопами шиповидного белка SARS-CoV-2, к синергизму. Результаты, показанные на фигуре 4, демонстрируют, что антитела, которые не демонстрируют одновременное связывание (например, 2196+2096 или 2196+2130), могут характеризоваться высоким синергизмом. Синергическую активность комбинаций антител 2196+2130 и 2196+2096 дополнительно изучали при различных концентрациях каждого антитела с помощью анализа с использованием псевдовirusа, описанного выше. Как показано на фигуре 5А, максимальный синергизм наблюдался при 0,1 нг/мл 2196 и 2,4 нг/мл 2130, когда отдельные антитела демонстрируют 14% и 7% нейтрализацию соответственно, но их комбинация нейтрализует 42% псевдовirusа. Аналогичные тенденции были видны на фигуре 5В, где максимальный синергизм наблюдался при 2,4 нг/мл 2196 и 12 нг/мл 2096, когда отдельные антитела демонстрируют 15% и 23% нейтрализацию соответственно, но их комбинация нейтрализует 56% псевдовirusа.

10.6 Пример 6. Аланиновое сканирование

[207] Биослойную световую интерферометрию (BLI) проводили с использованием прибора Octet RED96 (ForteBio; Pall Life Sciences). Связывание подтверждали, вначале захватывая мутантные RBD с окта-His-меткой при 10 мкг/мл (≈ 200 нМ) на биосенсорах с антителами к пента-His-метке в течение 300 секунд. Затем биосенсоры погружали в буфер для связывания (PBS/0,2% TWEEN 20) для промывки в течение 60 секунд с последующим погружением в раствор, содержащий 150 нМ pAb, на 180 секунд (ассоциация), с последующим за этим погружением в буфер для связывания на 180 секунд (диссоциация). Ответ для каждого мутантного RBD нормализовали по отношению к RBD дикого типа.

[208] Результаты для антител 2165, 2130, 2094, 2196 и 2096 показаны на фигурах 6А-6Е. Результаты для иллюстративных антител в секции 1 (см. фигуру 3) обобщенно представлены на фигуре 7. Эти данные указывают на то, что F486 и N487 шиповидного белка SARS-CoV-2 важны для взаимодействия с антителами секции 1. Результаты для иллюстративных антител в секции 4 (2094)/секции 5 (2096 и 2130) (см. фигуру 3) обобщенно представлены на фигуре 8. Эти данные указывают на то, что G447 и K444 важны для взаимодействия с антителами секции 5. На фигуре 9 показаны местоположения аминокислот шиповидного белка SARS-CoV-2, которые важны для взаимодействия с антителами секции 1, секции 4 и секции 5. С учетом того, что комбинации антител в секции 1 и секции 5 обладают высокой активностью, эти данные демонстрируют, что комбинации антител, которые связываются с F486, и/или N487 и G447, и/или K444 шиповидного белка SARS-CoV-2, являются особенно активными.

[209] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться описанными в данном документе аспектами. В действительности различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным станут очевидными специалистам в данной области из предшествующего описания и сопутствующих фигур. Предполагается, что такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

[210] Все литературные источники (например, публикации, или патенты, или заявки на патент), цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный литературный источник (например, публикация, или патент, или заявка на патент) был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[211] Некоторые аспекты находятся в рамках следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоты F486 и/или N487.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибируют связывание с шиповидным белком SARS-CoV-2 антитела, содержащего (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40; (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; (iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; или (iv) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с тем же эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, что и антитело, содержащее (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40; (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; (iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; или (iv) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) переменную область тяжелой цепи (VH),

содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40; (ii) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; (iii) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; или (iv) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 под SEQ ID NO: 41-46 соответственно или SEQ ID NO: 55-60 соответственно.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH под SEQ ID NO: 47 и/или VL под SEQ ID NO: 48 или содержат VH под SEQ ID NO: 61 и/или VL под SEQ ID NO: 62,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент необязательно содержат VH под SEQ ID NO: 47 и VL под SEQ ID NO: 48 или содержат VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 62.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим аминокислоты G447 и/или K444.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибируют связывание с шиповидным белком SARS-CoV-2 антитела, содержащего (i) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; или (ii) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7 или п. 8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с тем же эпитопом шиповидного белка

SARS-CoV-2, что и антитело, содержащее (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; или (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 7-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; или (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно реагируют с SARS-CoV.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не реагируют перекрестно с SARS-CoV.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибируют связывание SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2).

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент нейтрализуют SARS-CoV-2.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются полностью человеческими.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-16, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 17, где константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей тяжелой цепи иммуноглобулинов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 человека, где константная область тяжелой цепи необязательно представляет собой IgG1 человека.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 19, где константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей легкой цепи иммуноглобулинов IgG κ и IgG λ человека, где константная область легкой цепи необязательно представляет собой константную область легкой цепи IgG κ человека.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-20, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (i) константную область тяжелой цепи IgG1 человека и (ii) константную область легкой цепи IgG κ человека.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-21, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию YTE, где константная область тяжелой цепи необязательно представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1 человека, и константную область легкой цепи, где константная область легкой цепи необязательно представляет собой константную область легкой цепи IgG κ человека.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию TM, где константная область тяжелой цепи необязательно представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1 человека, и константную область легкой цепи, где константная область легкой цепи необязательно представляет собой константную область легкой цепи IgG κ человека.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23, которые представляют собой полноразмерное антитело.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23, которые представляют собой антигенсвязывающий фрагмент.

26. Антигенсвязывающий фрагмент по п. 25, где антигенсвязывающий фрагмент включает в себя Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), Fv, стабилизированный дисульфидными связями, домен V-NAR, IgNar, IgG Δ CH2, миниантитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, (scFv)₂ или scFv-Fc.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-26, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются выделенными.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются моноклональными.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-28, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются рекомбинантными.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, дополнительно содержащие детектируемую метку.

31. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-30.

32. Выделенный вектор, содержащий полинуклеотид по п. 31.

33. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 31, вектор по п. 32 или первый вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи, и второй вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-30.

34. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 33 таким образом, чтобы экспрессировалась молекула нуклеиновой кислоты и продуцировались антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где способ необязательно дополнительно включает выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученные посредством способа по п. 34.

36. Способ отбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий определение того, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащим аминокислоты F486 и/или N487, и отбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

37. Способ по п. 36, где определение включает измерение способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим F486A и/или N487A, и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не отбирают, если они связываются с мутантным белком.

38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, отобранные посредством способа по п. 36 или п. 37.

39. Способ отбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий определение того, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащим аминокислоты G447 и/или K444, и отбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

40. Способ по п. 39, где определение включает измерение способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-

CoV-2, содержащим G447R и/или K444A, и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не отбирают, если они связываются с мутантным белком.

41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, отобранные посредством способа по п. 38 или п. 39.

42. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-30, 35, 38 и п. 41, где композиция необязательно представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

43. Композиция, содержащая (i) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка.

44. Композиция, содержащая (i) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487, и (ii) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444.

45. Композиция по п. 43 или п. 44, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с неперекрывающимися эпитопами, и/или где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны одновременно связываться с тримером шиповидного домена SARS-CoV-2.

46. Композиция по любому из пп. 43-45, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, 7-28, 33 и п. 36.

47. Композиция по любому из пп. 43-46, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 5-28, 33 и п. 39.

48. Композиция по любому из пп. 43-47, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

49. Способ отбора комбинации антител или их антигенсвязывающих фрагментов для применения при лечении или предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, при этом способ включает определение того, что первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащим аминокислоты F486 и/или N487, определение того, что второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащим аминокислоты G447 и/или K444, и отбор двух антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

50. Способ по п. 49, где определение включает измерение способности первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим F486A и/или N487A, и/или измерение способности второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с мутантным шиповидным белком SARS-CoV-2, содержащим G447R и/или K444A, и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не отбирают, если они связываются с мутантным белком.

51. Композиция, содержащая комбинацию антител или их антигенсвязывающих фрагментов, отобранных посредством способа по п. 49 или п. 50.

52. Способ ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2, включающий приведение SARS-CoV-2 в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-30, 35, 38 и п. 41 или композицией по любому из пп. 42-48 и п. 51.

53. Способ ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2, включающий приведение SARS-CoV-2 в контакт с (i) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка.

54. Способ ингибирования связывания SARS-CoV-2 с ACE2, включающий приведение SARS-CoV-2 в контакт с (i) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом

шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487, и (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444.

55. Способ нейтрализации SARS-CoV-2, включающий приведение SARS-CoV-2 в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-30, 35, 38 и п. 41 или композицией по любому из пп. 42-48 и п. 51.

56. Способ нейтрализации SARS-CoV-2, включающий приведение SARS-CoV-2 в контакт с (i) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка.

57. Способ нейтрализации SARS-CoV-2, включающий приведение SARS-CoV-2 в контакт с (i) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487, и (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444.

58. Способ по любому из пп. 55-57, где приведение в контакт осуществляют *in vitro*.

59. Способ по любому из пп. 55-57, где приведение в контакт осуществляют в организме субъекта.

60. Способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-30, 35, 38 и п. 41 или композиции по любому из пп. 42-48 и п. 51.

61. Способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта, при этом способ включает введение субъекту (i) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка.

62. Способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта, при этом способ включает введение субъекту (i) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487, и (ii) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444.

63. Способ снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-30, 35, 38 и п. 41 или композиции по любому из пп. 42-48 и п. 51.

64. Способ снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, при этом способ включает введение субъекту (i) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с областью взаимодействия с ACE2 рецепторсвязывающего домена (RBD) шиповидного белка SARS-CoV-2, и (ii) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с верхушечным доменом RBD шиповидного белка.

65. Способ снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, при этом способ включает введение субъекту (i) первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим F486 и/или N487, и (ii) второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с шиповидным белком SARS-CoV-2, где второе антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с эпитопом шиповидного белка, содержащим G447 и/или K444.

66. Способ по любому из пп. 53-65, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с неперекрывающимися эпитопами, и/или где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны одновременно связываться с тримером шиповидного домена SARS-CoV-2.

67. Способ по любому из пп. 53-66, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, 8-30, 35 и п. 38.

68. Способ по любому из пп. 53-67, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 6-30, 35 и п. 41.

69. Способ по любому из пп. 53-68, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент необязательно вводят в отдельных фармацевтических композициях.

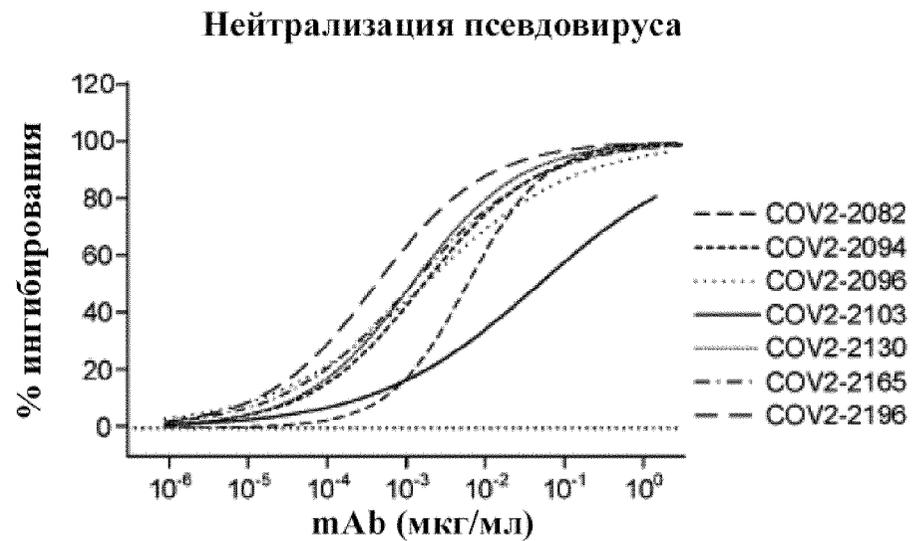
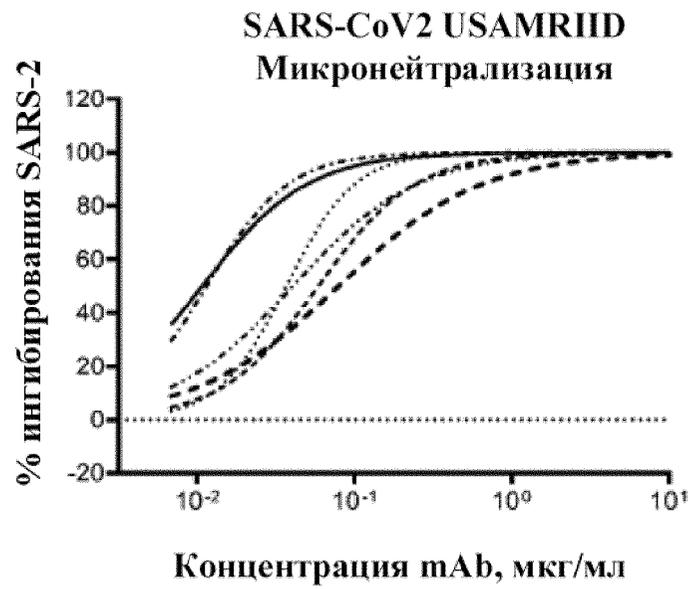
70. Способ по любому из пп. 53-68, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят последовательно.

71. Способ по любому из пп. 59-70, где субъект был заражен SARS-CoV-2 или имеет риск заражения SARS-CoV-2.

72. Способ по любому из пп. 59-71, где субъектом является человек.

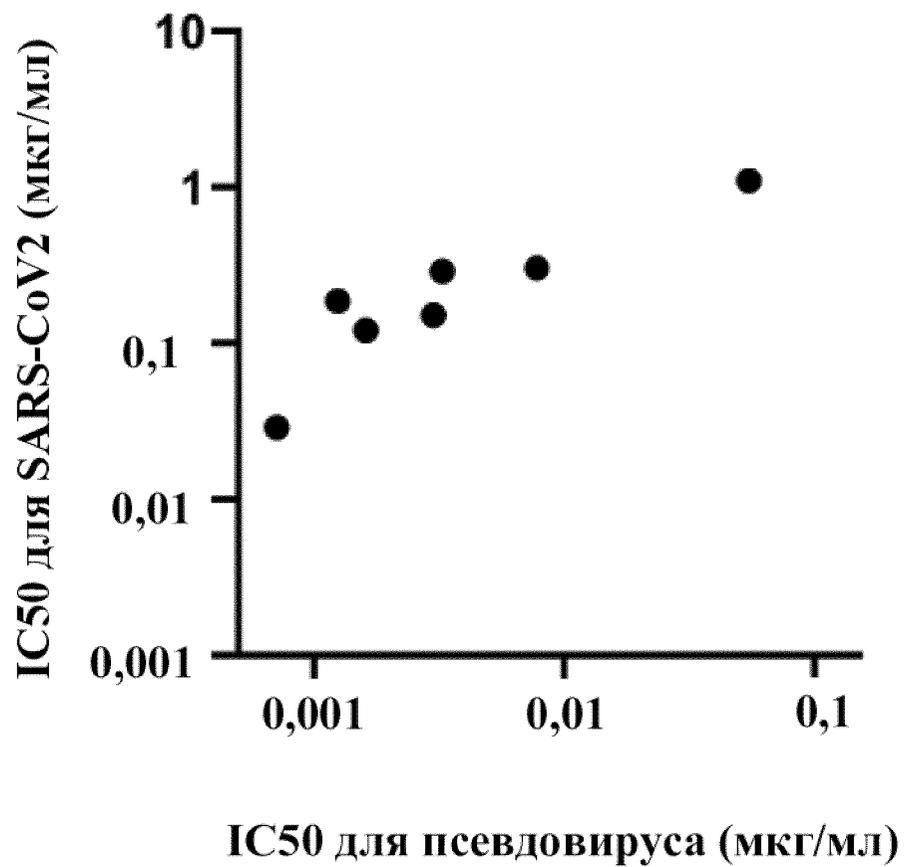
73. Способ выявления SARS-CoV-2 в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-30, 35, 38 и п. 41 или композицией по любому из пп. 42-48 и п. 51.

74. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-30, 35, 38 и п. 41 или композицию по любому из пп. 42-48 и п. 51 и а) реагент для выявления, б) антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, с) уведомление, отражающее одобрение для применения или продажи для введения человеку, или д) их комбинацию.



Фиг. 1

Корреляция IC50



Фиг. 2

Одновременное связывание IgG с RBD

	Ab	Секция										
		1b	1b	1b	1c	1d	1e	3b	3b	4	5a	5b
		mAb2										
		CVH-1	CVH-6	Уник.8	CVH-5	2196	2165	CR3022	CV4	2094	2096	2130
Секция 1b	CVH-6	X	X	X	X	X	X	✓	✓	X		
Секция 1b	Уникальное8	X	X	X	X	X	X	✓	✓	P	P	✓
Секция 1c	CVH-5	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	X	P
Секция 1d	2196	X	X	X	X	X	X	✓	✓	P	✓	✓
Секция 3b	CR3022	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	✓	✓
Секция 3b	CV4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X		
Секция 4	2094	X	X	X	X	P	X	X	X	X	✓	✓
Секция 5a	2130	✓	✓	✓	P	✓	✓	✓	✓		P	X
Секция 5b	2096	✓	✓	P	X	✓	✓	✓	✓		X	X

Одновременное связывание IgG с тримером

	Ab	Секция									
		1b	1b	1b	1c	1d	1e	4	5a	5b	
		mAb2									
		CVH-1	CVH-6	Уник.8	CVH-5	2196	2165	2094	2096	2130	
Секция 1b	CVH-1	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	
Секция 1b	CVH-6	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	
Секция 1b	Уникальное8	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	
Секция 1c	CVH-5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Секция 1d	2196	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	
Секция 1e	2165	X	P	X	P	X	X	X	✓	✓	
Секция 4	2094	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	
Секция 5a	2130	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	X	X	
Секция 5b	2096	✓	✓	P	X	✓	X	✓	X	✓	
NTD	P22-7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Фиг. 3

IC50 (нг/мл)	Повт. 1	Повт. 2	Повт. 3	Повт. 4	Повт. 5	Повт. 6	Повт. 7	Среднее	Ст.откл.	Ранг
V2196 + V2096	6,237	2,213	0,107	0,025	2,094	3,493	3,752	2,560	2,183	Высокий
V2196 + V2130	8,171	2,835	0,063	0,153	3,137	2,830	5,332	3,217	2,848	Высокий
V2165 + V2096	19,910	7,972	0,456	0,113	5,459	7,458		6,895	7,216	Низкий
V2165 + V2130	7,558	7,626	0,169	0,241	4,585	4,495		4,112	3,321	Высокий
CVH6 + V2096		40,100	5,922	0,907				15,643	21,328	Низкий
CVH6 + V2130		17,410	0,381	0,044			11,200	7,259	8,523	Низкий
V2094 + V2096		8,418	0,355	0,011	7,110	7,945	12,780	6,103	4,990	Средний
V2094 + V2130		5,497	0,137	0,034	6,721	5,677	7,243	4,218	3,266	Средний

4/13

Ограничено 0 — 100% ингибированием для аппроксимации кривой
нелинейной регрессии

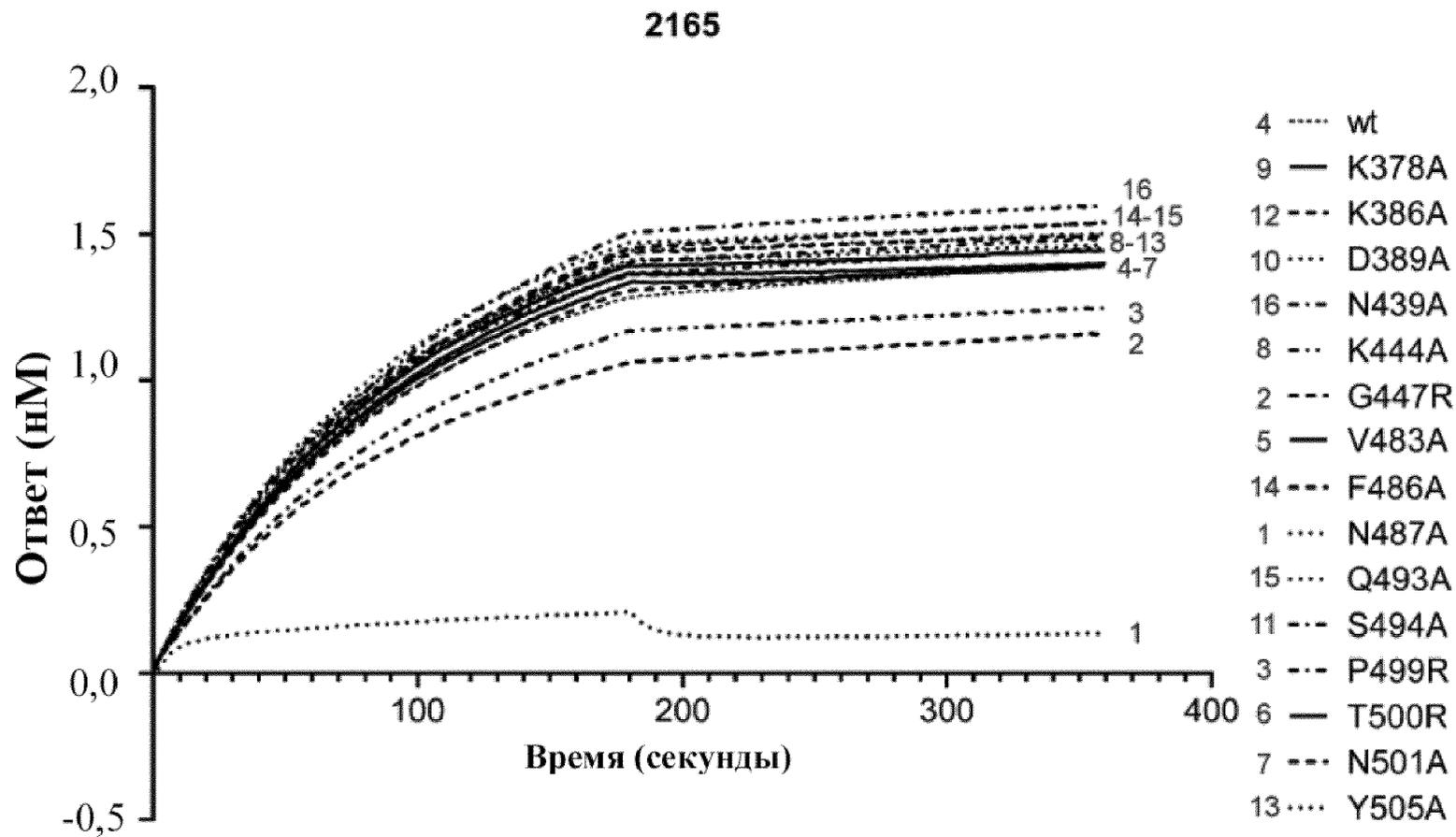
Фиг. 4

Фиг. 5А

		mAb 2196 (нг/мл)										
		1500	300	60	12	2,4	0,5	0,1	0,02	0,004	0,001	0
mAb 2130 (нг/мл)	1500	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	300	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	60	100	100	99	97	97	96	96	96	96	96	94
	12	100	100	98	72	51	49	56	51	44	48	43
	2,4	100	100	98	73	31	37	42	19	21	18	14
	0,5	100	100	98	74	27	20	13	11	22	0	0
	0,1	100	100	98	73	40	16	9	12	17	7	0
	0,02	100	100	98	68	35	23	13	7	11	3	0
	0,004	100	100	98	71	26	19	1	5	7	9	0
	0,001	100	100	98	68	28	11	19	1	0	0	0
	0	100	100	97	66	32	10	7	0	0	0	0

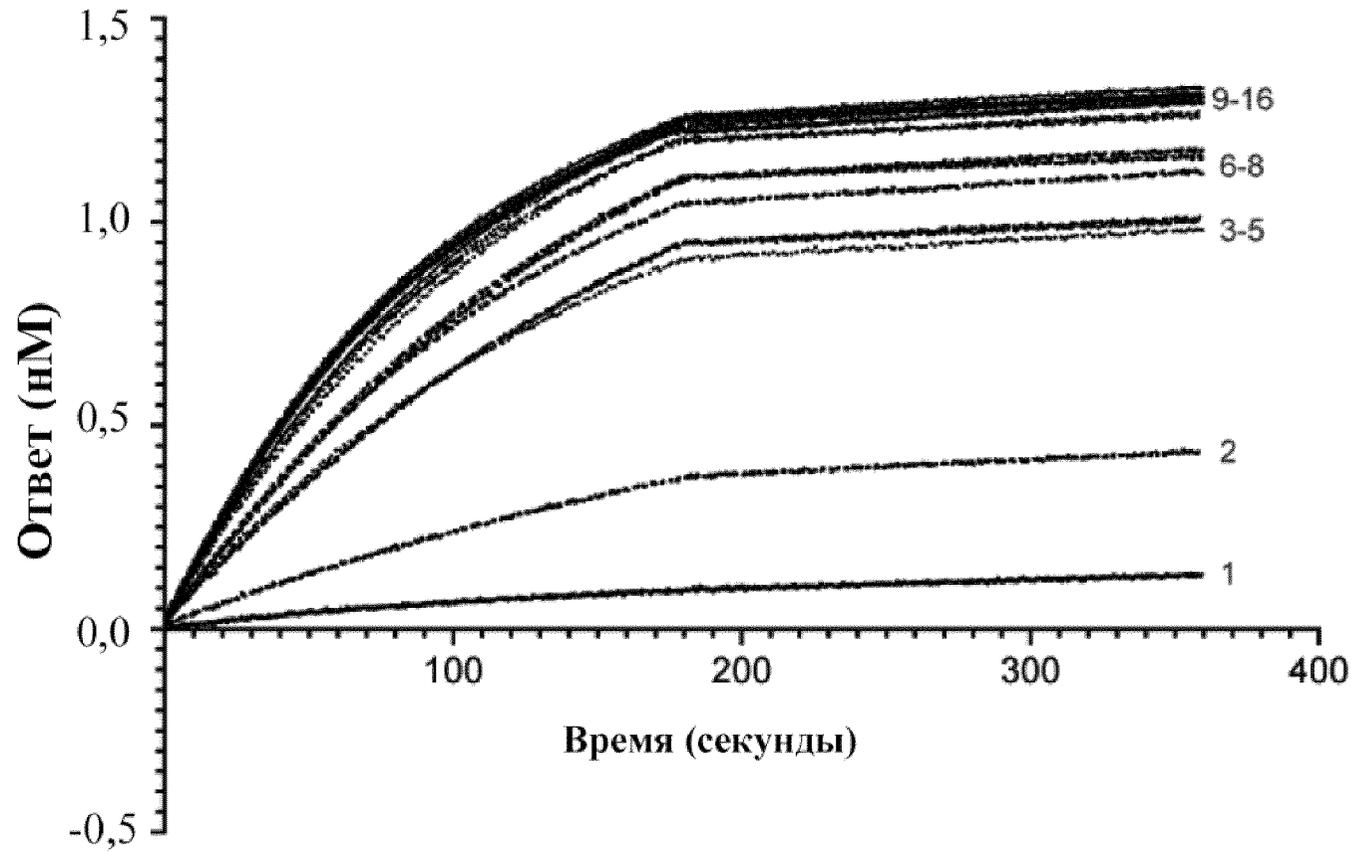
Фиг. 5В

		V2096 (нг/мл)										
		1500	300	60	12	2,4	0,5	0,1	0,02	0,004	0,001	0
V2196 (нг/мл)	1500	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	300	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	60	100	100	99	98	98	98	98	98	98	98	97
	12	100	99	95	87	79	72	77	77	78	73	69
	2,4	100	98	81	56	40	17	38	31	33	30	23
	0,5	100	97	70	39	21	11	18	19	21	20	18
	0,1	100	97	65	29	11	2	0	0	11	39	0
	0,02	100	97	69	31	18	2	10	17	6	6	0
	0,004	100	97	63	22	9	6	2	0	7	0	0
	0,001	100	97	70	15	13	0	1	0	0	0	0
	0	100	97	62	15	0	0	0	0	0	4	0



Фиг. 6А

2130

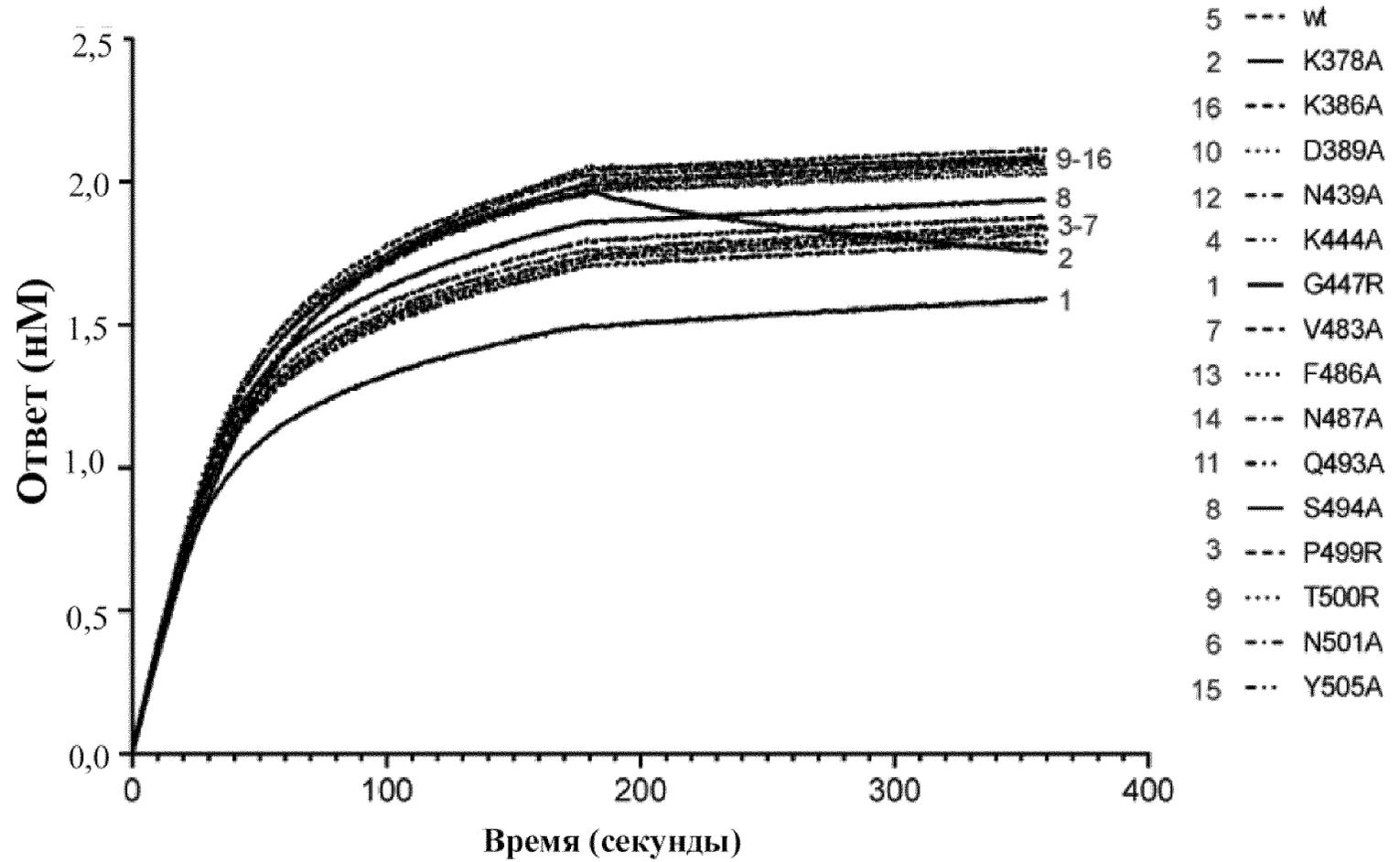


- 15 --- wt
- 16 — K378A
- 7 --- K386A
- 9 D389A
- 5 --- N439A
- 1 — K444A
- 2 --- G447R
- 11 — V483A
- 8 --- F486A
- 12 — N487A
- 4 --- Q493A
- 10 S494A
- 3 P499R
- 14 — T500R
- 6 --- N501A
- 13 Y505A

7/13

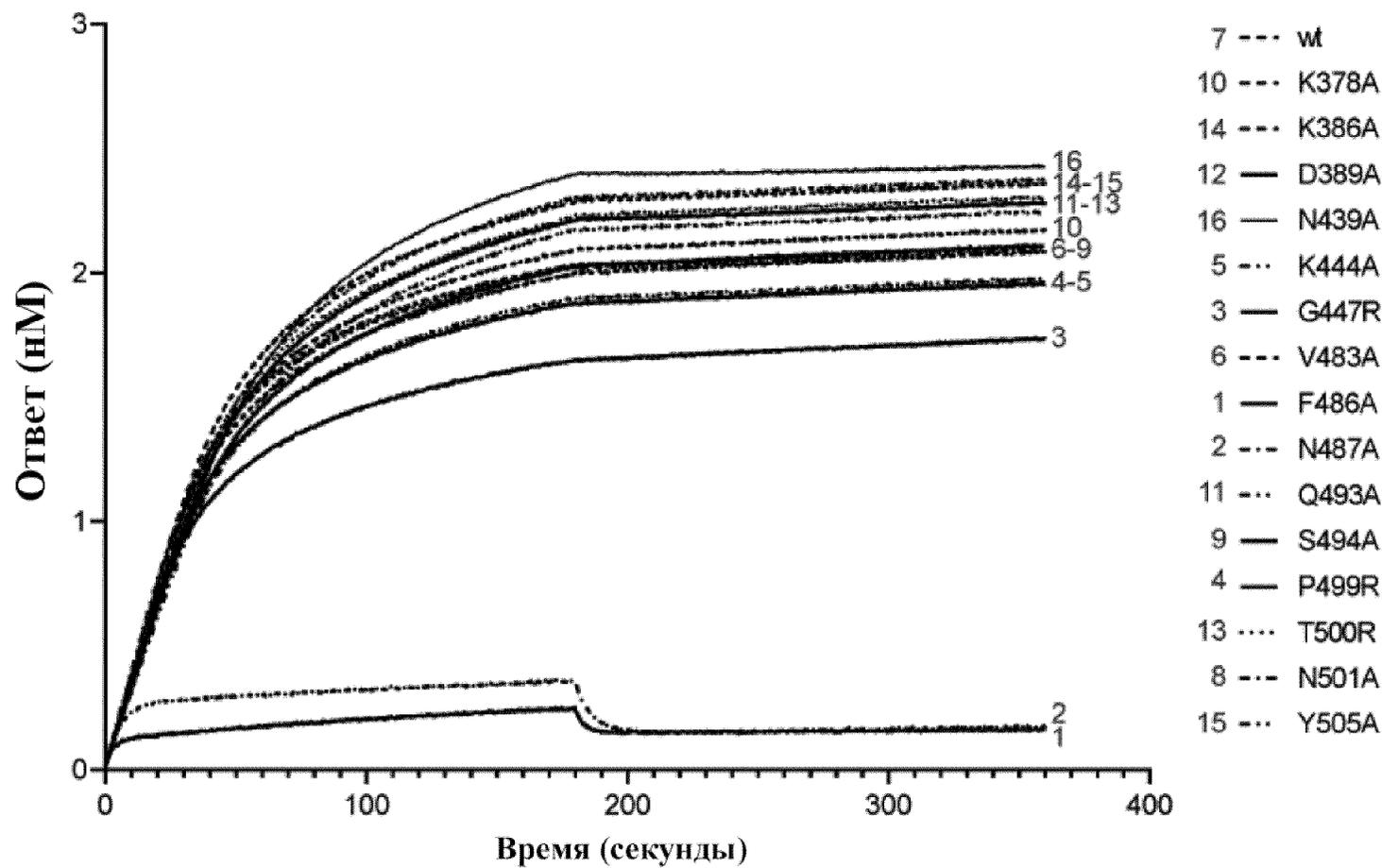
Фиг. 6В

2094



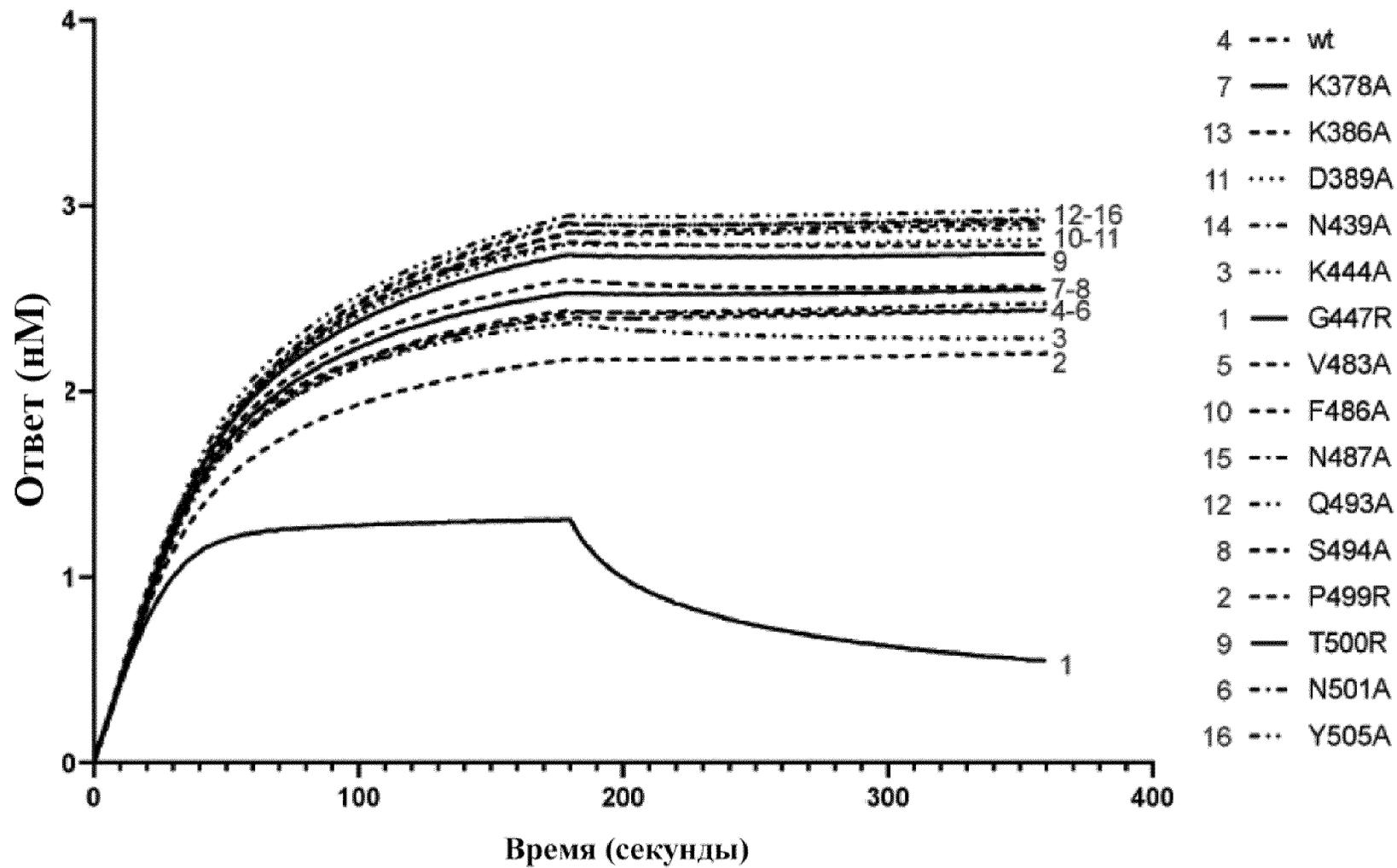
Фиг. 6С

2196

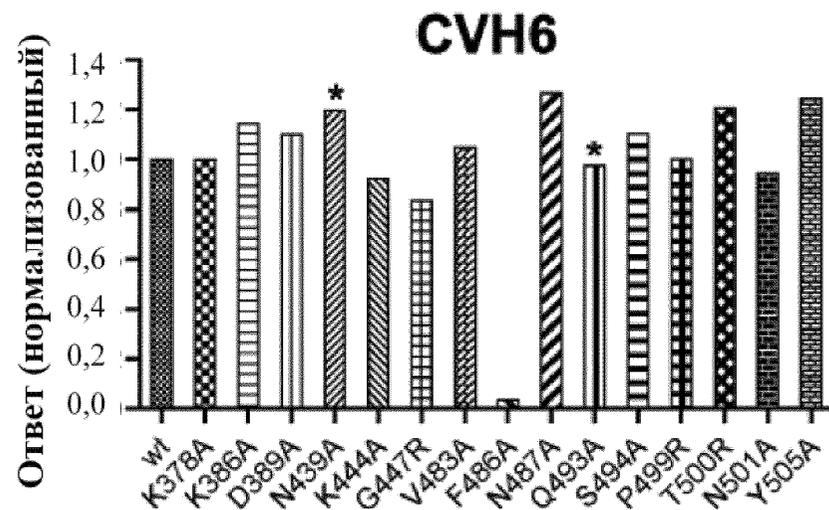
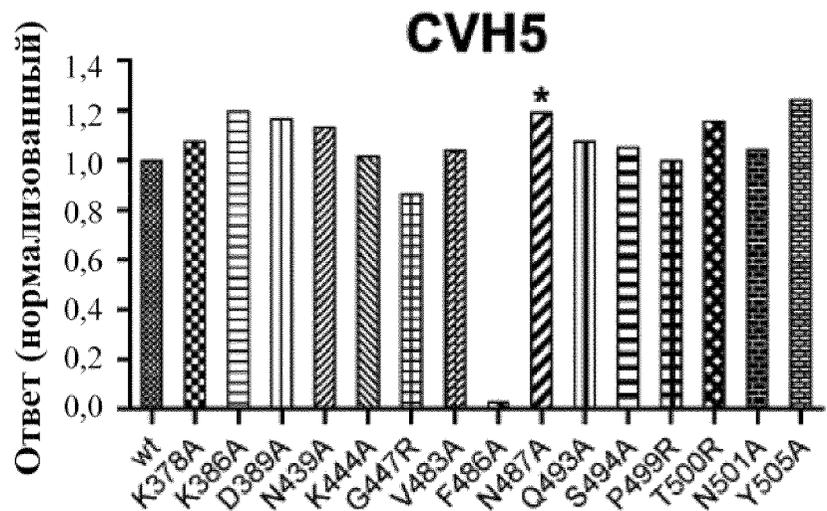
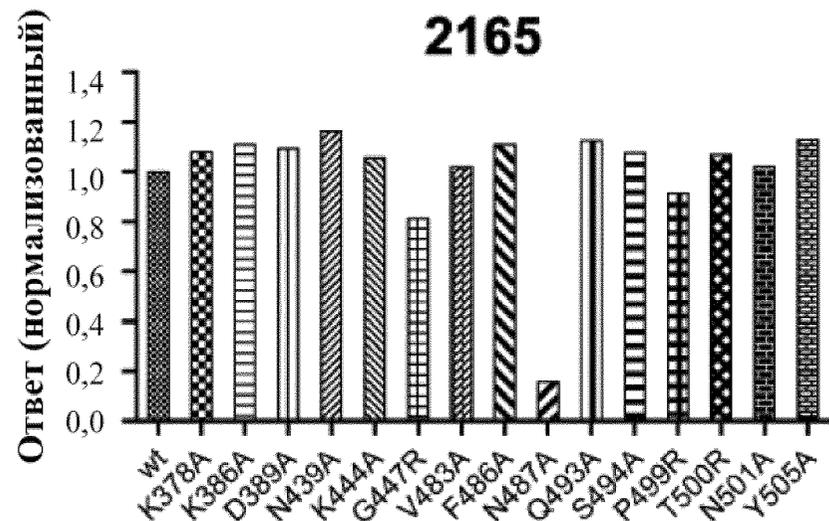
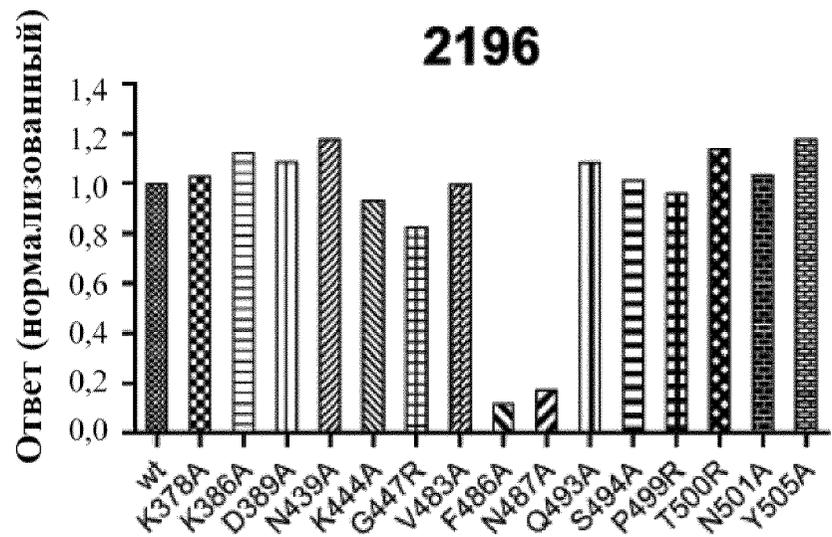


Фиг. 6D

2096

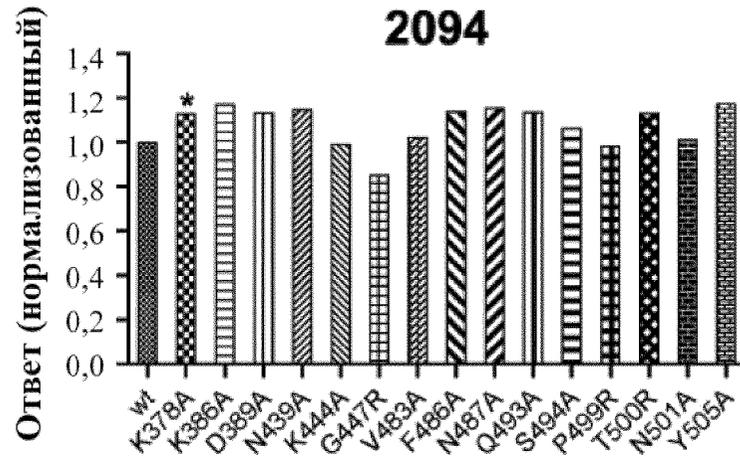
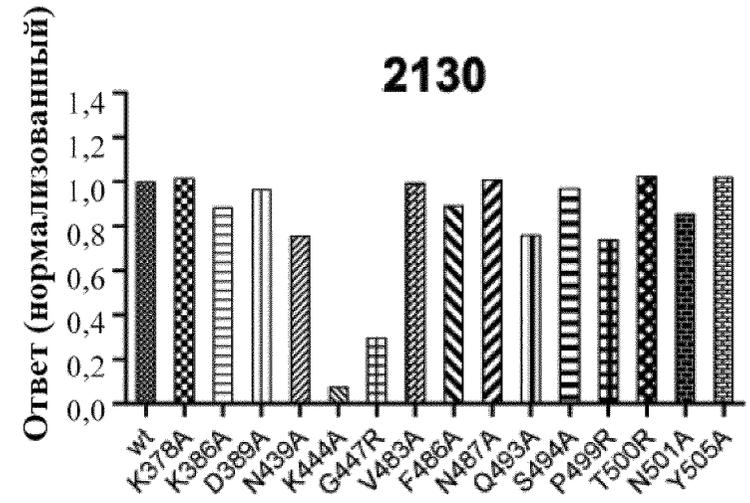
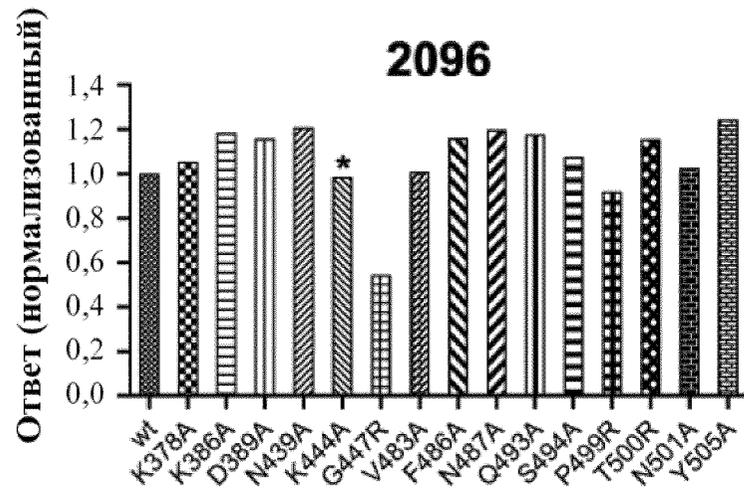


Фиг. 6Е



* = измененная кинетика указывает на проксимальный остаток

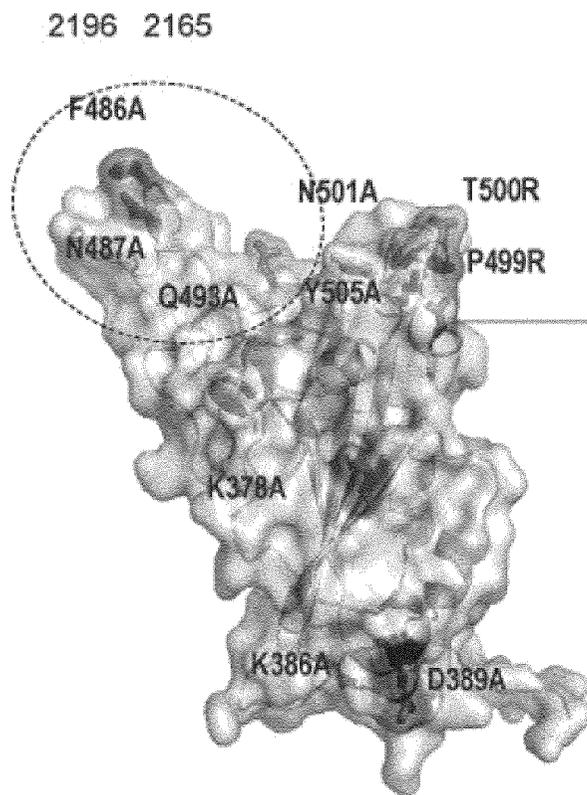
Фиг. 7



* = измененная кинетика указывает на проксимальный остаток

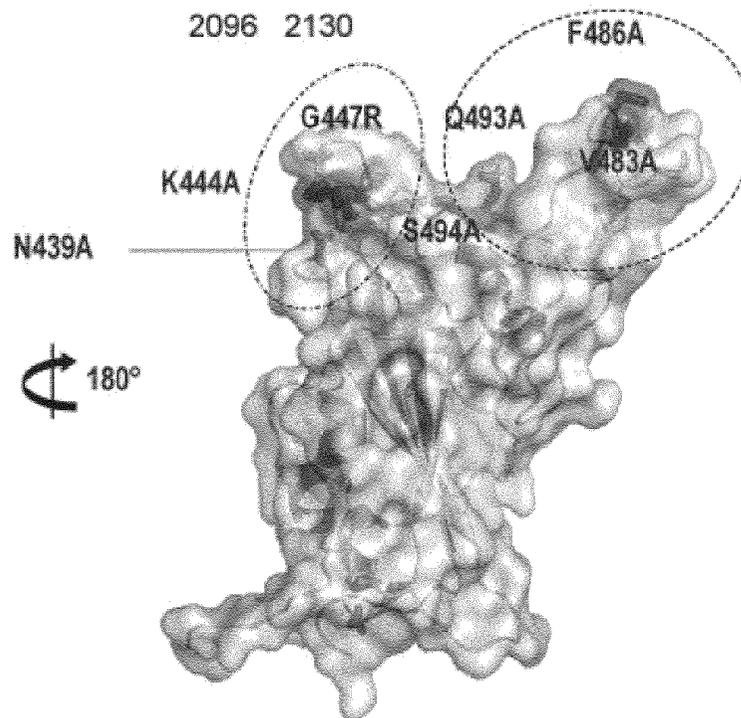
Фиг. 8

Секция 1: область взаимодействия с ACE2



Внутренняя поверхность тримера

Секция 5: верхушечный домен



Внешняя поверхность тримера

Фиг. 9