

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391730** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.30

(22) Дата подачи заявки
2020.06.25

(51) Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
A61K 49/16 (2006.01)

**(54) АНТИТЕЛА И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ ПРОТИВ
ГЛИКОПРОТЕИНА ШИПОВ SARS-CoV-2**

(31) **63/004,312; 63/014,687; 63/025,949;
63/034,865**
(32) **2020.04.02; 2020.04.23; 2020.05.15;
2020.06.04**
(33) **US**
(62) **202190836; 2020.06.25**
(71) Заявитель:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Бабб Роберт, Баум Алина, Чэнь Ган,
Джерсон Синди, Хансен Джоанна,
Хуан Тэмми, Киратсоус Кристос, Ли
Вэнь-И, Мальбек Марин, Мёрфи
Эндрю, Олсон Уильям, Шталь Нейл,
Янкопулос Джордж Д. (US)**

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

(57) В настоящем изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающиеся с белком шипов коронавируса, и способы применения таких антител и фрагментов для лечения или профилактики вирусных инфекций (например, коронавирусных инфекций). В настоящем описании раскрыты нейтрализующие антигенсвязывающие белки человека, специфично связывающиеся с SARS-CoV-2-S, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

A1

202391730

202391730

A1

АНТИТЕЛА И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ ПРОТИВ ГЛИКОПРОТЕИНА ШИПОВ SARS-COV-2

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Официальная копия перечня последовательностей предоставляется одновременно с описанием изобретения в электронном виде посредством EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с именем файла «10753WO01-Sequence.txt», датой создания 25 июня 2020 г. и размером 922462 байта. Перечень последовательностей, содержащийся в настоящем документе в формате ASCII, является частью описания и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, специфично связывающимся с белками шипов коронавируса, и к способам лечения или профилактики коронавирусных инфекций с помощью указанных антител и фрагментов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Недавно выявленные вирусы, например, коронавирусы, могут с трудом поддаваться лечению, поскольку они недостаточно исследованы. Появление этих недавно выявленных вирусов подчеркивает необходимость разработки новых противовирусных стратегий. Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2) - это недавно появившийся коронавирус, вызывающий тяжелое острое респираторное заболевание COVID-19. SARS-CoV-2 был впервые выявлен в результате вспышки в Ухане, Китай, и по состоянию на 20 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения сообщила о 209839 подтвержденных случаях в 168 странах, регионах или территориях, в результате чего 8778 человек умерли. Клинические признаки COVID-19 включают лихорадку, сухой кашель и утомляемость, и это заболевание может вызвать дыхательную недостаточность, которая приводит к смерти.

[0004] На момент публикации данной заявки не существовало вакцины или терапевтического средства для профилактики или лечения инфекции SARS-CoV-2. Ввиду продолжающейся угрозы здоровью людей существует острая необходимость в профилактических и терапевтических противовирусных препаратах для контроля SARS-CoV-2. Поскольку этот вирус использует гликопротеин своих шипов для взаимодействия с клеточным рецептором ACE2 и сериновую протеазу TMPRSS2 для проникновения в клетку-мишень, этот белок шипов представляет собой привлекательную мишень для терапии с применением антител. В частности, полностью человеческие антитела, специфично связывающиеся с белком шипов SARS-CoV-2-Spike (SARS-CoV-2-S) с высоким сродством и подавляющие инфицирующую способность вируса, могут иметь важное значение для профилактики и лечения COVID-19.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Существует потребность в нейтрализующих терапевтических антителах

против белка SARS-CoV-2-Spike (SARS-CoV-2-S) и их применении для лечения или профилактики вирусной инфекции. Настоящее изобретение частично удовлетворяет эту потребность путем предложения антител человека против SARS-CoV-2-S, например, антител из таблицы 1, и их комбинаций, включая, например, комбинации с другими терапевтическими средствами (например, противовоспалительными агентами, противомаларийными агентами, противовирусными агентами или другими антителами или антигенсвязывающими фрагментами), и способов их применения для лечения вирусных инфекций.

[0006] В настоящем изобретении предложены нейтрализующие антигенсвязывающие белки человека, специфично связывающиеся с SARS-CoV-2-S, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

[0007] В одном аспекте настоящего изобретения предложено выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающееся с белком шипов коронавируса (CoV-S), причем указанное антитело обладает одной или более из следующих характеристик: (a) связывается с CoV-S с EC_{50} менее приблизительно 10^{-9} M; (b) демонстрирует увеличение выживаемости у животного, инфицированного коронавирусом, после введения указанному животному, инфицированному коронавирусом, по сравнению с сопоставимым животным, инфицированным коронавирусом, не подвергавшимся указанному введению; и/или (c) содержит три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), содержащиеся в вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, характеризующейся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности по отношению к HCVR из таблицы 1; и три CDR легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащиеся в вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности по отношению к LCVR из таблицы 1.

[0008] В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) вариательную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 антитела из таблицы 1; и/или (b) вариательную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 антитела из таблицы 1.

[0009] В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) вариательную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к последовательности HCVR из таблицы 1; и/или (b) вариательную область легкой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к последовательности LCVR из таблицы 1.

[00010] В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 одного антитела из таблицы 1. В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит иммуноглобулин, содержащий HCVR и LCVR одного антитела из таблицы 1.

[00011] В одном аспекте настоящего изобретения предложен антигенсвязывающий белок, конкурирующий с любым из антител или антигенсвязывающих фрагментов, обсуждаемых выше или в настоящем документе, за связывание с CoV-S.

[00012] В одном аспекте настоящего изобретения предложен антигенсвязывающий белок, связывающийся с тем же эпитопом или с перекрывающимся эпитопом на CoV-S, что и любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов, обсуждаемых выше или в настоящем документе.

[00013] В любом из различных вариантов реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть мультиспецифичным.

[00014] В любом из различных вариантов реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент может обладать одним или более из следующих свойств: а) подавляет рост коронавируса; б) связывается с поверхностью коронавируса; в) ограничивает распространение коронавирусной инфекции в клетках *in vitro*; и d) защищает рекомбинантных мышей, экспрессирующих белок ACE2 или TMPRSS2 человека, от смерти и/или потери веса, вызванных коронавирусной инфекцией.

[00015] В любом из различных вариантов реализации CoV-S представляет собой SARS-CoV-2-S.

[00016] В одном аспекте настоящего изобретения предложен комплекс, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обсуждаемые выше или в настоящем документе, связанные с полипептидом CoV-S. В некоторых вариантах реализации CoV-S представляет собой SARS-CoV-2-S.

[00017] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного выше или в настоящем документе, включающий: (а) введение в клетку-хозяина одного или более полинуклеотидов, кодирующих указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент; (b) культивирование клетки-хозяина в условиях, благоприятных для экспрессии одного или более полинуклеотидов; и (с) необязательно, выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина и/или среды, в которой растет клетка-хозяин. В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомяка.

[00018] В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, являющиеся продуктом способа, обсуждаемого выше.

[00019] В одном аспекте настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий: (а) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 домена HCVR антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность

HCVR, представленную в таблице 1; или (b) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 домена LCVR цепи иммуноглобулина, содержащего аминокислотную последовательность LCVR, представленную в таблице 1.

[00020] В одном аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, обсуждаемый выше.

[00021] В одном аспекте настоящего изобретения предложен вектор, содержащий полинуклеотид, обсуждаемый выше.

[00022] В одном аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент или полипептид или полинуклеотид или вектор, обсуждаемые выше или в настоящем документе.

[00023] В одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция или набор, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обсуждаемые выше или в настоящем документе, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом.

[00024] В одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обсуждаемые выше или в настоящем документе, фармацевтически приемлемый носитель и, необязательно, дополнительный терапевтический агент. В некоторых вариантах реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой противовирусное лекарственное средство или вакцину. В некоторых вариантах реализации дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: противовоспалительного агента, противомаларийного агента, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфично связывающегося с TMPRSS2, и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфично связывающегося с CoV-S. В некоторых случаях противомаларийный агент представляет собой хлорохин или гидроксихлорохин. В некоторых случаях противовоспалительный агент представляет собой антитело, например, сарилумаб, тоцилизумаб или гимсилумаб. В некоторых вариантах реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из таблицы 1.

[00025] В одном аспекте настоящего изобретения предложен сосуд или изделие для инъекций, содержащие антигенсвязывающий белок, антитело или антигенсвязывающий фрагмент или композицию, обсуждаемые выше или в настоящем документе.

[00026] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики инфекции коронавируса у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента, обсуждаемого выше или в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации коронавирус выбран из группы, состоящей из SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV.

[00027] В некоторых вариантах реализации способа лечения или профилактики инфекции коронавируса субъекту вводят один или более из дополнительных

терапевтических агентов. В некоторых случаях один или более из дополнительных терапевтических агентов представляют собой противовирусное лекарственное средство или вакцину. В некоторых случаях один или более из дополнительных терапевтических агентов выбирают из группы, состоящей из: противовоспалительного агента, противомаларийного агента, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфично связывающего TMPRSS2, и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфично связывающегося с CoV-S. В некоторых случаях противомаларийный агент представляет собой хлорохин или гидроксихлорохин. В некоторых случаях противовоспалительный агент представляет собой антитело, например, сарилумаб, тоцилизумаб или гимсилумаб. В некоторых вариантах реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из таблицы 1. Другие антитела, которые можно применять по отдельности или в комбинации друг с другом или с одним или более антителами, описанными в настоящем документе, для применения в контексте способов согласно настоящему изобретению, включают, например, LY-CoV555 (Eli Lilly); 47D11 (Wang et al., Nature Communications, статья № 2251); B38, H4, B5 и/или H2 (Wu et al., 10.1126/science.abc2241 (2020); STI-1499 (Sorrento Therapeutics); VIR-7831 и VIR-7832 (Vir Biotherapeutics).

[00028] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, обсуждаемого выше или в настоящем документе, в организм субъекта, включающий инъекцию антитела или антигенсвязывающего фрагмента в организм субъекта. В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в организм субъекта подкожно, внутривенно или внутримышечно.

[00029] В любом из различных вариантов реализации, обсуждаемых выше или в настоящем документе, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность вариабельного домена VH3-66 или Vk1-33.

[00030] В одном аспекте настоящего изобретения предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие белок шипов SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, причем указанное выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202, и три области, определяющие комплементарность (CDR) легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 210.

[00031] В некоторых вариантах реализации HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 204, HCDR2 содержит

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 206, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 208, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 212, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, а LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 214. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 210. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 210.

[00032] В одном аспекте настоящего изобретения предложено выделенное антитело, связывающее белок шипов SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, причем указанное выделенное антитело содержит константную область иммуноглобулина, три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202, и три области, определяющие комплементарность (CDR) легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 210.

[00033] В некоторых вариантах реализации HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 204, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 206, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 208, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 212, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, а LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 214. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 210. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 216, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 218. В некоторых случаях константная область иммуноглобулина представляет собой константную область IgG1. В некоторых случаях выделенное антитело представляет собой рекомбинантное антитело. В некоторых случаях выделенное антитело является

мультиспецифичным.

[00034] В одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело, обсуждаемое выше или в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[00035] В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй терапевтический агент. В некоторых случаях второй терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из: второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающего белок шипов SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, противовоспалительный агент, противомалярийный агент и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TMPRSS2.

[00036] В некоторых вариантах реализации второе терапевтическое средство представляет собой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее белок шипов SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832. В некоторых случаях второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 646. В некоторых случаях второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 642; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 499; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 644; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 648; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 650; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 652. В некоторых случаях второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 646. В некоторых случаях второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 654, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 656.

[00037] В одном аспекте настоящего изобретения предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие белок шипов SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, причем указанное выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640, и три области, определяющие комплементарность (CDR) легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 646.

[00038] В некоторых вариантах реализации HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 642, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 499, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 644, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 648, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 650, а LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 652. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 646. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 646.

[00039] В одном аспекте настоящего изобретения предложено выделенное антитело, связывающее белок шипов SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, причем указанное выделенное антитело содержит константную область иммуноглобулина, три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640, и три области, определяющие комплементарность (CDR) легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 646.

[00040] В некоторых вариантах реализации HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 642, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 499, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 644, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 648, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 650, а LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 652. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:

646. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 654, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 656. В некоторых случаях константная область иммуноглобулина представляет собой константную область IgG1. В некоторых случаях выделенное антитело представляет собой рекомбинантное антитело. В некоторых случаях выделенное антитело является мультиспецифичным.

[00041] В одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело, обсуждаемое выше или в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[00042] В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй терапевтический агент. В некоторых случаях второй терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из: второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающего белок шипов SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, противовоспалительный агент, противомаларийный агент и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TMPRSS2.

[00043] В некоторых вариантах реализации второе терапевтическое средство представляет собой второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее белок шипов SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832. В некоторых случаях второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 210. В некоторых случаях второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 204; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 206; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 208; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 212; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 214. В некоторых случаях второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 210. В некоторых случаях второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 216, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 218.

[00044] В различных вариантах реализации любые из признаков или компонентов вариантов реализации, обсуждаемых выше или в настоящем документе, можно комбинировать, и такие комбинации входят в рамки настоящего изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или в настоящем документе, можно комбинировать с другим связанным значением, обсуждаемым выше или в настоящем документе, обозначая диапазон, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны входят в рамки настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00045] На фигуре 1 показаны данные блокирующего твердофазного ИФА для выбранных антител против SARS-CoV-2-S против белка шипов SARS-CoV-2, предотвращающих связывание белка шипов с его рецептором ACE2.

[00046] На фигуре 2 показаны данные блокирующего твердофазного ИФА для выбранных антител против SARS-CoV-2-S против белка шипов SARS-CoV-2, предотвращающих связывание белка шипов с его рецептором ACE2.

[00047] На фигуре 3 показаны данные блокирующего твердофазного ИФА для выбранных антител против SARS-CoV-2-S против белка шипов SARS-CoV-2, предотвращающих связывание белка шипов с его рецептором ACE2.

[00048] На фигуре 4 показаны данные блокирующего твердофазного ИФА для выбранных антител против SARS-CoV-2-S против белка шипов SARS-CoV-2, предотвращающих связывание белка шипов с его рецептором ACE2.

[00049] На фигуре 5 показаны данные блокирующего твердофазного ИФА для выбранных антител против SARS-CoV-2-S против белка шипов SARS-CoV-2, предотвращающих связывание белка шипов с его рецептором ACE2.

[00050] На фигуре 6 показаны данные блокирующего твердофазного ИФА для выбранных антител против SARS-CoV-2-S против белка шипов SARS-CoV-2, предотвращающих связывание белка шипов с его рецептором ACE2.

[00051] На фигуре 7 показаны данные блокирующего твердофазного ИФА для выбранных антител против SARS-CoV-2-S против белка шипов SARS-CoV-2, предотвращающих связывание белка шипов с его рецептором ACE2.

[00052] На фигуре 8 показаны данные блокирующего твердофазного ИФА для выбранных антител против SARS-CoV-2-S против белка шипов SARS-CoV-2, предотвращающих связывание белка шипов с его рецептором ACE2.

[00053] На фигуре 9A и фигуре 9B показаны частоты гена V для парных тяжелых (ось X) и легких (ось Y) цепей выделенных нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 для мышей VelocImmune® (фигура 9A; N=185) и выздоравливающих доноров-людей (фигура 9B; N=68). Оттенок и размер круга соответствуют количеству пар тяжелых и легких цепей, присутствующих в репертуаре выделенных нейтрализующих антител. Нейтрализацию определяют как > 70% при разбавлении антитела в соотношении 1:4 (~ 2 мкг/мл) в анализе нейтрализации псевдочастиц VSV.

[00054] На фигуре 10А и фигуре 10В показана эффективность нейтрализации. На фигуре 10А показана эффективность нейтрализации мАт против шипов SARS-CoV-2. Серийные разведения мАт против шипов, изотипического контрольного IgG1 и рекомбинантного димерного ACE2 (hACE2.hFc) добавляли с pVSV-SARS-CoV-2-S-mNeon к клеткам Vero и измеряли экспрессию mNeon через 24 часа после инфицирования как показания инфекционной способности вируса. Данные представлены в виде процента нейтрализации относительно контрольной инфекции только вирусом. На фигуре 10В показана эффективность нейтрализации отдельных мАт против шипов и комбинаций мАт против вируса SARS-CoV-2-S в клетках VeroE6.

[00055] На фигуре 11 показан анализ объединения эпитопов на основании матрицы анализов связывания заранее полученной смеси различных мАт против SARS-CoV-2. Объединение эпитопов выполняли против девяти описанных мАт против SARS-CoV-2. Для каждого графика были представлены три фазы (I, II и III). В I фазе мАт против SARS-CoV-2 (20 мкг/мл) загружали в зонд против Fc человека. Во II фазе раствор блокирующих антител человека IgG1 (100 мкг/мл). В III фазе раствор 100 нМ комплекса заранее полученной смеси RBD-MMH SARS CoV-2 и 600 нМ мАт против каждого сайта связывания SARS-CoV-2 протекал через зонд для захвата мАт.

[00056] На фигуре 12 представлена трехмерная модель поверхности структуры домена RBD белка шипов, на которой показана область взаимодействия с ACE2 и результаты картирования эпитопа HDX-MS. Остатки RBD, защищенные антителами против шипов SARS-CoV2, обозначены затенением, которое отражает степень защиты, определенную в экспериментах HDX-MS. Структура RBD приведена на основании PDB 6M17.

[00057] На фигуре 13А и фигуре 13В показан комплекс мАт10933 и мАт10987 с RBD SARS-CoV-2. На фигуре 13А представлена криоЭМ-карта 3,9 Å комплекса мАт10933+RBD+мАт10987, затененная в соответствии с цепями в уточненной модели на фигуре 13В. Выявлены RBD, тяжелая и легкая цепи мАт10933 и тяжелая и легкая цепи мАт10987.

[00058] На фигуре 14 показана статистика данных криоЭМ. Статистика сбора и уточнения данных представлена для структуры комплекса мАт10987+мАт10933+RBD SARS-CoV-2, показанной на фигуре 13А и фигуре 13В.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00059] Перед описанием способов согласно настоящему изобретению следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена исключительно для описания определенных вариантов реализации, и ее не следует рассматривать как ограничивающую, поскольку рамки настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[00060] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в

настоящем документе, имеют то же значение, что обычно используют специалисты в области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, можно применять при практической реализации или испытании настоящего изобретения, в настоящем документе описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

[00061] Термин «коронавирус» или «CoV» относится к любому вирусу семейства коронавирусов, включая SARS-CoV-2, MERS-CoV и SARS-CoV, но не ограничиваясь ими. SARS-CoV-2 относится к недавно появившемуся коронавирусу, выявленному в качестве причины серьезной вспышки заболевания, которая началась в Ухане, Китай, и быстро распространяется на другие районы земного шара. SARS-CoV-2 также известен как коронавирус 2019-nCoV и коронавирус Ухань. Он связывается посредством белка шипов вируса с рецептором ангиотензинпревращающего фермента-2 (ACE2) клетки-хозяина. Белок шипов также связывается с TMPRSS2, который расщепляет белок шипов и активирует слияние вируса с мембраной.

[00062] Термин «CoV-S», также известный как «S» или «S-белок», относится к белку шипов коронавируса и может относиться к конкретному S-белку, например, SARS-CoV-2-S, MERS-CoV S и SARS-CoV S. Белок шипов SARS-CoV-2 представляет собой мембранный гликопротеин I типа, состоящий из 1273 аминокислот, собирающийся в тримеры, которые составляют шипы или пепломеры на поверхности оболочечной частицы коронавируса. Этот белок выполняет две основные функции: связывание с рецептором хозяина и слияние с мембраной, которые приписываются N-концевой (S1) и C-концевой (S2) половинам S-белка. CoV-S связывается со своим рецептором через рецептор-связывающий домен (RBD), присутствующий в субъединице S1. Аминокислотная последовательность полноразмерного белка шипов SARS-CoV-2 представлена аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 832. Термин «CoV-S» включает варианты белка шипов CoV, выделенные из различных изолятов CoV, а также рекомбинантный белок шипов CoV или его фрагмент. Этот термин также включает белок шипов CoV или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, например, ROR1.

[00063] Термин «коронавирусная инфекция» или «инфекция CoV» в настоящем документе относится к инфекции коронавируса, например, SARS-CoV-2, MERS-CoV или SARS-CoV. Этот термин включает коронавирусные инфекции дыхательных путей, часто нижних дыхательных путей. Симптомы могут включать высокую температуру, сухой кашель, одышку, пневмонию, желудочно-кишечные симптомы, например, диарею, органную недостаточность (почечную недостаточность и дисфункцию почек), септический шок и, в тяжелых случаях, смерть.

Вирусы

[00064] Настоящее изобретение включает способы лечения или профилактики

вирусной инфекции у субъекта. Термин «вирус» включает любой вирус, инфекция которого в организме субъекта поддается лечению или профилактике путем введения антитела против CoV-S или его антигенсвязывающего фрагмента (например, если инфекционность вируса по меньшей мере частично зависит от CoV-S). В одном из вариантов реализации настоящего изобретения «вирус» представляет собой любой вирус, который экспрессирует белок шипов (например, CoV-S). Термин «вирус» также включает CoV-S-зависимый респираторный вирус, который представляет собой вирус, поражающий ткань органов дыхания субъекта (например, верхних и/или нижних дыхательных путей, трахеи, бронхов, легких), и поддается лечению или профилактике путем введения антитела против CoV-S или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения вирус включает коронавирус, SARS-CoV-2 (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2), SARS-CoV (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома) и MERS-CoV (коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS)). Коронавирусы могут включать роды альфа-коронавирусов, бета-коронавирусов, гамма-коронавирусов и дельта-коронавирусов. В некоторых вариантах реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем документе, могут связываться с альфа-коронавирусом, бета-коронавирусом, гамма-коронавирусом и/или дельта-коронавирусом и/или нейтрализовать их. В некоторых вариантах реализации это связывание и/или нейтрализация могут быть специфичными по отношению к конкретному роду коронавирусов или для конкретной подгруппы родов. «Вирусная инфекция» относится к инвазии и размножению вируса в организме субъекта.

[00065] Вирионы коронавируса имеют сферическую форму диаметром приблизительно 125 нм. Самая характерная особенность коронавирусов - это булавовидные выступы-шипы на поверхности вириона. Эти шипы являются определяющей особенностью вириона и придают ему вид солнечной короны, что и обуславливает название "коронавирусы". Внутри оболочки вириона находится нуклеокапсид. Коронавирусы содержат спирально-симметричные нуклеокапсиды, что необычно для вирусов с положительной РНК, но гораздо чаще встречается у вирусов с отрицательной РНК. SARS-CoV-2, MERS-CoV и SARS-CoV относятся к семейству коронавирусов. Первоначальное присоединение вириона к клетке-хозяину инициируется взаимодействиями между S-белком и его рецептором. Сайты рецепторсвязывающих доменов (RBD) в области S1 S-белка коронавируса различаются в зависимости от вируса, причем некоторые из них содержат RBD на С-конце S1. Взаимодействие S-белок/рецептор является основным фактором, определяющим возможность инфекции вида-хозяина коронавирусом, а также определяет тропизм вируса к тканям. Многие коронавирусы используют пептидазы в качестве клеточных рецепторов. После связывания рецептора вирус должен получить доступ к цитозолю клетки-хозяина. Обычно это достигается посредством кислотозависимого протеолитического расщепления S-белка катепсином, TMPRSS2 или другой протеазой с последующим слиянием вирусной и клеточной мембран.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты против CoV-S

[00066] В настоящем изобретении предложены антигенсвязывающие белки, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающиеся с белком шипов CoV или его антигенным фрагментом.

[00067] В настоящем документе термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина, содержащим четыре полипептидные цепи - две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), соединенные дисульфидными связями (т.е. «полным молекулам антитела»), а также их мультимерам (например, IgM). Примеры антител включают, например, антитела, перечисленные в таблице 1. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константную область тяжелой цепи (состоящую из доменов C_H1, C_H2 и C_H3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи ("LCVR" или "V_L") и константной области легкой цепи (C_L). В V_H- и V_L-областях можно дополнительно выделить области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые разделены более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR, расположенные от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR тяжелой цепи также можно называть HCDR или CDR-H и нумеровать, как описано выше (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 или CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). Аналогично, CDR легкой цепи можно называть LCDR или CDR-L и нумеровать LCDR1, LCDR2 и LCDR3 или CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) идентичны последовательностям зародышевой линии человека или модифицированы естественным или искусственным образом. Примеры последовательностей зародышевой линии человека включают VH3-66 и Vk1-33, но не ограничиваются ими. Таким образом, в настоящем изобретении предложены антитела против CoV-S или их антигенсвязывающие фрагменты (например, антитела против SARS-CoV-2-S или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащие последовательности HCDR и LCDR из таблицы 1 внутри переменной области тяжелой или легкой цепи VH3-66 или Vk1-33. Кроме того, в настоящем изобретении предложены антитела против CoV-S или их антигенсвязывающие фрагменты (например, антитела против SARS-CoV-2-S или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащие последовательности HCDR и LCDR из таблицы 1 в комбинации легкая цепь, выбранная из IgKV4-1, IgKV1-5, IgKV1-9, IgKV1-12, IgKV3-15, IgKV1-16, IgKV1-17, IgKV3-20, IgLV3-21, IgKV2-24, IgKV1-33, IgKV1-39, IgLV1-40, IgLV1-44, IgLV1-51, IgLV3-1, IgKV1-6, IgLV2-8, IgKV3-11, IgLV2-11, IgLV2-14, IgLV2-23 или IgLV6-57, и тяжелая цепь, выбранная из gHV1-69, IgHV3-64, IgHV4-59, IgHV3-53, IgHV3-48, IgHV4-34, IgHV3-33, IgHV3-30, IgHV3-23, IgHV3-20, IgHV1-18, IgHV3-15, IgHV3-11, IgHV3-9, IgHV1-8, IgHV3-7, IgHV2-5, IgHV1-2, IgHV2-70, IgHV3-66, IgHV5-51, IgHV1-46, IgHV4-39, IgHV4-31, IgHV3-30-3, IgHV2-26 или IgHV7-4-1. Кроме того, в настоящем изобретении предложены антитела против CoV-S или их антигенсвязывающие фрагменты (например, антитела против SARS-CoV-2-S или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащие последовательности HCVR и LCVR из

таблицы 1 в комбинации легкая цепь, выбранная из IgKV4-1, IgKV 1-5, IgKV1-9, IgKV1-12, IgKV3-15, IgKV1-16, IgKV1-17, IgKV3-20, IgLV3-21, IgKV2-24, IgKV1-33, IgKV1-39, IgLV1-40, IgLV1-44, IgLV1-51, IgLV3-1, IgKV1-6, IgLV2-8, IgKV3-11, IgLV2-11, IgLV2-14, IgLV2-23 или IgLV6-57, и тяжелая цепь, выбранная из gHV1-69, IgHV3-64, IgHV4-59, IgHV3-53, IgHV3-48, IgHV4-34, IgHV3-33, IgHV3-30, IgHV3-23, IgHV3-20, IgHV1-18, IgHV3-15, IgHV3-11, IgHV3-9, IgHV1-8, IgHV3-7, IgHV2-5, IgHV1-2, IgHV2-70, IgHV3-66, IgHV5-51, IgHV1-46, IgHV4-39, IgHV4-31, IgHV3-30-3, IgHV2-26 или IgHV7-4-1.

[00068] В типичном случае переменные домены как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина содержат три гиперпеременные области, также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), расположенные внутри относительно консервативных каркасных областей (FR). Как правило, переменные домены как легкой, так и тяжелой цепей содержат от N-конца к С-концу FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В варианте реализации настоящего изобретения присвоение аминокислот каждому домену соответствует определениям Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 или Chothia, *et al.*, (1989) Nature 342:878-883.

[00069] В настоящем изобретении предложены моноклональные антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также моноклональные композиции, содержащие множество выделенных моноклональных антигенсвязывающих белков. В настоящем документе термин «моноклональное антитело» относится к популяции по сути однородных антител, т.е. молекулы антитела, составляющие популяцию, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. «Множество» таких моноклональных антител и фрагментов в композиции относится к концентрации идентичных (т.е., как обсуждалось выше, идентичных по аминокислотной последовательности, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах) антител и фрагментов, превышающей концентрацию, обычно встречающуюся в природе, например, в крови организма-хозяина, например, мыши или человека.

[00070] В одном варианте реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержит константный домен тяжелой цепи, например, типа IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) или IgM. В варианте реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий белок, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержит константный домен легкой цепи, например, типа каппа или лямбда.

[00071] В настоящем документе термин антигенсвязывающий белок, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент "человека", включает антитела и фрагменты,

содержащие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека в клетке человека или пересаженные в клетку, не являющуюся клеткой человека, например, клетку мыши. См., например, US8502018, US6596541 или US5789215. МАТ человека согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. В то же время в настоящем документе термин «антитело человека» не предполагает включение МАТ, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), пересажены на FR-последовательности человека. Указанный термин включает антитела, рекомбинантно продуцируемые в организме млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Указанный термин не предназначен для включения антител, выделенных из или полученных в организме субъекта-человека. См. ниже.

[00072] Настоящее изобретение включает химерные антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, и способы их применения. В настоящем документе термин «химерное антитело» представляет собой антитело, содержащее переменный домен первого антитела и константный домен второго антитела, причем первое и второе антитела получены из разных видов животных. (US4816567; и Morrison *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855).

[00073] Настоящее изобретение включает гибридные антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, и способы их применения. В настоящем документе термин «гибридное антитело» представляет собой антитело, содержащее переменный домен первого антитела и константный домен второго антитела, причем первое и второе антитела получены от различных животных, или переменный домен (но не константная область) получен от первого животного. Например, переменный домен можно взять из антитела, выделенного из организма человека, и экспрессировать с фиксированной константной областью, выделенной не из этого антитела. Типичные гибридные антитела описаны в примере 1, который относится к продуктам ПЦР, полученным на основе переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи антитела, клонированным в экспрессирующие векторы, содержащих константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, соответственно. Гибридные антитела являются синтетическими и не встречаются в природе, поскольку содержащиеся в них переменные и константные области не выделены из единого природного источника.

[00074] Термин «рекомбинантные» антигенсвязывающие белки, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, относится к таким молекулам, созданным, экспрессируемым, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в данной области техники, например, технологии рекомбинантных ДНК, которая включает, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Этот термин включает

антитела, экспрессируемые в организме млекопитающего, не являющихся человеком (в том числе трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например, трансгенных мышей), или в клеточной (например, на основе клеток СНО) системе экспрессии, или в системе экспрессии на основе клеток, не являющихся клетками человека, или выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител человека. В некоторых вариантах реализации рекомбинантное антитело имеет общую последовательность с антителом, выделенным из организма (например, мыши или человека), но экспрессированным посредством технологии рекомбинантных ДНК. Такие антитела могут включать посттрансляционные модификации (например, гликозилирование), которые отличаются от модификаций антитела, выделенного из организма.

[00075] Рекомбинантные антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно получить в системе экспрессии *E. coli*/T7. В данном варианте реализации нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулы иммуноглобулина против CoV-S согласно настоящему изобретению (например, показанные в таблице 1), можно вставить в плазмиду на основе pET и экспрессировать в системе *E. coli*/T7. Например, настоящее изобретение включает способы экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его иммуноглобулиновой цепи в клетке-хозяине (например, бактериальной клетке-хозяине, например, *E. coli*, например, BL21 или BL21DE3), включающие экспрессию РНК-полимеразы T7 в клетке, которая также содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноглобулиновую цепь, функционально связанный с промотором T7. Например, в варианте реализации настоящего изобретения бактериальная клетка-хозяин, например, *E. coli*, содержит полинуклеотид, кодирующий ген РНК-полимеразы T7, функционально связанный с промотором *lac*, и экспрессия полимеразы и цепи индуцируется инкубированием клетки-хозяина с IPTG (изопропил-бета-D-тиогалактопиранозидом). См. US4952496 и US5693489 или Studier & Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 1986 May 5;189(1):113-30.

[00076] Существует несколько способов продукции рекомбинантных антител, известных в данной области техники. Один пример способа рекомбинантной продукции антител описан в US4816567.

[00077] Трансформацию можно выполнить любым известным способом введения полинуклеотидов (например, ДНК или РНК, в том числе мРНК) в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают трансфекцию, опосредованную декстраном, осаждение с фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную полибренном, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы, технологию липидных наночастиц, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов, например, лентивируса или аденоассоциированного вируса. Способы трансформации клеток хорошо известны в

данной области техники. См., например, патенты США № 4399216; 4912040; 4740461 и 4959455. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту в форме нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК, в том числе мРНК), так что собственные клетки субъекта продуцируют антитело. В настоящем изобретении дополнительно предложены модификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела против CoV-S, описанные в настоящем документе, которые приводят к повышенной экспрессии антител, повышенной стабильности антител, повышенной стабильности нуклеиновых кислот (например, мРНК) или повышенному сродству или специфичности антител против белка шипов CoV.

[00078] Таким образом, настоящее изобретение включает рекомбинантные способы получения антигенсвязывающего белка против CoV-S, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, или его иммуноглобулиновой цепи, включающие (i) введение одного или более из полинуклеотидов (например, содержащих нуклеотидную последовательность любой одной или более последовательностей из таблицы 2), кодирующих легкие и/или тяжелые иммуноглобулиновые цепи или CDR антигенсвязывающего белка, например, из таблицы 1, причем полинуклеотид находится в векторе и/или встроен в хромосому клетки-хозяина и/или функционально связан с промотором; (ii) культивирование клетки-хозяина (например, СНО или *Pichia* или *Pichia pastoris*) в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида, и (iii) необязательно выделение антигенсвязывающего белка (например, антитела или фрагмента) или цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой растет клетка-хозяин. Например, полинуклеотид можно встроить в хромосому клетки-хозяина посредством направленной инсерции с помощью вектора, например, аденоассоциированного вируса (AAV), например, после расщепления хромосомы с использованием системы редактирования генов (например, CRISPR (например, CRISPR-Cas9), TALEN, megaTAL, белка с доменом "цинковый палец" или белка Argonaute). Направленные инсерции могут иметь место, например, в локусах клетки-хозяина, например, геномном локусе альбумина или иммуноглобулина. В качестве альтернативы, инсерция может иметь место в случайном локусе, например, с использованием вектора, например, лентивируса. При создании антигенсвязывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента), содержащего более одной иммуноглобулиновой цепи, например, антитела, содержащего две тяжелые иммуноглобулиновые цепи и две легкие иммуноглобулиновые цепи, совместная экспрессия цепей в одной клетке-хозяине приводит к ассоциации цепей, например, в клетке или на поверхности клетки или вне клетки, если такие цепи секретируются, с образованием антигенсвязывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента). Способы включают способы, в которых экспрессируется только тяжелая цепь иммуноглобулина или только легкая цепь иммуноглобулина (например, любая цепь, описанная в настоящем документе, в том числе их зрелые фрагменты и/или вариабельные домены). Такие цепи пригодны, например, в

качестве промежуточных продуктов при экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего такую цепь. Например, настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие иммуноглобулин тяжелой цепи (или его вариабельный домен, или домен, содержащий его CDR), кодируемый полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в таблице 2, и иммуноглобулин легкой цепи (или его вариабельный домен, или домен, содержащий его CDR), кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в таблице 2, которые являются продуктом таких способов получения и, необязательно, набор способов очистки, представленный в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах реализации продукт указанного способа представляет собой антигенсвязывающий белок против CoV-S, представляющий собой антитело или фрагмент, содержащий HCVR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, и LCVR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, причем последовательности HCVR и LCVR выбраны из одного антитела, указанного в таблице 1. В некоторых вариантах реализации продукт указанного способа представляет собой антигенсвязывающий белок против CoV-S, представляющий собой антитело или фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в таблице 1, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в таблице 1, причем указанные шесть последовательностей CDR выбраны из одного антитела, указанного в таблице 1. В некоторых вариантах реализации продукт указанного способа представляет собой антигенсвязывающий белок против CoV-S, представляющий собой антитело или фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность HC, представленную в таблице 1, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность LC, представленную в таблице 1.

[00079] Эукариотические и прокариотические клетки-хозяева, в том числе клетки млекопитающих, можно использовать в качестве хозяев для экспрессии антигенсвязывающего белка против CoV-S. Такие клетки-хозяева хорошо известны в данной области техники, и многие из них можно получить в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Эти клетки-хозяева включают, в числе прочего, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки NS0, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3, клетки HEK-293 и ряд других клеточных линий. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, крупного рогатого скота, лошади и хомяка. Другие линии клеток, которые можно использовать, представляют собой линии клеток насекомых (например, *Spodoptera frugiperda* или *Trichoplusia ni*), клетки земноводных, клетки бактерий, клетки растений и клетки грибов. Клетки грибов включают клетки дрожжевых и мицелиальных грибов, в том числе, например, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia*

lindneri), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pipperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* и *Neurospora crassa*. Настоящее изобретение включает выделенную клетку-хозяина (например, клетку CHO), содержащую антигенсвязывающий белок, например, указанный в таблице 1; или полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[00080] Термин «специфично связывается» относится к антигенсвязывающим белкам (например, мАт), обладающим сродством связывания с антигеном, например, белком CoV-S (например, SARS-CoV-2-S), выражаемым в виде K_D , равной по меньшей мере приблизительно 10^{-8} М, согласно измерению в анализе безметочной биослойной интерферометрии в реальном времени, например, при 25°C или 37°C, например, с помощью биосенсора Octet® HTX, или с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или с помощью твердофазного ИФА, измеряющего сродство в растворе. Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки, специфично связывающиеся с белком CoV-S.

[00081] В настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или антигенсвязывающего белка и т.п. включают любой встречающийся в природе, получаемый с помощью ферментов, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, специфично связывающий антиген с образованием комплекса. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные Fv-молекулы (scFv); (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), например, пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Выражение «антигенсвязывающий фрагмент» в настоящем документе также охватывает другие генетически модифицированные молекулы, например, домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с пересаженными CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариабельные домены акулы IgNAR. В одном из вариантов реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент содержит три или более CDR антитела из таблицы 1 (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3; или CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3).

[00082] В одном из вариантов реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или

аминокислотным составом и, как правило, содержит по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом с или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих V_H -домен, ассоциированный с V_L -доменом, V_H - и V_L -домены могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем взаиморасположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать $V_H - V_H$ -, $V_H - V_L$ - или $V_L - V_L$ -димеры. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H - или V_L -домен.

[00083] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие типичные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут содержаться в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из типичных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) в любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, нековалентно связанные друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H - или V_L -доменами (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

[00084] Антигенсвязывающие белки (например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты) могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичные антигенсвязывающие белки обсуждаются в настоящем документе дополнительно.

[00085] В конкретных вариантах реализации антител или фрагменты антитела согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с такой группой, как лиганд или терапевтическая группа («иммуноконъюгат»), например, противовирусным лекарственным средством, вторым антителом против гриппа или любой другой терапевтической группой, которую можно применять для лечения вирусной инфекции, например, инфекции вируса гриппа. См. ниже.

[00086] Настоящее изобретение также относится к комплексу, содержащему антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обсуждаемый в настоящем документе, в комплексе с полипептидом CoV-S или

его антигенным фрагментом и/или с вторичным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, вторичным антителом, меченым обнаруживаемой меткой), специфично связывающимся с антителом или фрагментом против CoV-S. В варианте реализации настоящего изобретения указанное антитело или фрагмент находится *in vitro* (например, иммобилизованы на твердом субстрате) или в организме субъекта. В варианте реализации настоящего изобретения CoV-S находится *in vitro* (например, иммобилизован на твердом субстрате) или на поверхности вируса, или в организме субъекта. Иммобилизованные антитела против CoV-S и их антигенсвязывающие фрагменты, ковалентно связанные с нерастворимым материалом матрицы (например, стеклом или полисахаридом, например, агарозой или сефарозой, например, их гранулой или другой частицей), также входят в настоящее изобретение; при этом иммобилизованное антитело необязательно образует комплекс с CoV-S или его антигенным фрагментом или вторичным антителом или его фрагментом.

[00087] «Выделенные» антигенсвязывающие белки (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты), полипептиды, полинуклеотиды и векторы по меньшей мере частично не содержат других биологических молекул, присутствующих в клетках или клеточной культуре, из которой они получены. Такие биологические молекулы включают нуклеиновые кислоты, белки, другие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, липиды, углеводы или другой материал, например, продукты распада клеток и ростовую среду. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент может, кроме того, по меньшей мере частично не содержать компонентов системы экспрессии, например, биологических молекул из клетки-хозяина или ростовой среды. Как правило, термин «выделенный» не предназначен для обозначения полного отсутствия таких биологических молекул или отсутствия воды, буферов или солей, или компонентов фармацевтического состава, содержащего антитела или фрагменты.

[00088] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте (например, полипептиду CoV-S), которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом антигенсвязывающего белка, например, варибельной областью молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может содержать более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различное биологическое действие. Термин «эпитоп» также относится к сайту на антигене, на который реагируют В и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, связываемой антителом. Эпитопы можно определять как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подмножество структурных эпитопов и содержат остатки, непосредственно определяющие сродство взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, т.е. состоять из нелинейной последовательности аминокислот. В определенных вариантах реализации эпитопы могут включать детерминанты, представляющие собой химически активные поверхностные группировки молекул, например, аминокислоты, боковые цепи углеводов, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в некоторых вариантах реализации,

могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими зарядовыми характеристиками.

[00089] Способы определения эпитопа антигенсвязывающего белка, например, антитела или фрагмента или полипептида, включают мутационный анализ посредством аланинового сканирования, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, можно применять такие способы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим способом, который можно применять для выявления аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий белок (например, антитело или фрагмент, или полипептид) (например, коверсин), является водородно-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена включает мечение исследуемого белка дейтерием с последующим связыванием антигенсвязывающего белка, например, антитела или фрагмента или полипептида, с белком, меченым дейтерием. Затем комплекс белок CoV-S/антигенсвязывающий белок переносится в воду, и обмениваемые протоны внутри аминокислот, защищенные комплексом антитела, подвергаются обратному обмену дейтерий-водород с более медленной скоростью, чем обмениваемые протоны внутри аминокислот, не входящих в состав области взаимодействия. В результате аминокислоты, входящие в состав области взаимодействия белок/антигенсвязывающий белок, могут сохранять дейтерий и, следовательно, демонстрировать относительно повышенную массу по сравнению с аминокислотами, не входящими в состав области взаимодействия. После диссоциации антигенсвязывающего белка (например, антитела или фрагмента или полипептида) белок-мишень подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий белок. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[00090] В настоящем документе термин «конкурирует» относится к антигенсвязывающему белку (например, антителу или его антигенсвязывающему фрагменту), связывающемуся с антигеном (например, CoV-S) и ингибирующему или блокирующему связывание другого антигенсвязывающего белка (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) с антигеном. Термин также включает конкуренцию между двумя антигенсвязывающими белками, например, антителами в обеих ориентациях, т.е. первым антителом, связывающим и блокирующим связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах реализации первый антигенсвязывающий белок (например, антитело) и второй антигенсвязывающий белок (например, антитело) могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первый и второй антигенсвязывающие белки (например, антитела) могут связываться с разными, но, например, перекрывающимися эпитопами, причем связывание одного из них ингибирует

или блокирует связывание второго антитела, например, посредством стерических помех. Конкуренцию между антигенсвязывающими белками (например, антителами) можно измерить способами, известными в данной области техники, например, путем безметочной биослойной интерферометрии в реальном времени. Картирование эпитопа (например, посредством аланинового сканирования или водородно-дейтериевого обмена (HDX)) можно использовать для определения того, являются ли два или более антитела неконкурирующими (например, на мономере рецептор-связывающего домена (RBD) белка шипов), конкурирующими за один и тот же эпитоп или конкурирующими, но характеризующимися различными микроэпитопами (например, выявленными с помощью HDX). В варианте реализации настоящего изобретения конкуренцию между первым и вторым антигенсвязывающими белками против CoV-S (например, антителами) определяют путем измерения способности иммобилизованного первого антигенсвязывающего белка против CoV-S (например, антитела) (изначально не образующего комплекс с белком CoV-S) связываться с растворимым белком CoV-S в составе комплекса со вторым антигенсвязывающим белком против CoV-S (например, антителом). Снижение способности первого антигенсвязывающего белка против CoV-S (например, антитела) связываться с белком CoV-S в составе комплекса по сравнению с белком CoV-S, не включенным в состав комплекса, указывает на то, что первый и второй антигенсвязывающие белки против CoV-S (например, антитела) конкурируют. Степень конкуренции можно выразить в виде процента ослабления связывания. Такую конкуренцию можно измерить путем безметочной биослойной интерферометрии в реальном времени, например, на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.), посредством твердофазного ИФА (твердофазного иммуноферментного анализа) или ППР (поверхностного плазмонного резонанса).

[00091] Конкуренцию за связывание между антигенсвязывающими белками против CoV-S (например, моноклональными антителами (мАт)) можно определить путем безметочной биослойной интерферометрии в реальном времени на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Например, для определения конкуренции между двумя моноклональными антителами против CoV-S мАт против CoV-S можно сначала захватить на наконечниках биосенсора Octet, покрытых антителом против hFc (Pall ForteBio Corp., № 18-5060), погрузив наконечники в раствор мАт против CoV-S (далее обозначаемого как «мАт1»). В качестве положительного контроля для блокирования наконечники биосенсора с захваченным антителом затем можно насытить известным блокирующим изотипическим контрольным мАт (далее обозначаемым как «блокирующее мАт») путем погружения в раствор блокирующего мАт. Затем для определения наличия или отсутствия конкуренции мАт2 с мАт1 наконечники биосенсора можно погрузить в раствор комплексов полипептида CoV-S и второго мАт против CoV-S (впоследствии обозначаемого «мАт2»), инкубированный в течение некоторого времени, и определить связывание мАт1 с полипептидом CoV-S. Наконечники биосенсора можно промывать буфером между каждым этапом эксперимента. Реакцию связывания в реальном времени можно отслеживать в

течение эксперимента, а ответ на основе связывания можно фиксировать в конце каждого этапа.

[00092] Например, в варианте реализации настоящего изобретения анализ выполняют при 25°C и pH приблизительно 7, например, 7,4, например, в присутствии буфера, соли, поверхностно-активного вещества и неспецифического белка (например, бычьего сывороточного альбумина).

[00093] В типичном случае антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, модифицированные каким-либо образом, сохраняют способность специфично связываться с CoV-S, например, сохраняют по меньшей мере 10% связывающей активности в отношении CoV-S (по сравнению с исходным антителом) при выражении этой активности на молярной основе. Предпочтительно антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению сохраняет по меньшей мере 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% или более сродства связывания в отношении CoV-S по сравнению с исходным антителом. Кроме того, предполагается, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению может содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены (называемые «консервативными вариантами» или «функционально консервативными вариантами» антитела), по сути не влияющие на его биологическую активность.

[00094] «Вариант» полипептида, например, иммуноглобулиновая цепь (например, V_H, V_L, HC или LC мАт8021; V_H, V_L, HC или LC мАт8028, или V_H, V_L, HC или LC мАт8029) относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 70-99,9% (например, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) идентична или аналогична упомянутой аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 2, 10, 18, 20, 22, 30, 38, 40, 42, 50, 58 или 60); при выполнении сравнения с помощью алгоритма BLAST, в котором параметры алгоритма выбирают, получая максимальное совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, ожидаемое пороговое значение: 10; размер слова: 3; максимальное совпадение в диапазоне запроса: 0; матрица BLOSUM 62; штрафы за пропуски: наличие 11, продление 1; условная корректировка матрицы композиционных вкладов).

[00095] «Вариант» полинуклеотида относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 70-99,9% (например, по меньшей мере на 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) идентична упомянутой нуклеотидной последовательности, представленной в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 1, 9, 17, 19, 21, 29, 37, 39, 41, 49, 57 или 59); при выполнении сравнения с помощью алгоритма BLAST, в котором параметры алгоритма выбирают, получая максимальное совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, ожидаемое пороговое значение: 10; размер

слова: 28; максимальное совпадение в диапазоне запроса: 0; оценка соответствия/несоответствия: 1, -2; штрафы за пропуск: линейные).

[00096] Антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения содержат вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 70% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большей) идентичностью аминокислотной последовательности аминокислотным последовательностям HCVR, представленным в таблице 1; и/или вариабельную область иммуноглобулина легкой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 70% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большей) идентичностью аминокислотной последовательности аминокислотным последовательностям LCVR, представленным в таблице 1.

[00097] Кроме того, антигенсвязывающий белок против CoV-S согласно настоящему изобретению может содержать полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в настоящем документе, за исключением одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) мутаций, например, миссенс-мутаций (например, консервативных замен), нонсенс-мутаций, делеций или инсерций. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки, содержащие вариант легкой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность LCVR, представленную в таблице 1, но содержащую одну или более из таких мутаций, и/или вариант тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность HCVR, представленную в таблице 1, но содержащую одну или более из таких мутаций. В варианте реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий белок против CoV-S содержит вариант легкой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, причем одна или более (например, 1, 2 или 3) из таких CDR содержат одну или более из таких мутаций (например, консервативных замен), и/или вариант тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, причем одна или более (например, 1 или 2 или 3) из таких CDR содержат одну или более из таких мутаций (например, консервативных замен). Замены могут находиться в CDR, каркасной области или константной области.

[00098] Кроме того, в настоящем изобретении предложены варианты антигенсвязывающих белков против CoV-S, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие один или более из вариантов CDR (например, любую одну или более из CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR -H1, CDR-H2 и/или CDR-H3), представленных в настоящем документе, обладающий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичностью или сходством последовательности с, например, CDR тяжелой цепи и легкой цепи из таблицы 1.

[00099] Варианты реализации настоящего изобретения также включают антитела и

их антигенсвязывающие фрагменты против CoV-S, содержащие V_H и V_L иммуноглобулина; или HC и LC, содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся 70% или более (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью или сходством общей аминокислотной последовательности по отношению к аминокислотным последовательностям соответствующих V_H , V_L , HC или LC, конкретно представленным в настоящем документе, однако CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 таких иммуноглобулинов не являются вариантами и содержат аминокислотные последовательности CDR, представленные в таблице 1. Таким образом, в таких вариантах реализации CDR в вариантах антигенсвязывающих белков сами по себе не являются вариантами.

[000100] Консервативно модифицированные вариантные антитела против CoV-S и их антигенсвязывающие фрагменты также входят в область настоящего изобретения. Термины «консервативно модифицированный вариант» или «консервативная замена» относятся к варианту, содержащему одну или более замен аминокислот в полипептиде другими аминокислотами, обладающими аналогичными характеристиками (например, зарядом, размером боковой цепи, гидрофобностью/гидрофильностью, конформацией и жесткостью каркаса и т.д.). Такие изменения часто можно выполнить без значительного нарушения биологической активности антитела или фрагмента. Специалисты в данной области техники понимают, что, как правило, замены отдельных аминокислот в несущественных областях полипептида не оказывают существенного влияния на биологическую активность (см., например, Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, замены структурно или функционально аналогичных аминокислот с меньшей вероятностью приводят к существенным нарушениям биологической активности.

[000101] Примеры групп аминокислот, содержащих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серусодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в статье Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256:1443-45.

[000102] Функционально-консервативные варианты антител против CoV-S и их антигенсвязывающих фрагментов также входят в состав настоящего изобретения. Любой из вариантов антител против CoV-S и их антигенсвязывающих фрагментов (обсуждаемых в настоящем документе) может являться «функционально-консервативным вариантом».

Такие функционально-консервативные варианты в некоторых случаях также можно характеризовать как консервативно модифицированные варианты. «Функционально-консервативные варианты» в контексте настоящего описания относятся к вариантам антител против CoV-S или их антигенсвязывающих фрагментов, в которых один или более аминокислотных остатков изменены без существенного влияния на одно или более из функциональных свойств антитела или фрагмента. В варианте реализации настоящего изобретения функционально-консервативный вариант антитела против CoV-S или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит вариантную аминокислотную последовательность и проявляет одно или более из следующих функциональных свойств:

Подавляет рост коронавируса (например, SARS-CoV-2, SARS-CoV и/или MERS-CoV) в клетках, экспрессирующих ACE2 и/или TMPRSS2 (например, в клетках Calu-3);

Не связывается в значительной степени с клетками MDCK/Tet-on, не экспрессирующими ACE2 и/или TMPRSS2;

Ограничивает распространение коронавирусной инфекции (например, SARS-CoV-2, SARS-CoV и/или MERS-CoV) клеток, например, Calu-3, *in vitro*; и/или

Защищает рекомбинантную мышь, экспрессирующую белок TMPRSS2 и/или ACE2 человека, от смерти, вызванной коронавирусной инфекцией (например, SARS-CoV-2, SARS-CoV или MERS-CoV), например, при инфекции мыши летальной в ином случае дозой вируса, необязательно в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

Защищает рекомбинантную мышь, экспрессирующую белок TMPRSS2 и/или ACE2 человека, от потери веса, вызванной коронавирусной инфекцией (например, SARS-CoV-2, SARS-CoV или MERS-CoV), например, при инфекции мыши дозой вируса, в ином случае вызывающей потерю веса, необязательно в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

[000103] «Нейтрализующий» или «антагонистический» антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, относится к молекуле, ингибирующей активность CoV-S в любой обнаружимой степени, например, ингибирующей способность CoV-S связываться с рецептором, например, ACE2, расщепляться протеазой, например, TMPRSS2, или опосредовать проникновение вируса в клетку-хозяин или репродукцию вируса в клетке-хозяине.

[000104] Таблица 1 относится к антигенсвязывающим белкам, например, антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим тяжелую цепь или V_H (или их вариант) и легкую цепь или V_L (или их вариант), предложенные ниже; или содержащим V_H , содержащую их CDR (CDR-H1 (или ее вариант), CDR-H2 (или ее вариант) и CDR-H3 (или ее вариант)) и V_L , содержащую их CDR (CDR-L1 (или ее вариант), CDR-L2 (или ее вариант) и CDR-L3 (или ее вариант)), например, причем цепи, переменные области и/или CDR иммуноглобулина содержат специфические аминокислотные последовательности, описанные ниже.

[000105] Описанные в настоящем документе антитела также включают варианты

реализации, в которых V_H присоединен к IgG4 дикого типа (например, где остаток 108 представляет собой S) или к вариантам IgG4 (например, где остаток 108 представляет собой P).

[000106] Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению содержат иммуноглобулиновые цепи, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в настоящем документе, а также посттрансляционные модификации антитела в клетках и *in vitro*. Например, настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающиеся с CoV-S, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой и/или легкой цепи, представленные в настоящем документе (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3), а также антитела и фрагменты, в которых один или более аминокислотных остатков гликозилированы, один или более остатков Asn дезамидированы, один или более остатков (например, Met, Trp и/или His) окислены, N-концевой Gln представляет собой пироглутамат (пироE) и/или C-концевой лизин отсутствует.

[000107] Аминокислотные и нуклеотидные последовательности типичных антител против белка SARS-CoV-2-Spike (SARS-CoV-2-S) показаны в таблице типовых последовательностей ниже.

Таблица типовых последовательностей

Обозначение антитела	Составная часть	Последовательность	SEQ ID NO
mAt10933	Аминокислоты		
	HCVR	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YYMSWIRQAPGKGLEWVSITYSGSTIYYAD SVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDRGTTMVPFDYWGQGTLLTVSS	202
	HCDR1	GFTFSDYY	204
	HCDR2	ITYSGSTI	206
	HCDR3	ARDRGTTMVPFDY	208
	LCVR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLETGVPSRFS GSGSGTDFITISGLQPEDIATYYCQQYDNLPL LTFGGGGTKVEIK	210
	LCDR1	QDITNY	212
	LCDR2	AAS	55
	LCDR3	QQYDNLPLT	214
	HC	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD	216

		YYMSWIRQAPGKGLEWVSYITYSGSTIYYAD SVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDRGTTMVPFDYWGGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
	LC	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCQASQDITNY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLETGVPSRFS GSGSGTDFFTISGLQPEDIATYYCQQYDNL LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	218
	Нуклеиновые кислоты		
	HCVR	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGC TTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTG ACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTC CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACA TACTTATAGTGGTAGTACCATATACTACGC AGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTC CAGGGACAACGCCAAGAGCTCACTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCG GTACAACCTATGGTCCCCTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	201
	HCDR1	GGATTCACCTTCAGTGACTACTAC	203

	HCDR2	ATTACTTATAGTGGTAGTACCATA	205
	HCDR3	GCGAGAGATCGCGGTACAACCTATGGTCCCC TTTGACTAC	207
	LCVR	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTACC AACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCT GCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCA AGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGAT TTTACTTTTACCATCAGCGGCCTGCAGCCTG AAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGT ATGATAATCTCCCTCTCACTTTCGGCGGAG GGACCAAGGTGGAGATCAAA	209
	LCDR1	CAGGACATTACCAACTAT	211
	LCDR2	GCTGCATCC	54
	LCDR3	CAACAGTATGATAATCTCCCTCTCACT	213
	HC	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGC TTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTG ACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTC CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACA TTACTTATAGTGGTAGTACCATATACTACGC AGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTC CAGGGACAACGCCAAGAGCTCACTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCG GTACAACTATGGTCCCCTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG	215

		ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AATGA	
	LC	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTACC AACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCT GCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCA AGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGAT	217

		TTTACTTTTACCATCAGCGGCCTGCAGCCTG AAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGT ATGATAATCTCCCTCTCACTTTCGGCGGAG GGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGTTAG	
mAt10934	Аминокислоты		
	HCVR	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGITFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTD YAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTTARWDWYFDLWGRGTLVTVSS	220
	HCDR1	GITFSNAW	222
	HCDR2	IKSKTDGGTT	224
	HCDR3	TTARWDWYFDL	226
	LCVR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIWNY INWYQQKPGKAPKLLIYDASNLKTGVPSRFS GSGSGTDFFTISSLPEDIAITYYCQQHDDLPP TFGQGTKVEIK	228
	LCDR1	QDIWNY	230
	LCDR2	DAS	194
	LCDR3	QQHDDLPT	232
	HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGITFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTD YAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTTARWDWYFDLWGRGTLVTVSSAS	234

		TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIWNY INWYQQKPGKAPKLLIYDASNLKTGVPSRFS GSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQHDDLPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	236
	Нуклеиновые кислоты		
	HCVR	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCACTTTCAGT AACGCCTGGATGAGTTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGT ATTAAAAGCAAACTGATGGTGGGACAAC AGACTACGCCGCACCCGTGAAAGGCAGATT CACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACAC GCTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAAC CGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCAC AGCGAGGTGGGACTGGTACTTCGATCTCTG GGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTC A	219
	HCDR1	GGAATCACTTTCAGTAACGCCTGG	221
	HCDR2	ATTAAAAGCAAACTGATGGTGGGACAAC A	223

	HCDR3	ACCACAGCGAGGTGGGACTGGTACTTCGAT CTC	225
	LCVR	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTTGG AATTATATAAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGGAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTACGAT GCATCCAATTTGAAAACAGGGGTCCCATCA AGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGAT TTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG AAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGC ATGATGATCTCCCTCCGACCTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAA	227
	LCDR1	CAGGACATTTGGAATTAT	229
	LCDR2	GATGCATCC	193
	LCDR3	CAACAGCATGATGATCTCCCTCCGACC	231
	HC	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCACTTTCAGT AACGCCTGGATGAGTTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGT ATTAAAAGCAAACTGATGGTGGGACAAC AGACTACGCCGCACCCGTGAAAGGCAGATT CACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACAC GCTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAAC CGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCAC AGCGAGGTGGGACTGGTACTTCGATCTCTG GGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTC AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC	233

		GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC C AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AATGA	
	LC	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTTGG AATTATATAAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGGAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTACGAT GCATCCAATTTGAAAACAGGGGTCCCATCA AGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGAT	235

		TTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG AAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGC ATGATGATCTCCCTCCGACCTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGTTAG	
MA_T10987	Аминокислоты		
	HCVR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSN YAMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRTEDT AVYYCASGSDYGDYLLVYWGQGTLVTVSS	640
	HCDR1	GFTFSNYA	642
	HCDR2	ISYDGSNK	499
	HCDR3	ASGSDYGDYLLVY	644
	LCVR	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYN YVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVS NR F SGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCNSLT SIS TWVFGGGTKLTVL	646
	LCDR1	SSDVGGYNY	648
	LCDR2	DVS	650
	LCDR3	NSLT SISTWV	652
	HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSN YAMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRTEDT AVYYCASGSDYGDYLLVYWGQGTLVTVSSA	654

		STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	
	LC	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYN YVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCNSLTSIS TWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	656
	Нуклеиновые кислоты		
	HCVR	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGC GTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTA ACTATGCTATGTACTGGGTCCGCCAGGCTC CAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATC TCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGGCTCC GACTACGGTGACTACTTATTGGTTTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	639
	HCDR1	GGATTACCTTCAGTAACTATGCT	641
	HCDR2	ATATCATATGATGGAAGTAATAAA	498
	HCDR3	GCGAGTGGCTCCGACTACGGTGACTACTTA TTGGTTTAC	643

	LCVR	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGT CTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCT CCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTG GTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAAC ACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATGATTT ATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTTT CTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAA CACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCA GTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAA CTCTTTGACAAGCATCAGCACTTGGGTGTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	645
	LCDR1	AGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTAT	647
	LCDR2	GATGTCAGT	649
	LCDR3	AACTCTTTGACAAGCATCAGCACTTGGGTG	651
	HC	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGC GTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTA ACTATGCTATGTACTGGGTCCGCCAGGCTC CAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT ATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATC TCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGGCTCC GACTACGGTGACTACTTATTGGTTTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG TGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA	653

		ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AATGA	
	LC	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGT CTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCT CCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTG GTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAAC ACCCAGGCCAAAGCCCCCAAAC TCATGATTT ATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTTT CTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAA CACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCA GTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAA CTCTTTGACAAGCATCAGCACTTGGGTGTTC	655

		GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGC CAGCCCAAGGCCGCCCCCTCCGTGACCCTG TTCCCCCCCCTCCTCCGAGGAGCTGCAGGCC AACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCC GACTTCTACCCCGGCGCCGTGACCGTGGCC TGGAAGGCCGACTCCTCCCCCGTGAAGGCC GGCGTGAGACCACCACCCCTCCAAGCAG TCCAACAACAAGTACGCCGCCTCCTCCTAC CTGTCCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGTCC CACCGGTCCTACTCCTGCCAGGTGACCCAC GAGGGCTCCACCGTGGAGAAGACCGTGGCC CCCACCGAGTGCTCCTGA	
мАт10989	Аминокислоты		
	HCVR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTG YYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGANY AQKFQGRVTLTRDTSITTVYMELSRLRFDDT AVYYCARGSRDWNQNNWFDPWGQGLVT VSS	678
	HCDR1	GYFTGYY	680
	HCDR2	INPNSGGA	682
	HCDR3	ARGSRDWNQNNWFDP	684
	LCVR	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYN YVSWYQQHPGKAPKLMIFDVSNRPSGVSDRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSFTTSS TVVFGGGTKLTVL	686
	LCDR1	SSDVGTNY	688
	LCDR2	DVS	650
	LCDR3	SSFTTSSTVV	690
	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTG YYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGANY AQKFQGRVTLTRDTSITTVYMELSRLRFDDT AVYYCARGSRDWNQNNWFDPWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	692

		GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	LC	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYN YVSWYQQHPGKAPKLMIFDVSNRPSGVSDRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSFTTSS TVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	694
	Нуклеиновые кислоты		
	HCVR	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAG GTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGATACATCTTCACCG GCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAGGGGCTTGAGTGGATGGGATGGA TCAACCCTAACAGTGGTGGCGCAAACCTATG CACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCTGA CCAGGGACACGTCCATCACACAGTCTACA TGGAAGTGAAGCAGGCTGAGATTTGACGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGATCCC GGTATGACTGGAACCAGAACAACTGGTTCG ACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG TCTCCTCA	677
	HCDR1	GGATACATCTTCACCGGCTACTAT	679
	HCDR2	ATCAACCCTAACAGTGGTGGCGCA	681
	HCDR3	GCGAGAGGATCCCGGTATGACTGGAACCAG AACAACTGGTTCGACCCC	683

	LCVR	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGT CTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCT CCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTA CTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAAC ACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATGATTT TTGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTT CTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAA CACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCA GGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAG CTCATTTACAACCAGCAGCACTGTGGTTTTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	685
	LCDR1	AGCAGTGACGTTGGTACTTATAACTAT	687
	LCDR2	GATGTCAGT	649
	LCDR3	AGCTCATTTACAACCAGCAGCACTGTGGTT	689
	HC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAG GTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC TCCTGCAAGGCTTCTGGATACATCTTCACCG GCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAGGGGCTTGAGTGGATGGGATGGA TCAACCCTAACAGTGGTGGCGCAAACATATG CACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCCTGA CCAGGGACACGTCCATCACCACAGTCTACA TGGAAGTGAAGCAGGCTGAGATTTGACGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGATCCC GGTATGACTGGAACCAGAACAACCTGGTTCG ACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAG CGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA	691

		GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACA CATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGGA CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAATGA	
	LC	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGT CTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCT CCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTA CTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAAC ACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTT TTGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTT CTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAA CACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCA GGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAG CTCATTTACAACCAGCAGCACTGTGGTTTTC	693

		GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGC CAGCCCAAGGCCGCCCTCCGTGACCCTG TTCCCCCTCCTCCGAGGAGCTGCAGGCC AACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCC GACTTCTACCCCGGCGCCGTGACCGTGGCC TGGAAGGCCGACTCCTCCCCCGTGAAGGCC GGCGTGGAGACCACCACCCCTCCAAGCAG TCCAACAACAAGTACGCCGCCTCCTCCTAC CTGTCCCTGACCCCGAGCAGTGGAAGTCC CACCGGTCCTACTCCTGCCAGGTGACCCAC GAGGGCTCCACCGTGGAGAAGACCGTGGCC CCCACCGAGTGCTCCTGA	
--	--	--	--

Введение антител

[000108] В настоящем изобретении предложены способы введения антигенсвязывающего белка против CoV-S согласно настоящему изобретению, например, белка, представленного в таблице 1, включающие введение антигенсвязывающего белка в организм субъекта (например, человека). Например, указанный способ включает прокалывание тела субъекта иглой шприца и инъекцию антигенсвязывающего белка в организм субъекта, например, в вену, артерию, опухоль, мышечную ткань или подкожную клетчатку субъекта.

[000109] В настоящем изобретении предложен сосуд (например, пластмассовый или стеклянный флакон, например, с колпачком, или хроматографическая колонка, полая игла или цилиндр шприца), содержащий антигенсвязывающий белок против CoV-S согласно настоящему изобретению, например, представленный в таблице 1.

[000110] Настоящее изобретение также относится к инъекционному устройству, содержащему один или более из антигенсвязывающих белков (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент), специфично связывающихся с CoV-S, например, представленных в таблице 1, или их фармацевтическую композицию. Инъекционное устройство может быть упаковано в набор. Инъекционное устройство представляет собой устройство, которое вводит вещество в организм субъекта парентеральным путем, например, внутримышечно, подкожно или внутривенно. Например, инъекционное устройство может представлять собой шприц (например, предварительно заполненный фармацевтической композицией, например, автоматический инжектор), например, включающий цилиндр или полый отсек для удержания вводимой жидкости (например, содержащей антитело или его фрагмент, или их фармацевтическую композицию), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для инъекции жидкости; и поршень для выталкивания жидкости из цилиндра через отверстие иглы. В варианте реализации настоящего изобретения устройство для инъекций, содержащее антигенсвязывающий

белок, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из комбинации согласно настоящему изобретению, или их фармацевтическую композицию, представляет собой устройство для внутривенной (в/в) инъекции. Такое устройство может содержать антигенсвязывающий белок или его фармацевтическую композицию в канюле или троакаре/игле, которая может быть присоединена к трубке, которая может быть присоединена к пакету или резервуару для удержания жидкости (например, физиологического раствора), вводимой в организм субъекта через канюлю или троакар/иглу. Антитело или его фрагмент, или их фармацевтическую композицию в варианте реализации настоящего изобретения можно вводить в устройство после введения троакара и канюли в вену субъекта и удаления троакара из введенной канюли. Устройство для в/в введения можно, например, вставить в периферическую вену (например, в кисть или руку); верхнюю полую вену или нижнюю полую вену или в правое предсердие сердца (например, центральное в/в устройство); или в подключичную, внутреннюю яремную или бедренную вену и, например, продвигать к сердцу, пока оно не достигнет верхней полых вены или правого предсердия (например, центральная венозная линия). В варианте реализации настоящее изобретения инъекционное устройство представляет собой автоматический инжектор; струйный инжектор или внешний инфузионный насос. В струйном инжекторе используется узкая струя жидкости под высоким давлением, проникающая через эпидермис, вводя антитело или его фрагмент или его фармацевтическую композицию в организм субъекта. Внешние инфузионные насосы представляют собой медицинские устройства, выполняющие доставку антитела или его фрагмента или их фармацевтической композиции в организм субъекта в контролируемых количествах. Внешние инфузионные насосы могут иметь электрический или механический привод. Различные насосы работают по-разному, например, шприцевой насос удерживает жидкость в резервуаре шприца, а подвижный поршень контролирует подачу жидкости, эластомерный насос удерживает жидкость в растягиваемом резервуаре баллона, а давление, создаваемое упругими стенками баллона, управляет доставкой жидкости. В перистальтическом насосе набор роликов зажимает гибкую трубку, проталкивая жидкость вперед. В многоканальном насосе можно подавать жидкости из нескольких резервуаров с разной скоростью.

Получение антител человека

[000111] Способы получения антител человека у трансгенных мышей известны в данной области техники. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения антител человека, специфично связывающихся с CoV-S. Для получения антител к CoV-S можно использовать иммуноген, содержащий любое из следующих соединений. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным CoV-S или живым ослабленным или инактивированным вирусом, или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. В качестве альтернативы, белок CoV-S или его фрагмент можно получить с использованием

стандартных биохимических методик, модифицировать и использовать в качестве иммуногена. В одном варианте реализации настоящего изобретения иммуноген представляет собой рекомбинантно продуцируемый белок CoV-S или его фрагмент. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения иммуноген может представлять собой полипептидную вакцину против CoV-S. В определенных вариантах реализации можно ввести одну или более вторичных инъекций. В определенных вариантах реализации иммуноген может представлять собой рекомбинантный полипептид CoV-S, экспрессируемый в *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, например, клетках яичника китайского хомяка (CHO).

[000112] При использовании технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патент США № 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител, можно сначала выделить химерные антитела с высоким сродством к CoV-S, содержащие переменную область человека и константную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[000113] Как правило, мышь VELOCIMMUNE® подвергают воздействию рассматриваемого антигена, а из мышей, экспрессирующих антитела, извлекают лимфатические клетки (например, В-клетки). Лимфатические клетки можно сливать с клетками линии миеломы для получения immortalized линий гибридомных клеток, и такие линии гибридомных клеток подвергают скринингу и отбору для выявления линий гибридомных клеток, продуцирующих антитела, специфичные по отношению к рассматриваемому антигену. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделить и связать с желательными изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела можно продуцировать в клетке, например, клетке CHO. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующую антиген-специфичное химерное антитело или переменные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделить непосредственно из антиген-специфичных лимфоцитов.

[000114] Изначально выделяют химерные антитела с высоким сродством, содержащие переменную область человека и константную область мыши. Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела исследуют и подвергают отбору по желательным характеристикам, в том числе сродству, селективности, эпитопу и т. д. Константные области мыши заменяют желательной константной областью человека, получая полностью человеческое антитело согласно данному изобретению, например, IgG1

или IgG4 дикого типа или модифицированное IgG1 или IgG4. В то время как выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, характеристики связывания антигена с высоким сродством и специфичности по отношению к мишени находятся в вариабельной области.

Антитела против белка шипов коронавируса, включая Fc-варианты

[000115] В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения предложены антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более из мутаций, например, усиливающих или ослабляющих связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, данное изобретение включает антитела против CoV-S, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-области Fc-домена, причем указанная(ые) мутация(и) увеличивает(ют) сродство Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут привести к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию по положению 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию по положению 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию по положению 250 и/или 428; или модификацию по положению 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте реализации модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте реализации модификация включает модификацию 265A (например, D265A) и/или модификацию 297A (например, N297A).

[000116] Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376B и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F).

[000117] Антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие V_H и/или V_L, представленные в настоящем документе, содержащие любые возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена, рассматриваются в рамках настоящего изобретения.

[000118] Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие белки против CoV-S, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, содержащие V_H , представленную в настоящем документе, и химерную константную область тяжелой цепи (C_H), причем химерная C_H -область содержит сегменты, полученные из C_H -областей более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать химерную C_H -область, полностью или частично содержащую C_{H2} -домен, полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации со всем C_{H3} -доменом или его частью, полученными из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами реализации антитела согласно настоящему изобретению содержат химерную C_H -область, содержащую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность «верхнего шарнира» (аминокислотные остатки в положениях с 216 по 227 согласно нумерации ЕС), полученную из области петли IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с последовательностью "нижнего шарнира" (аминокислотные остатки в положениях 228-236 согласно нумерации ЕС), полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами реализации химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную C_H -область, описанную в настоящем документе, в некоторых вариантах реализации может проявлять модифицированные эффекторные функции F_c без нежелательного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, WO2014/022540).

Иммуноконъюгаты

[000119] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, конъюгированные с другим фрагментом, например, терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгат»), например, анатоксином или противовирусным лекарственным средством для лечения инфекции вируса гриппа. В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против CoV-S или его фрагмент конъюгируют с любым из дополнительных терапевтических агентов, представленных в настоящем документе. В настоящем документе термин «иммуноконъюгат» относится к антигенсвязывающему белку, например, антителу или антигенсвязывающему фрагменту, химически или биологически связанному с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или белком или терапевтическим агентом. Антигенсвязывающий белок можно связать с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, токсином или терапевтическим агентом в любом положении вдоль молекулы при условии, что он способен связывать свою мишень (CoV-S). Примеры иммуноконъюгатов включают

конъюгаты антитело-лекарственное средство и гибридные белки антитело-токсин. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент может представлять собой второе, отличающееся антитело, специфично связывающееся с CoV-S. Тип терапевтического фрагмента, который можно конъюгировать с антигенсвязывающим белком против CoV-S (например, антителом или фрагментом), должен учитывать состояние, подлежащее лечению, и желательный терапевтический эффект, который необходимо достичь. См., например, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", *Monoclonal Antibodies 1984: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

Мультиспецифичные антитела

[000120] Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также способы их применения и способы создания таких антигенсвязывающих белков. Термин антигенсвязывающие белки "против CoV-S", например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, включает мультиспецифичные (например, биспецифичные или бипаратопные) молекулы, содержащие по меньшей мере один первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающийся с CoV-S (например, антигенсвязывающий домен антитела из таблицы 1) и по меньшей мере один второй антигенсвязывающий домен, связывающийся с другим антигеном или эпитопом CoV-S, отличающимся от эпитопа первого антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах реализации как первый антигенсвязывающий домен, так и второй антигенсвязывающий домен выбраны из антигенсвязывающих доменов, представленных в таблице 1. В варианте реализации настоящего изобретения первый и второй эпитопы перекрываются. В другом варианте реализации настоящего изобретения первый и второй эпитопы не перекрываются. Например, в варианте реализации настоящего изобретения мультиспецифичное антитело представляет собой биспецифичное антитело IgG (например, IgG1 или IgG4), содержащее первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающийся с CoV-S, содержащий тяжелую и легкую иммуноглобулиновую цепь антитела из таблицы 1, и второй антигенсвязывающий домен, специфично связывающийся с другим эпитопом CoV-S. В некоторых вариантах реализации биспецифичное антитело IgG (например, IgG1 или IgG4) содержит первый антигенсвязывающий домен, специфично связывающийся с CoV-S, и второй связывающийся домен, связывающийся с белком клетки-хозяина, например, ACE2 или TMPRSS2.

[000121] Антитела из таблицы 1 включают мультиспецифичные молекулы, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR-H и CDR-L, V_H и V_L или HC и LC этих антител, соответственно (включая их варианты, представленные в настоящем документе).

[000122] В варианте реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен, специфично связывающийся с CoV-S, который можно включить в мультиспецифичную молекулу, содержит:

(1)

последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в таблице 1, и

(ii) последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в таблице 1;

или

(2)

(i) последовательность переменного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, и

(ii) последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1;

или

(3)

(i) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, и

(ii) последовательность легкой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1.

[000123] В варианте реализации настоящего изобретения мультиспецифичное антитело или фрагмент содержит более двух различных специфичностей связывания (например, представляет собой триспецифичную молекулу), например, один или более дополнительных антигенсвязывающих доменов, которые являются такими же, как первый и/или второй антигенсвязывающие домены, или отличаются от них.

[000124] В одном варианте реализации настоящего изобретения биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент содержит первый scFv (например, содержащий последовательности V_H и V_L из таблицы 1), обладающий специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу (например, CoV-S), и второй scFv, обладающий специфичностью связывания по отношению к второму, отличающемуся эпитопу. Например, в варианте реализации настоящего изобретения первый и второй scFv связаны с линкером, например, пептидным линкером (например, GS-линкером, например, $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 834), где n составляет, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). Другие биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты включают $F(ab)_2$ биспецифичного

антитела IgG, содержащего CDR тяжелой и легкой цепей из таблицы 1, и другого антитела, связывающегося с другим эпитопом.

Способы лечения

[000125] В настоящем изобретении предложены способы лечения или профилактики вирусной инфекции (например, коронавирусной инфекции) путем введения терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка против CoV-S, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, из таблицы 1) субъекту (например, человеку), нуждающемуся в таком лечении или профилактике.

[000126] Коронавирусную инфекцию можно лечить или предупреждать у субъекта путем введения субъекту антигенсвязывающего белка против CoV-S согласно настоящему изобретению.

[000127] Эффективная или терапевтически эффективная доза антигенсвязывающего белка против CoV-S, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, из таблицы 1) для лечения или профилактики вирусной инфекции относится к количеству антитела или фрагмента, достаточному для облегчения одного или более признаков и/или симптомов инфекции у субъекта, подвергающегося лечению, как путем индукции регресса или устранения таких признаков и/или симптомов, так путем подавления прогрессирования таких признаков и/или симптомов. Размер дозы зависит от возраста и размера субъекта, которому будут вводить белок, заболевания, подвергаемого лечению, патологических состояний, пути введения и т.п. В варианте реализации настоящего изобретения эффективная или терапевтически эффективная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению для лечения или профилактики вирусной инфекции, например, у взрослого субъекта-человека составляет от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг, например, до приблизительно 150 мг/кг. В варианте реализации настоящего изобретения дозировка составляет до приблизительно 10,8 или 11 граммов (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 граммов). В зависимости от тяжести инфекции, частоту и продолжительность лечения можно корректировать. В определенных вариантах реализации антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению можно вводить в начальной дозе с последующей одной или более вторичными дозами. В определенных вариантах реализации за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть приблизительно таким же или меньшим, чем количество начальной дозы, причем временной промежуток между последующими дозами составляет по меньшей мере 1-3 дня; по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель; или по меньшей мере 14 недель.

[000128] В настоящем документе термин «субъект» относится к млекопитающему (например, крысе, мыши, кошке, собаке, корове, овце, лошади, козе, кролику),

предпочтительно человеку, например, нуждающемуся в профилактике и/или лечении такой вирусной инфекции или рака. У субъекта может быть вирусная инфекция, например, инфекция гриппа, или он может являться предрасположенным к развитию инфекции. Субъекты, предрасположенные к развитию инфекции, или субъекты, которые могут характеризоваться повышенным риском заражения инфекцией (например, коронавируса или вируса гриппа), включают субъектов с ослабленной иммунной системой из-за аутоиммунного заболевания, субъектов, получающих иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органов), субъектов, страдающих синдромом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), субъектов с формами анемии, приводящими к истощению или разрушению лейкоцитов, субъектов, получающих лучевую терапию или химиотерапию, или субъектов, страдающих воспалительным заболеванием. Кроме того, повышенному риску подвержены люди очень молодого (например, 5 лет и младше) или пожилого возраста (например, 65 лет и старше). Более того, субъект может подвергаться риску заражения вирусной инфекцией из-за близости к очагу заболевания, например, субъект проживает в густонаселенном городе или в непосредственной близости от субъектов с подтвержденной инфекцией вируса или подозрением на нее, или из-за выбора работы, например, работник больницы, исследователь в области фармацевтики, путешественник в очаг инфекции или человек, совершающий частые перелеты.

[000129] «Лечить» или «лечение» означает введение антигенсвязывающего белка против CoV-S, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1) субъекту, характеризующемуся наличием одного или более признаков или симптомов заболевания или инфекции, например, вирусной инфекции, для которых антигенсвязывающий белок эффективен при введении субъекту в эффективном или терапевтически эффективном количестве или дозе (как обсуждается в настоящем документе).

[000130] Настоящее изобретение также включает профилактическое введение антигенсвязывающего белка против CoV-S, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1), субъекту, подверженному риску вирусной инфекции, с целью профилактики такой инфекции. Пассивная иммунопрофилактика на основе антител доказала свою эффективность в предотвращении вирусной инфекции у субъекта. См., например, Berry *et al.*, Passive broad-spectrum influenza immunoprophylaxis. *Influenza Res Treat.* 2014; 2014:267594. Epub 2014 Sep 22; и Jianqiang *et al.*, Passive immune neutralization strategies for prevention and control of influenza A infections, *Immunotherapy.* 2012 February; 4(2): 175-186; Prabhu *et al.*, *Antivir Ther.* 2009;14(7):911-21, Prophylactic and therapeutic efficacy of a chimeric monoclonal antibody specific for H5 hemagglutinin against lethal H5N1 influenza. «Предотвращать» или «профилактика» означает введение субъекту антигенсвязывающего белка против CoV-S, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1) с целью подавления проявления

заболевания или инфекции (например, вирусной инфекции) в организме субъекта, для которого антигенсвязывающий белок эффективен при введении субъекту в эффективном или терапевтически эффективном количестве или дозе (как обсуждается в настоящем документе).

[000131] В варианте реализации настоящего изобретения признаком или симптомом вирусной инфекции у субъекта является выживание или распространение вируса в организме субъекта, например, согласно анализу вирусного титра (например, распространение коронавируса в яйцах курицы с эмбрионами или анализу белка шипов коронавируса). В настоящем документе обсуждаются другие признаки и симптомы вирусной инфекции.

[000132] Как отмечалось выше, в некоторых вариантах реализации субъект может представлять собой животное, не являющееся человеком, и антигенсвязывающие белки (например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты), обсуждаемые в настоящем документе, можно использовать в ветеринарном контексте для лечения и/или профилактики заболевания животных, не являющихся человеком (например, кошек, собак, свиней, коров, лошадей, коз, кроликов, овец и т.п.).

[000133] В настоящем изобретении предложен способ лечения или профилактики вирусной инфекции (например, коронавирусной инфекции) или индукции регресса, устранения или подавления прогрессирования по меньшей мере одного признака или симптома вирусной инфекции, например:

- лихорадки или ощущения лихорадки/озноба;
- кашля;
- боли в горле;
- насморка или заложенности носа;
- чихания;
- боли в мышцах или теле;
- головной боли;
- утомляемости;
- рвоты;
- диареи;
- инфекции дыхательных путей;
- дискомфорта в груди;
- одышки;
- бронхита; и/или
- пневмонии,

причем указанный признак или симптом является вторичным по отношению к вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом (например, человека), путем введения субъекту терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка против CoV-S (например, из таблицы 1), например, путем инъекции белка в организм субъекта.

Комбинации и фармацевтические композиции

[000134] Для получения фармацевтических композиций антигенсвязывающих белков против CoV-S, например, антител и их антигенсвязывающих фрагментов (например, из таблицы 1), антигенсвязывающий белок смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984); Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. В варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция является стерильной. Такие композиции входят в состав настоящего изобретения.

[000135] Настоящее изобретение включает обезвоженные, например, лиофилизированные композиции, содержащие антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, из таблицы 1), или их фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель, но практически не содержащую воды.

[000136] В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения дополнительный терапевтический агент, который вводят субъекту в сочетании с антигенсвязывающим белком против CoV-S, например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, из таблицы 1), описываемый в настоящем документе, вводят субъекту в соответствии с Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (Nov. 1, 2002)).

[000137] Способ введения может быть разным. Пути введения включают пероральный, ректальный, трансмукозальный, кишечный, парентеральный; внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интратекальный, прямой внутрижелудочковый, внутривенный, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, ингаляционный, инсуффляционный, местный, кожный, трансдермальный или внутриартериальный.

[000138] В настоящем изобретении предложены способы введения антигенсвязывающего белка против CoV-S, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, из таблицы 1), включающие введение белка в организм субъекта. Например, указанный способ включает прокалывание тела субъекта иглой шприца и инъекцию антигенсвязывающего белка в организм субъекта, например, в вену, артерию, опухоль, мышечную ткань или подкожную клетчатку субъекта.

[000139] В настоящем изобретении предложен сосуд (например, пластмассовый или стеклянный флакон, например, с колпачком, или хроматографическая колонка, полая игла

или цилиндр шприца), содержащий любой из антигенсвязывающих белков против CoV-S, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, из таблицы 1), полипептиды (например, HC, LC, V_H или V_L из таблицы 1) или полинуклеотиды (например, из таблицы 2) или векторы, представленные в настоящем документе, или их фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

[000140] В варианте реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1) вводят в сочетании с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Дополнительный терапевтический агент включает: противовоспалительный агент, противомаларийный агент, второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающие TMPRSS2, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающиеся с CoV-S, но не ограничивается ими. В некоторых вариантах реализации противомаларийный агент представляет собой хлорохин или гидроксихлорохин. В некоторых вариантах реализации противовоспалительный агент представляет собой антитело, например, сарилумаб, тоцилизумаб или гимсилумаб. В некоторых вариантах реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, например, из таблицы 1. В некоторых вариантах реализации одно, два, три, четыре или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов из таблицы 1 можно вводить в комбинации (например, одновременно или последовательно). Конкретные комбинации антител из таблицы 1 перечислены в таблице типовых комбинаций антител ниже (причем каждое число представляет собой конкретную комбинацию, например, mAt10989 и mAt10987 представляют собой комбинацию 1, mAt10989 и mAt10934 представляют собой комбинацию 2 и т.д.). В некоторых вариантах реализации комбинацию антител можно выбрать из антител, связывающихся с различными кластерами эпитопов. Например, определенные антитела, описанные в настоящем документе, принадлежат к следующим кластерам эпитопов: кластер 1 - mAt10987, mAt10922, mAt10936 и mAt10934; кластер 2 - mAt10989, mAt10977 и mAt10933; кластер 3 - mAt10920; кластер 4 - mAt10954, mAt10986 и mAt10964; и кластер 5 - mAt10984. Таким образом, комбинацию двух антител можно выбрать, например, из кластера 1 и кластера 2, кластера 1 и кластера 3, кластера 1 и кластера 4, кластера 1 и кластера 5, кластера 2 и кластера 3, кластера 2 и кластера 4, кластера 2 и кластера 5, кластера 3 и кластера 4, кластера 3 и кластера 5, а также кластера 4 и кластера 5. В некоторых вариантах реализации антитело, специфично связывающее TMPRSS2, представляет собой H1H7017N, описанное в международной публикации патента № WO/2019/147831.

Таблица типовых комбинаций антител

	мАт 10989	мАт 10987	мАт 10934	мАт 10933	мАт 10920	мАт 10922	мАт 10936	мАт 10954	мАт 10964	мАт 10977	мАт 10984	мАт 10986
мАт 10989	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
мАт 10987	12	X	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
мАт 10934	23	24	X	25	26	27	28	29	30	31	32	33
мАт 10933	34	35	36	X	37	38	39	40	41	42	43	44
мАт 10920	45	46	47	48	X	49	50	51	52	53	54	55
мАт 10922	56	57	58	59	60	X	61	62	63	64	65	66
мАт 10936	67	68	69	70	71	72	X	73	74	75	76	77
мАт 10954	78	79	80	81	82	83	84	X	85	86	87	88
мАт 10964	89	90	91	92	93	94	95	96	X	97	98	99
мАт 10977	100	101	102	103	104	105	106	107	108	X	109	110
мАт 10984	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	X	121
мАт 10986	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	X

[000141] В некоторых вариантах реализации можно объединять антигенсвязывающие белки против CoV-S (например, антитела против SARS-CoV-2-S или их антигенсвязывающие фрагменты) от разных доноров-людей. Настоящее изобретение включает композицию, содержащую два (или более) антитела против SARS-CoV-2-S или антигенсвязывающих фрагмента, содержащих переменные домены от субъектов-людей, причем указанные два (или более) антитела или антигенсвязывающих фрагмента получены от разных субъектов (например, двух разных субъектов-людей). Переменные области антител, полученные из В-клеток человека, обсуждаются, например, в примерах 1 и 2 (таблица 3), где описано, что переменные домены, клонированные из таких В-клеток, объединяли с константной областью, полученной не из этих В-клеток, получая гибридные антитела. Источник (донор) таких переменных областей антител показан ниже в таблице типовых переменных областей антител человеческого происхождения. В некоторых вариантах реализации композиция может содержать комбинацию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с переменными доменами, полученными от донора 1, и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с переменными доменами, полученными от донора 2. В некоторых вариантах реализации композиция может содержать комбинацию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с переменными доменами, полученными от донора 1, и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с переменными доменами, полученными от донора 3. В некоторых вариантах реализации композиция может содержать комбинацию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с переменными доменами, полученными от донора 2, и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с переменными доменами, полученными от донора 3. В некоторых вариантах реализации композиция может содержать комбинацию мАт10987 (например, антитела, содержащего последовательности CDR, переменных областей или тяжелой и легкой цепей, показанные в таблице 1) от донора 1 и мАт10989 (например, антитела, последовательности CDR, переменных областей или тяжелой и легкой цепей, показанные в таблице 1) от донора 3.

Таблица типовых переменных областей антител человеческого происхождения

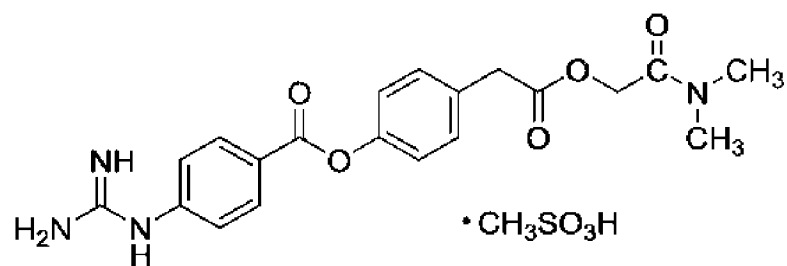
мАт Донор

<u>мАт</u>	<u>Донор</u>
мАт10954	Донор 3
мАт10955	Донор 3
мАт10956	Донор 3
мАт10957	Донор 3
мАт10964	Донор 1
мАт10965	Донор 2
мАт10966	Донор 3
мАт10967	Донор 3
мАт10970	Донор 1
мАт10971	Донор 1
мАт10977	Донор 1
мАт10984	Донор 1
мАт10985	Донор 1
мАт10986	Донор 1
мАт10987	Донор 1
мАт10988	Донор 3
мАт10989	Донор 3
мАт10969	Донор 1

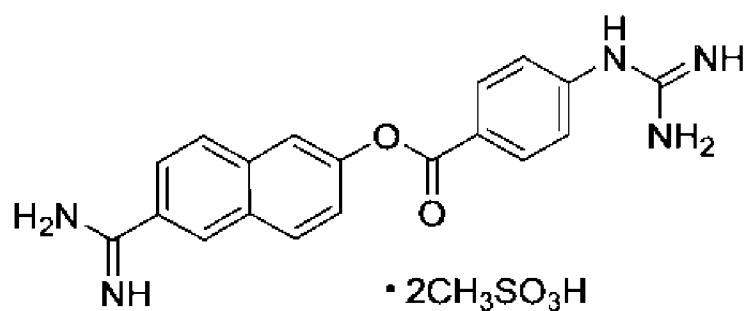
[000142] В некоторых вариантах реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой противовирусное лекарственное средство и/или вакцину. В настоящем документе термин «противовирусное лекарственное средство» относится к любому лекарственному или терапевтическому средству, используемому для лечения, профилактики или ослабления вирусной инфекции у субъекта. Термин «противовирусное лекарственное средство» включает катионное стероидное противомикробное средство, лейпептин, апротинин, рибавирин или интерферон-альфа2b, но не ограничивается ими. Способы лечения или профилактики вирусной (например, коронавирусной) инфекции у субъекта, нуждающегося в указанном лечении или профилактике, путем введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента из таблицы 1 в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом входят в состав настоящего изобретения.

[000143] Например, в варианте реализации настоящего изобретения дополнительным терапевтическим агентом является вакцина, например, вакцина против коронавируса. В варианте реализации настоящего изобретения вакцина представляет собой вакцину на основе инактивированного/убитого вируса, вакцину на основе живого аттенуированного вируса или субъединичную вакцину против вируса.

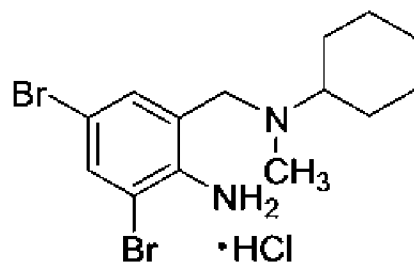
[000144] Например, в варианте реализации настоящего изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой:



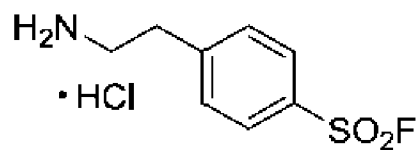
(мезилат камостата);



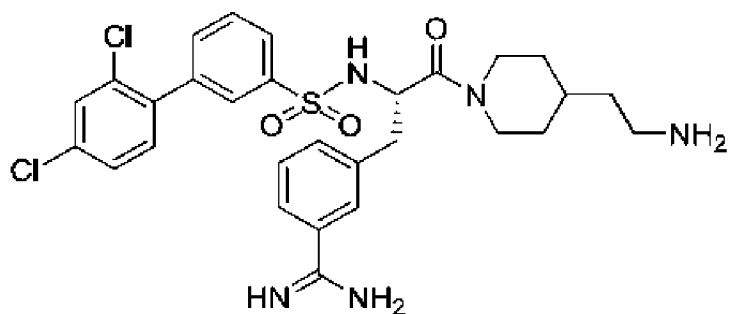
(мезилат нафамостата);



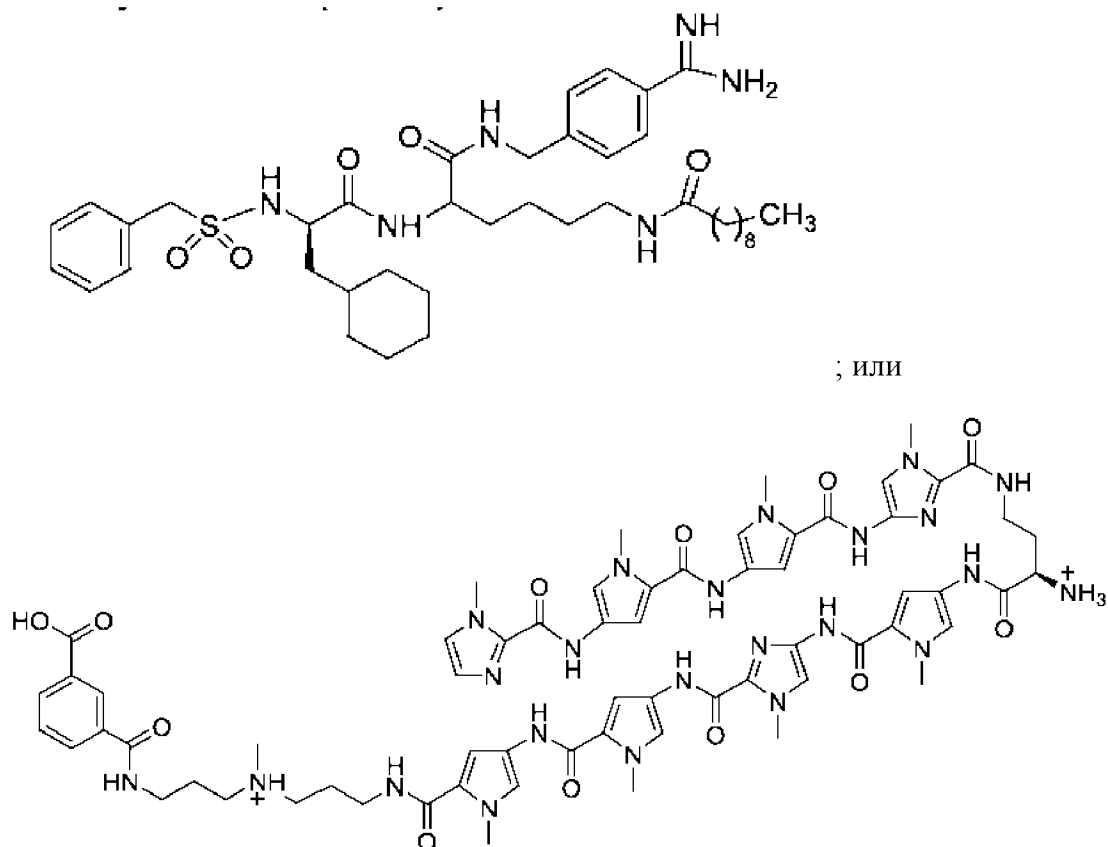
(гидрохлорид бромгексина (БНН));



(гидрохлорид 4-(2-аминометил)бензолсульфонилфторида (АЕБСF));



;



(полиамид). См. Shen *et al.* Biochimie 142: 1-10 (2017).

[000145] В варианте реализации настоящего изобретения противовирусный препарат представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающийся с коронавирусом, например, SARS-CoV-2, SARS-CoV или MERS-CoV. Примеры антител против CoV-S включают: H4sH15188P; H1H15188P; H1H15211P; H1H15177P; H4sH15211P; H1H15260P2; H1H15259P2; H1H15203P; H4sH15260P2; H4sH15231P2; H1H15237P2; H1H15208P; H1H15228P2; H1H15233P2; H1H15264P2; H1H15231P2; H1H15253P2; H1H15215P; и H1H15249P2, представленные в публикации международной патентной заявки № WO/2015/179535, или их антигенсвязывающий фрагмент, например, причем указанное антитело или фрагмент содержит легкую цепь иммуноглобулина, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 (например, V_L или ее легкую цепь); и тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 (например, V_H или ее тяжелую цепь) любого из вышеуказанных антител против CoV-S, но не ограничиваются ими.

[000146] В определенном варианте реализации настоящего изобретения дополнительным терапевтическим агентом не является аprotинин, лейпептин, катионное стероидное противомикробное средство, вакцина против гриппа (например, на основе убитого, живого, аттенуированного цельного вируса или субъединичная вакцина) или антитело против вируса гриппа (например, антитело против гемагглютинина).

[000147] Термин «в сочетании с» указывает на то, что компоненты, антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, вместе с другим

агентом, например, хлорохином, можно составить в виде единой композиции, например, для одновременной доставки или составлены по отдельности в виде двух или более композиций (например, набора). Каждый компонент можно вводить субъекту во время, не совпадающее с временем введения другого компонента; например, каждое введение можно выполнять не одновременно (например, отдельно или последовательно) с интервалами в течение заданного периода времени. Более того, отдельные компоненты можно вводить субъекту тем же самым или другим путем (например, антитело против CoV-S или его антигенсвязывающий фрагмент).

Наборы

[000148] Кроме того, в настоящем изобретении предложены наборы, содержащие один или более компонентов, которые включают антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обсуждаемые в настоящем документе (например, из таблицы 1), но не ограничиваются ими, в ассоциации с одним или более дополнительными компонентами, включая дополнительный терапевтический агент, обсуждаемый в настоящем документе, но не ограничиваясь им. Антигенсвязывающий белок и/или дополнительный терапевтический агент можно составить в виде единой композиции или по отдельности в виде двух или более композиций, например, с фармацевтически приемлемым носителем в фармацевтической композиции.

[000149] В одном варианте реализации настоящего изобретения набор содержит антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1), или его фармацевтическую композицию в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластмассовом флаконе) и дополнительный терапевтический агент в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластмассовом флаконе).

[000150] В еще одном варианте реализации набор содержит комбинацию согласно настоящему изобретению, содержащую антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1), или его фармацевтическую композицию в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, составленными совместно, необязательно в фармацевтической композиции, в едином общем контейнере.

[000151] Если набор содержит фармацевтическую композицию для парентерального введения субъекту, набор может содержать устройство (например, инъекционное устройство) для выполнения такого введения. Например, набор может включать одну или более игл для подкожных инъекций или другие устройства для инъекций, обсуждавшиеся выше, содержащие антигенсвязывающий белок против CoV-S, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1).

[000152] Набор может содержать листок-вкладыш, содержащий информацию о фармацевтических композициях и лекарственных формах, присутствующих в наборе. Как

правило, такая информация помогает пациентам и врачам эффективно и безопасно использовать прилагаемые фармацевтические композиции и лекарственные формы. Например, во вкладыше может быть представлена следующая информация относительно комбинации согласно настоящему изобретению: фармакокинетика, фармакодинамика, клинические исследования, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, меры предосторожности, нежелательные реакции, передозировка, надлежащая дозировка и введение, вид поставки, надлежащие условия хранения, ссылки, информация о производителе/распространителе и патентная информация.

Диагностическое применение антител

[000153] Антигенсвязывающие белки против CoV-S, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1) можно применять для обнаружения и/или измерения CoV-S в образце. Типичные анализы CoV-S могут включать, например, приведение образца в контакт с антигенсвязывающим белком против CoV-S согласно настоящему изобретению, причем антигенсвязывающий белок против CoV-S мечен обнаружимой меткой или репортерной молекулой или используется в качестве лиганда захвата для селективного выделения CoV-S из образцов. Присутствие антигенсвязывающего белка против CoV-S в комплексе с CoV-S указывает на присутствие CoV-S в образце. В качестве альтернативы, в диагностических целях можно применять немеченое антитело в комбинации со вторичным антителом, которое само мечено обнаружимой меткой. Обнаружимая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентную или хемилюминесцентную группу, например, изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, например, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, пероксидазу хрена или люциферазу. Конкретные типичные анализы, которые можно применять для обнаружения или измерения CoV-S в образце, включают анализы нейтрализации, твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА), радиоиммуноанализ (РИА) и сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS). Таким образом, настоящее изобретение включает способ обнаружения присутствия полипептида белка шипов в образце, включающий приведение образца в контакт с антигенсвязывающим белком против CoV-S и обнаружение присутствия комплекса CoV-S/антигенсвязывающего белка против CoV-S, причем присутствие комплекса указывает на присутствие CoV-S.

[000154] Антигенсвязывающий белок против CoV-S согласно настоящему изобретению (например, из таблицы 1) можно применять в процедуре вестерн-блоттинга или иммуноблоттинга для обнаружения присутствия CoV-S или его фрагмента в образце. Такая процедура входит в состав настоящего изобретения и включает этапы, например:

(1) получение мембраны или другой твердой подложки, содержащей образец для анализа на предмет присутствия CoV-S, например, необязательно включая этап переноса белков из образца, подлежащего анализу на предмет присутствия CoV-S (например, после

электрофоретического разделения белков в образце в ПААГ или ДСН-ПААГ) на мембрану или другую твердую подложку с использованием способа, известного в данной области техники (например, полусухого блоттинга или блоттинга в резервуаре); и приведение мембраны или другой твердой подложки, подлежащей анализу на предмет присутствия CoV-S или его фрагмента, в контакт с антигенсвязывающим белком против CoV-S согласно настоящему изобретению.

[000155] Такая мембрана может иметь форму, например, мембраны на основе нитроцеллюлозы или винилового полимера (например, поливинилиденфторида (ПВДФ)), на которую перенесены белки, подлежащие анализу на предмет присутствия CoV-S, в неденатурирующем ПААГ (полиакриламидном геле) или ДСН-ПААГ (полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) (например, после электрофоретического разделения в геле). Перед приведением мембраны в контакт с антигенсвязывающим белком против CoV-S мембрану необязательно блокируют, например, обезжиренным сухим молоком и т.п. с целью связывания сайтов неспецифического связывания белка на мембране.

(2) одно- или многократную промывку мембраны с целью удаления несвязанного антигенсвязывающего белка против CoV-S и других несвязанных веществ; и

(3) обнаружение связанного антигенсвязывающего белка против CoV-S.

[000156] Обнаружение связанного антигенсвязывающего белка указывает на присутствие белка CoV-S на мембране или подложке и в образце. Обнаружение связанного антигенсвязывающего белка можно выполнять путем связывания антигенсвязывающего белка с вторичным антителом (антителом против иммуноглобулина), меченым обнаружимой меткой, с последующим обнаружением присутствия метки вторичного антитела.

[000157] Описанные в настоящем документе антигенсвязывающие белки против CoV-S (например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты (например, из таблицы 1)) также можно применять для иммуногистохимического анализа. Такой способ входит в состав настоящего изобретения и включает, например,

(1) приведение ткани, подлежащей анализу на предмет присутствия белка CoV-S, в контакт с антигенсвязывающим белком против CoV-S согласно настоящему изобретению; и

(2) обнаружение антигенсвязывающего белка на ткани или в ней.

[000158] Если сам антигенсвязывающий белок мечен обнаружимой меткой, его можно обнаружить напрямую. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий белок можно связать со вторичным антителом, меченым обнаружимой меткой, причем затем выполняют обнаружение метки.

ПРИМЕРЫ

[000159] Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в данной области техники полного описания получения и применения способов и композиций согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения сущности того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением. Авторы

предприняли усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25 °C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1: Получение антител человека против белка шипов SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2-S)

[000160] Антитела к белку шипов SARS-CoV-2-Spike (SARS-COV-2-S) получали в организме мышей VELOCIMMUNE®, содержащем ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека или вариабельные области тяжелой и легкой лямбда-цепи иммуноглобулина человека. Каждую мышь иммунизировали вектором, экспрессирующим рецепторсвязывающий домен (RBD) SARS-CoV-2-S (аминокислоты 1-1273, номер доступа в NCBI (MN908947.3), SEQ ID NO: 832), с последующей вторичной стимуляцией с использованием вектора SARS-CoV-2-S или белка SARS-CoV-2-S. Иммунный ответ на основе антител отслеживали с помощью иммуноанализа, специфичного в отношении SARS-CoV-2-S. После достижения желательного иммунного ответа собирали спленоциты и сливали их с клетками миеломы мыши с целью сохранения их жизнеспособности и образования клеток гибридомных линий. Клетки гибридомных линий подвергали скринингу и отбору для выявления линий клеток, продуцирующих антитела, специфичные по отношению к SARS-CoV-2-S. Антитела против SARS-CoV-2-S также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток мыши без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, явным образом включенном в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Используя этот способ, получили полностью человеческие антитела против SARS-CoV-2-S (т.е. антитела, содержащие вариабельные домены человека и константные домены человека).

[000161] Вариабельные области антител также выделяли из образцов крови человека. Цельную кровь получали от пациентов через 3-4 недели после лабораторно подтвержденного положительного результата ПЦР на SARS-CoV-2 и симптоматического заболевания COVID-19. Эритроциты лизировали с использованием лизисного буфера на основе хлорида аммония (Life Technologies), а В-клетки обогащали путем отрицательной селекции. Одиночные В-клетки, связывавшие белок шипов SARS-CoV-2, выделяли с помощью сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS). Выделенные В-клетки высевали на однолуночные планшеты и смешивали с праймерами ПЦР, специфичными по отношению к вариабельным областям легкой и тяжелой цепей антитела. кДНК для каждой отдельной В-клетки синтезировали с использованием реакции обратной транскриптазы (ОТ). Затем каждый полученный продукт ОТ разделяли и переносили в две соответствующие лунки для последующего ПЦР-анализа тяжелой и легкой цепей антител. Один набор полученных продуктов ОТ вначале амплифицировали посредством ПЦР с

использованием вырожденного 5'-праймера, специфичного по отношению к лидерной последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела или вырожденного 5'-праймера, специфичного по отношению к лидерной последовательности вариабельной области легкой цепи антитела, и 3'-праймера, специфичного по отношению к константной области антитела, с образованием ампликона. Затем ампликоны повторно амплифицировали посредством ПЦР с использованием вырожденного 5'-праймера, специфичного по отношению к каркасной области 1 вариабельной области тяжелой цепи антитела, или вырожденного 5'-праймера, специфичного по отношению к каркасной области 1 вариабельной области легкой цепи антитела, и 3'-праймера, специфичного по отношению к константной области антитела, с образованием ампликонов для клонирования. Продукты ПЦР на основе тяжелой цепи и легкой цепи антитела клонировали в экспрессирующие векторы, содержащие константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, соответственно, тем самым получая векторы для экспрессии гибридных антител. Векторы, экспрессирующие пары полноразмерных тяжелой и легкой цепей, трансфицировали в клетки СНО для получения белков антител для анализа.

[000162] Биологические свойства типовых антител, полученных в соответствии со способами, описанным в данном примере, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2: Аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей

[000163] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR, а также последовательности тяжелой и легкой цепей типовых антител против SARS-CoV-2-S. Соответствующие идентификаторы нуклеотидных последовательностей представлены в таблице 2.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO									
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC	LC
мАт10913	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
мАт10915	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
мАт10916	2	4	6	8	10	12	14	16	42	20
мАт10917	44	46	26	49	51	53	55	57	59	61
мАт10918	22	24	26	28	30	32	34	36	63	40
мАт10920	65	67	69	71	73	75	55	77	79	81
мАт10921	83	85	26	87	89	91	55	93	95	97

mAtI0922	99	101	103	105	107	109	111	113	115	117
mAtI0923	119	121	123	125	127	129	55	131	133	135
mAtI0924	137	139	141	143	145	147	149	151	153	155
mAtI0925	65	67	69	71	73	75	55	77	157	81
mAtI0926	83	85	26	87	89	91	55	93	159	97
mAtI0927	99	101	103	105	107	109	111	113	161	117
mAtI0928	119	121	123	125	127	129	55	131	163	135
mAtI0929	137	139	141	143	145	147	149	151	165	155
mAtI0930	167	169	171	173	175	129	55	177	179	181
mAtI0931	167	169	171	173	175	129	55	177	183	181
mAtI0932	185	187	26	189	191	75	194	196	198	200
mAtI0933	202	204	206	208	210	212	55	214	216	218
mAtI0934	220	222	224	226	228	230	194	232	234	236
mAtI0935	238	24	26	240	242	244	194	246	248	250
mAtI0936	252	254	256	258	260	129	55	262	264	266
mAtI0937	268	270	272	274	276	129	55	278	280	282
mAtI0940	284	169	286	288	290	292	294	296	298	300
mAtI0938	302	24	26	304	306	308	194	310	312	314
mAtI0939	316	187	319	321	323	325	55	327	329	331
mAtI0941	333	85	26	336	338	340	294	296	342	344
mAtI0942	185	187	26	189	191	75	194	196	346	200
mAtI0943	202	204	206	208	210	212	55	214	348	218
mAtI0944	220	222	224	226	228	230	194	232	350	236
mAtI0945	238	24	26	240	242	244	194	246	352	250
mAtI0946	252	254	256	258	260	129	55	262	354	266
mAtI0947	268	270	272	274	276	129	55	278	356	282
mAtI0948	302	24	26	304	306	308	194	310	358	314
mAtI0949	316	187	319	321	323	325	55	327	360	331
mAtI0951	333	85	26	336	338	340	294	296	362	344
mAtI0950	284	169	286	288	290	292	294	296	364	300
mAtI0954	366	85	26	370	372	244	194	375	377	379
mAtI0955	381	383	26	385	387	389	194	310	392	394
mAtI0956	396	187	26	399	401	389	194	403	405	407
mAtI0957	409	411	26	414	416	53	55	418	420	422

mAtI0958	366	85	26	370	372	244	194	375	424	379
mAtI0959	381	383	26	385	387	389	194	310	426	394
mAtI0960	396	187	26	399	401	389	194	403	428	407
mAtI0961	409	411	26	414	416	53	55	418	430	422
mAtI0964	432	434	436	438	440	442	55	445	447	449
mAtI0965	451	453	26	455	457	459	34	462	464	466
mAtI0966	468	187	26	470	472	389	194	474	476	478
mAtI0967	480	24	483	485	487	389	194	489	491	493
mAtI0969	495	497	499	501	503	389	194	214	506	508
mAtI0970	510	24	26	512	514	516	194	518	520	522
mAtI0971	524	411	26	528	530	532	55	534	536	538
mAtI0973	432	434	436	438	440	442	55	445	540	449
mAtI0974	451	453	26	455	457	459	34	462	542	466
mAtI0975	468	187	26	470	472	389	194	474	544	478
mAtI0976	480	24	483	485	487	389	194	489	546	493
mAtI0977	548	550	552	554	556	558	294	560	562	564
mAtI0978	495	497	499	501	503	389	194	214	566	508
mAtI0979	510	24	26	512	514	516	194	518	568	522
mAtI0980	524	411	26	528	530	532	55	534	570	538
mAtI0981	548	550	552	554	556	558	294	560	572	564
mAtI0982	574	187	576	578	580	582	584	586	588	590
mAtI0983	574	187	576	578	580	582	584	586	592	590
mAtI0984	594	596	26	598	600	12	14	602	604	606
mAtI0985	608	169	610	612	614	616	584	618	620	622
mAtI0986	624	626	26	628	630	582	632	634	636	638
mAtI0987	640	642	499	644	646	648	650	652	654	656
mAtI0988	658	660	662	664	666	668	670	672	674	676
mAtI0989	678	680	682	684	686	688	650	690	692	694
mAtI0990	594	596	26	598	600	12	14	602	696	606
mAtI0991	608	169	610	612	614	616	584	618	698	622
mAtI0992	624	626	26	628	630	582	632	634	700	638
mAtI0993	640	642	499	644	646	648	650	652	702	656
mAtI0994	658	660	662	664	666	668	670	672	704	676
mAtI0995	678	680	682	684	686	688	650	690	706	694

мАт10996	708	24	26	711	713	129	55	715	717	719
мАт10997	708	24	26	711	713	129	55	715	721	719
мАт10998	723	187	26	725	727	129	55	729	731	733
мАт10999	723	187	26	725	727	129	55	729	735	733
мАт11000	737	24	26	739	741	743	55	745	747	749
мАт11001	737	24	26	739	741	743	55	745	751	749
мАт11002	753	24	26	755	713	129	55	715	757	719
мАт11003	753	24	26	755	713	129	55	715	759	719
мАт10914	44	46	26	49	51	53	55	57	762	61
мАт11004	764	766	499	768	770	91	55	772	774	776
мАт11005	764	766	499	768	770	91	55	772	778	776
мАт11006	780	782	26	784	786	53	55	788	790	792
мАт11007	780	782	26	784	786	53	55	788	794	792
мАт11008	796	24	26	798	800	53	55	802	804	806
мАт11009	796	24	26	798	800	53	55	802	808	806
мАт11010	810	812	814	816	818	129	820	822	824	826
мАт11011	810	812	814	816	818	129	820	822	828	826

Таблица 2: Идентификаторы нуклеотидных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO									
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC	LC
мАт10913	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
мАт10915	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39
мАт10916	1	3	5	7	9	11	13	15	41	19
мАт10917	43	45	47	48	50	52	54	56	58	60
мАт10918	21	23	25	27	29	31	33	35	62	39
мАт10920	64	66	68	70	72	74	54	76	78	80
мАт10921	82	84	47	86	88	90	54	92	94	96
мАт10922	98	100	102	104	106	108	110	112	114	116
мАт10923	118	120	122	124	126	128	54	130	132	134
мАт10924	136	138	140	142	144	146	148	150	152	154
мАт10925	64	66	68	70	72	74	54	76	156	80
мАт10926	82	84	47	86	88	90	54	92	158	96

mAtI0927	98	100	102	104	106	108	110	112	160	116
mAtI0928	118	120	122	124	126	128	54	130	162	134
mAtI0929	136	138	140	142	144	146	148	150	164	154
mAtI0930	166	168	170	172	174	128	54	176	178	180
mAtI0931	166	168	170	172	174	128	54	176	182	180
mAtI0932	184	186	47	188	190	192	193	195	197	199
mAtI0933	201	203	205	207	209	211	54	213	215	217
mAtI0934	219	221	223	225	227	229	193	231	233	235
mAtI0935	237	23	47	239	241	243	193	245	247	249
mAtI0936	251	253	255	257	259	128	54	261	263	265
mAtI0937	267	269	271	273	275	128	54	277	279	281
mAtI0940	283	168	285	287	289	291	293	295	297	299
mAtI0938	301	23	47	303	305	307	193	309	311	313
mAtI0939	315	317	318	320	322	324	54	326	328	330
mAtI0941	332	334	47	335	337	339	293	295	341	343
mAtI0942	184	186	47	188	190	192	193	195	345	199
mAtI0943	201	203	205	207	209	211	54	213	347	217
mAtI0944	219	221	223	225	227	229	193	231	349	235
mAtI0945	237	23	47	239	241	243	193	245	351	249
mAtI0946	251	253	255	257	259	128	54	261	353	265
mAtI0947	267	269	271	273	275	128	54	277	355	281
mAtI0948	301	23	47	303	305	307	193	309	357	313
mAtI0949	315	317	318	320	322	324	54	326	359	330
mAtI0951	332	334	47	335	337	339	293	295	361	343
mAtI0950	283	168	285	287	289	291	293	295	363	299
mAtI0954	365	367	368	369	371	373	193	374	376	378
mAtI0955	380	382	47	384	386	388	193	390	391	393
mAtI0956	395	397	47	398	400	388	193	402	404	406
mAtI0957	408	410	412	413	415	52	54	417	419	421
mAtI0958	365	367	368	369	371	373	193	374	423	378
mAtI0959	380	382	47	384	386	388	193	390	425	393
mAtI0960	395	397	47	398	400	388	193	402	427	406
mAtI0961	408	410	412	413	415	52	54	417	429	421
mAtI0964	431	433	435	437	439	441	443	444	446	448

mAtI0965	450	452	47	454	456	458	460	461	463	465
mAtI0966	467	397	412	469	471	388	193	473	475	477
mAtI0967	479	481	482	484	486	388	193	488	490	492
mAtI0969	494	496	498	500	502	388	193	504	505	507
mAtI0970	509	481	412	511	513	515	193	517	519	521
mAtI0971	523	525	526	527	529	531	54	533	535	537
mAtI0973	431	433	435	437	439	441	443	444	539	448
mAtI0974	450	452	47	454	456	458	460	461	541	465
mAtI0975	467	397	412	469	471	388	193	473	543	477
mAtI0976	479	481	482	484	486	388	193	488	545	492
mAtI0977	547	549	551	553	555	557	293	559	561	563
mAtI0978	494	496	498	500	502	388	193	504	565	507
mAtI0979	509	481	412	511	513	515	193	517	567	521
mAtI0980	523	525	526	527	529	531	54	533	569	537
mAtI0981	547	549	551	553	555	557	293	559	571	563
mAtI0982	573	186	575	577	579	581	583	585	587	589
mAtI0983	573	186	575	577	579	581	583	585	591	589
mAtI0984	593	595	47	597	599	11	13	601	603	605
mAtI0985	607	168	609	611	613	615	583	617	619	621
mAtI0986	623	625	47	627	629	581	631	633	635	637
mAtI0987	639	641	498	643	645	647	649	651	653	655
mAtI0988	657	659	661	663	665	667	669	671	673	675
mAtI0989	677	679	681	683	685	687	649	689	691	693
mAtI0990	593	595	47	597	599	11	13	601	695	605
mAtI0991	607	168	609	611	613	615	583	617	697	621
mAtI0992	623	625	47	627	629	581	631	633	699	637
mAtI0993	639	641	498	643	645	647	649	651	701	655
mAtI0994	657	659	661	663	665	667	669	671	703	675
mAtI0995	677	679	681	683	685	687	649	689	705	693
mAtI0996	707	709	47	710	712	128	54	714	716	718
mAtI0997	707	709	47	710	712	128	54	714	720	718
mAtI0998	722	186	47	724	726	128	54	728	730	732
mAtI0999	722	186	47	724	726	128	54	728	734	732
mAtI1000	736	23	47	738	740	742	54	744	746	748

mAт11001	736	23	47	738	740	742	54	744	750	748
mAт11002	752	23	47	754	712	128	54	714	756	718
mAт11003	752	23	47	754	712	128	54	714	758	718
mAт10914	760	45	47	48	50	52	54	56	761	60
mAт11004	763	765	498	767	769	90	54	771	773	775
mAт11005	763	765	498	767	769	90	54	771	777	775
mAт11006	779	781	47	783	785	52	54	787	789	791
mAт11007	779	781	47	783	785	52	54	787	793	791
mAт11008	795	709	47	797	799	52	54	801	803	805
mAт11009	795	709	47	797	799	52	54	801	807	805
mAт11010	809	811	813	815	817	128	819	821	823	825
mAт11011	809	811	813	815	817	128	819	821	827	825

[000164] Описанные в настоящем документе антитела содержат полностью человеческие вариабельные области, но могут содержать константные области мыши (например, Fc IgG1 мыши или Fc IgG2 мыши (изотипа а или b)) или константные области человека (например, Fc IgG1 человека или Fc IgG4 человека). Как должен понимать специалист в данной области техники, антитело, характеризующееся конкретным Fc изотипом, можно преобразовать в антитело с другим Fc изотипом (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно преобразовать в антитело IgG4 человека и т. д.), однако в любом случае вариабельные домены (включая CDR), обозначенные численными идентификаторами, показанными в таблицах 1 и 2, останутся без изменений, и ожидается, что свойства связывания с антигеном, будут идентичными или по существу аналогичными, независимо от природы константного -домена.

[000165] Вариабельные области антител, полученных от мышей VELOCIMMUNE® и из образцов человека, секвенировали с использованием секвенирования нового поколения и выявили репертуар для пар тяжелых и легких цепей (фигурв 10А и 10В). Преобладающая линия антител VI использовала VH3-53 в паре с VK1-9, VK1-33 или VK1-39, тогда как антитела человека использовали VH3-66 в паре с VK1-33 или VH2-70 в паре с VK1-39. Дальнейший анализ наложенных последовательностей продемонстрировал значительную степень совпадения в репертуаре выделенных каппа-цепей между антителами, полученными от VI и человека. Хотя совпадение репертуара лямбда-цепей было не столь хорошим, это может быть связано с тем, что данное исследование включало лишь две лямбда-цепи-мыши. Средняя длина CDR тяжелой цепи была аналогичной для антител, полученных от VI и человека, и составляла 13 и 14,5 аминокислот, соответственно. Средняя длина CDR каппа-цепи была аналогичной для антител, полученных от VI и человека, составляла 9 аминокислот и была близкой к значениям для лямбда-цепей, которые составляли 11,1 и 10,6 аминокислот, соответственно. Доступность гуманизированных антител мыши и человека позволила расширить разнообразие V-генов

и впоследствии выявить неконкурентные антитела.

[000166] Как описано выше, антитела получали из гибридом, полученных от мышей VELOCIMMUNE®, путем прямого выделения из антиген-положительных В-клеток мыши VELOCIMMUNE® или на основе вариабельных областей, клонированных из антиген-положительных В-клеток человека. Сводная информация по этим источникам представлена в таблице 3.

Таблица 3: Источники антитела/вариабельной области

Антитело	Источник
мАт10913	В-клетки мыши
мАт10915	В-клетки мыши
мАт10916	В-клетки мыши
мАт10917	В-клетки мыши
мАт10918	В-клетки мыши
мАт10920	В-клетки мыши
мАт10921	В-клетки мыши
мАт10922	В-клетки мыши
мАт10923	В-клетки мыши
мАт10924	В-клетки мыши
мАт10925	В-клетки мыши
мАт10926	В-клетки мыши
мАт10927	В-клетки мыши
мАт10928	В-клетки мыши
мАт10929	В-клетки мыши
мАт10930	В-клетки мыши
мАт10931	В-клетки мыши
мАт10932	В-клетки мыши
мАт10933	В-клетки мыши
мАт10934	В-клетки мыши
мАт10935	В-клетки мыши
мАт10936	В-клетки мыши
мАт10937	В-клетки мыши
мАт10940	В-клетки мыши
мАт10938	В-клетки мыши
мАт10939	В-клетки мыши
мАт10941	В-клетки мыши

мАт10942	В-клетки мыши
мАт10943	В-клетки мыши
мАт10944	В-клетки мыши
мАт10945	В-клетки мыши
мАт10946	В-клетки мыши
мАт10947	В-клетки мыши
мАт10948	В-клетки мыши
мАт10949	В-клетки мыши
мАт10951	В-клетки мыши
мАт10950	В-клетки мыши
мАт10954	В-клетки человека
мАт10955	В-клетки человека
мАт10956	В-клетки человека
мАт10957	В-клетки человека
мАт10958	В-клетки человека
мАт10959	В-клетки человека
мАт10960	В-клетки человека
мАт10961	В-клетки человека
мАт10964	В-клетки человека
мАт10965	В-клетки человека
мАт10966	В-клетки человека
мАт10967	В-клетки человека
мАт10969	В-клетки человека
мАт10970	В-клетки человека
мАт10971	В-клетки человека
мАт10973	В-клетки человека
мАт10974	В-клетки человека
мАт10975	В-клетки человека
мАт10976	В-клетки человека
мАт10977	В-клетки человека
мАт10978	В-клетки человека
мАт10979	В-клетки человека
мАт10980	В-клетки человека
мАт10981	В-клетки человека

мАт10982	В-клетки мыши
мАт10983	В-клетки мыши
мАт10984	В-клетки человека
мАт10985	В-клетки человека
мАт10986	В-клетки человека
мАт10987	В-клетки человека
мАт10988	В-клетки человека
мАт10989	В-клетки человека
мАт10990	В-клетки человека
мАт10991	В-клетки человека
мАт10992	В-клетки человека
мАт10993	В-клетки человека
мАт10994	В-клетки человека
мАт10995	В-клетки человека
мАт10996	гибридома
мАт10997	гибридома
мАт10998	гибридома
мАт10999	гибридома
мАт11000	гибридома
мАт11001	гибридома
мАт11002	гибридома
мАт11003	гибридома
мАт10914	В-клетки мыши
мАт11004	гибридома
мАт11005	гибридома
мАт11006	гибридома
мАт11007	гибридома
мАт11008	гибридома
мАт11009	гибридома
мАт11010	гибридома
мАт11011	гибридома

Пример 3: Исследование супернатантов гибридом посредством твердофазного ИФА связывания

[000167] Твердофазный ИФА связывания выполняли для выявления супернатантов

с антителами, связывавшимися с рецепторсвязывающим доменом (RBD) белка SARS-CoV-2-Spike. Белок, состоящий из RBD SARS-CoV-2 (аминокислоты 319-541), экспрессированный с использованием 6X-гистидинового маркера и двух маркеров эпитопа тус на С-конце (SARS-CoV-2-S-RBD-mmH; см. также номер доступа в NCBI MN908947.3), наносили в концентрации 1 мкг/мл на 96-луночный планшет в буфере PBS на ночь при 4 °С. Затем блокировали сайты неспецифического связывания с использованием 0,5% (мас./об.) раствора БСА в PBS. Супернатанты антител или чистую среду разбавляли в соотношении 1:40 или 1:50 блокирующем буфером PSA+0,5% БСА и переносили на промытые титрационные микропланшеты. После инкубирования в течение одного часа при комнатной температуре лунки промывали, и связавшийся с планшетом супернатант определяли с использованием антитела козы против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ) (Jackson ImmunoResearch), или антитела против IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ) (Jackson ImmunoResearch). Затем планшеты проявляли с использованием раствора субстрата ТМБ (BD Biosciences) в соответствии с рекомендациями производителя и измеряли оптическую плотность при 450 нм на планшет-риде Victor X5.

[000168] Способность антител против SARS-CoV-2-S связывать рецепторсвязывающий домен SARS-CoV-2-S (SARS-CoV-2-S-RBD) оценивали, как описано выше, с использованием твердофазного ИФА связывания с белком SARS-CoV-2-S-RBD-mmH, нанесенным на микропланшет. Одноточечное связывание супернатанта антител с SARS-CoV-2-S-RBD-mmH, нанесенным на 96-луночные титрационные микропланшеты, обнаруживали с использованием антитела против hFc или против mFc, конъюгированного с ПХ.

[000169] Сводные результаты анализа связывания по трем исследованиям приведены в таблице 4. Указаны сигналы связывания SARS-CoV-2 (поглощение 450 нм), причем фоновый сигнал чистой среды представлен в качестве отрицательного эталона для каждого эксперимента. Образец, помеченный как IC (Неопределенный результат), демонстрировал экспериментальную аномалию на планшете, и поэтому указан без значения. Как показано по сравнению с контролем (чистой средой), проанализированные супернатанты демонстрировали значительную степень связывания с SARS-CoV-2-S-RBD.

Таблица 4: Связывание супернатантов с рецепторсвязывающим доменом белка шипов SARS-CoV-2

Супернатант	Разбавление супернатанта	Детектирующее антитело	Сигнал связывания (поглощение при 450 нм)
мАт10913	1:50	a-hFc	2,752
мАт10914	1:50	a-hFc	2,857
мАт10915	1:50	a-hFc	2,76
мАт10932	1:50	a-hFc	2,718
мАт10933	1:50	a-hFc	2,762

МАТ10934	1:50	a-hFc	2,688
МАТ10935	1:50	a-hFc	2,676
МАТ10936	1:50	a-hFc	2,644
МАТ10937	1:50	a-hFc	2,664
МАТ10920	1:50	a-hFc	2,683
МАТ10921	1:50	a-hFc	2,633
МАТ10922	1:50	a-hFc	2,595
МАТ10923	1:50	a-hFc	2,353
МАТ10924	1:50	a-hFc	2,269
МАТ10930	1:50	a-hFc	2,451
МАТ10938	1:50	a-hFc	2,536
МАТ10939	1:50	a-hFc	2,516
МАТ10940	1:50	a-hFc	2,77
МАТ10941	1:50	a-hFc	IC
МАТ10982	1:50	a-hFc	2,537
МАТ10984	1:50	a-hFc	0,716
МАТ10985	1:50	a-hFc	2,35
МАТ10986	1:50	a-hFc	2,331
МАТ10987	1:50	a-hFc	2,438
МАТ10988	1:50	a-hFc	3,062
МАТ10989	1:50	a-hFc	3,116
МАТ10969	1:50	a-hFc	2,629
МАТ10970	1:50	a-hFc	2,807
МАТ10971	1:50	a-hFc	3,052
МАТ10964	1:50	a-hFc	3,086
МАТ10965	1:50	a-hFc	2,918
МАТ10966	1:50	a-hFc	0,421
МАТ10967	1:50	a-hFc	1,732
МАТ10954	1:50	a-hFc	1,963
МАТ10955	1:50	a-hFc	2,469
МАТ10956	1:50	a-hFc	2,6
МАТ10957	1:50	a-hFc	2,49
МАТ10977	1:50	a-hFc	2,925
МАТ11010	1:40	a-mFc	2,896
МАТ11004	1:40	a-mFc	2,908
МАТ11000	1:40	a-mFc	2,725
МАТ11006	1:40	a-mFc	2,619
МАТ11008	1:40	a-mFc	2,907
МАТ10998	1:40	a-mFc	2,835
МАТ10996	1:40	a-mFc	2,826
МАТ11002	1:40	a-mFc	2,581
Только среда	1:50	a-hFc	0,069

Только среда	1:40	a-mFc	0,058
Только среда	1:50	a-hFc	0,055

Пример 4: Связывание антител с вирусоподобной частицей, экспрессирующей SARS-CoV-2-S

[000170] С целью исследования способности панели моноклональных антител против SARS-CoV-2-S связывать гликопротеин шипов SARS-CoV-2 разработали анализ связывания *in vitro* с использованием вирусоподобных частиц, экспрессирующих белок шипов SARS-CoV-2 (VLP) на платформе обнаружения на основе электрохемилюминесценции (MSD).

[000171] Для временной экспрессии белка шипов SARS-CoV-2 (номер доступа в NCBI MN908947.3, аминокислоты 16-1211; SEQ ID NO: 833) вирус везикулярного стоматита (VSV), лишенный гликопротеина G (VSV дельта G), псевдотипировали по белку шипов SARS-CoV-2 (VSV-SARS-CoV-2-S) и получали в клетках HEK293T. В качестве отрицательного контроля связывания VSV delta G псевдотипировали по белку VSV G (VSV-G).

[000172] Эксперименты выполняли в соответствии со следующей процедурой. Два вышеописанных типа VLP разбавляли PBS, высевали в 96-луночные планшеты с углеродными электродами (MULTI-ARRAY high-bind plate, MSD) и инкубировали в течение ночи при 4 °C, обеспечивая адгезию VLP. Сайты неспецифического связывания блокировали 2% (масс./об.) БСА в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). К частицам, связанным с планшетом, добавляли супернатанты, содержащие антитела, полученные от мышей, иммунизированных SARS CoV-2, или сывороток инфицированных людей, а также контрольные образцы, содержащие чистую среду, разбавленные в соотношении 1:10 или 1:20 в 1x PBS+0,5% БСА-буфере. Затем планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании, после чего промывали 1x PBS для удаления несвязавшихся антител с использованием устройства для промывки планшетов AquaMax2000 (MDS Analytical Technologies). Связанные с планшетом антитела обнаруживали с использованием антитела против IgG человека, конъюгированного с SULFO-TAGTM (Jackson ImmunoResearch), или антитела против IgG мыши, конъюгированного с SULFO-TAGTM (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания планшеты проявляли с помощью буфера для считывания (MSD) в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем, и регистрировали люминесцентные сигналы с помощью прибора SECTOR Imager 600 (Meso Scale Development). Фиксировали сигналы прямого связывания (в RLU) и рассчитывали отношение VLP, экспрессирующих SARS-CoV-2-S, к неспецифическим VLP.

[000173] Способность моноклональных антител против SARS-CoV-2-S связываться с VLP, экспрессирующими SARS-CoV-2-S, по сравнению со связыванием с неспецифическими VLP, экспрессирующими VSV, оценивали с помощью анализа иммунологического связывания, как описано выше. Одноточечное связывание с иммобилизованными VLP на 96-луночных планшетах High Bind (MSD) выполняли при

разбавлении супернатанта антитела в соотношении 1:10 или 1:20, связывавшегося в течение 1 часа и обнаруживали с использованием антитела против IgG человека или антитела против IgG мыши, конъюгированных с SULFO-TAGTM. Электрохемилюминесцентные сигналы связывания регистрировали на Sector Imager 600 (MSD). Значения RLU определяли для связывания антител с VLP. Отношения рассчитывали при сравнении сигналов связывания VLP, экспрессирующих SARS-CoV-2-S, с контрольными VLP.

[000174] Сводные результаты анализа связывания по трем экспериментам приведены в таблице 5. Сигнал, наблюдаемый для VLP, экспрессирующих SARS-COV-2-S, указывал на связывание, тогда как сравнение с отрицательными VLP обеспечивало относительный фоновый сигнал. Образцы чистой среды обеспечивали базовые сигналы связывания вторичных антител с образцами без супернатанта. Значения специфического связывания 46 антител в > 4 раза превышали значения для образцов чистой среды (20-35 RLU) при использовании VLP, экспрессирующих SARS-CoV-2-S, причем диапазон сигналов связывания составлял 85-13600 RLU. Значения соотношения VSV, экспрессирующих SARS-CoV-2-S : VSV-VLP (отрицательный контроль) варьировались от 1,1 до 22,7, причем многие из них характеризовались высоким фоновым сигналом VSV-VLP. Соотношение для мАт11002, равное 0,9, вероятно, было связано с низкой концентрацией моноклонального антитела в образце супернатанта.

Таблица 5: Связывание VLP SARS-CoV-2-S

Супернатант	Разбавление супернатанта	Вторичное детектирующее антитело	Сигнал связывания VSV-VLP (RLU)	Сигнал связывания VLP VSV-SARS-CoV-2-S (RLU)	Соотношение сигналов связывания : VSV-SARS-CoV-2-S/VSV-VLP
мАт10913	1:10	a-hFc	2155	3244	1,5
мАт10914	1:10	a-hFc	3885	5181	1,3
мАт10915	1:10	a-hFc	980	9022	9,2
мАт10932	1:10	a-hFc	989	10451	10,6
мАт10933	1:10	a-hFc	507	966	1,9
мАт10934	1:10	a-hFc	3876	5041	1,3
мАт10935	1:10	a-hFc	2087	3867	1,9
мАт10936	1:10	a-hFc	2325	8076	3,5

МАТ10937	1:10	a-hFc	1404	1920	1,4
МАТ10920	1:10	a-hFc	8366	10041	1,2
МАТ10921	1:10	a-hFc	1194	5436	4,6
МАТ10922	1:10	a-hFc	1473	2229	1,5
МАТ10923	1:10	a-hFc	1224	1859	1,5
МАТ10924	1:10	a-hFc	487	969	2
МАТ10930	1:10	a-hFc	1769	3207	1,8
МАТ10938	1:10	a-hFc	1232	6623	5,4
МАТ10939	1:10	a-hFc	1777	5074	2,9
МАТ10940	1:10	a-hFc	606	2072	3,4
МАТ10941	1:10	a-hFc	673	4588	6,8
МАТ10982	1:10	a-hFc	1178	2016	1,7
МАТ10984	1:10	a-hFc	2486	8989	3,6
МАТ10985	1:10	a-hFc	2049	3279	1,6
МАТ10986	1:10	a-hFc	2044	10831	5,3
МАТ10987	1:10	a-hFc	1839	2450	1,3
МАТ10988	1:10	a-hFc	1832	2305	1,3
МАТ10989	1:10	a-hFc	672	1999	3
МАТ10969	1:10	a-hFc	3096	3313	1,1
МАТ10970	1:10	a-hFc	1364	5712	4,2
МАТ10971	1:10	a-hFc	1135	7266	6,4
МАТ10964	1:10	a-hFc	1439	8601	6

мАт10965	1:10	a-hFc	743	1370	1,8
мАт10966	1:10	a-hFc	1428	6574	4,6
мАт10967	1:10	a-hFc	1446	9510	6,6
мАт10954	1:10	a-hFc	641	6308	9,8
мАт10955	1:10	a-hFc	932	1788	1,9
мАт10956	1:10	a-hFc	1030	1581	1,5
мАт10957	1:10	a-hFc	604	5544	9,2
мАт10977	1:10	a-hFc	4141	13600	3,3
мАт11010	1:20	a-mFc	96	363	3,8
мАт11004	1:20	a-mFc	110	406	3,7
мАт11000	1:20	a-mFc	333	592	1,8
мАт11006	1:20	a-mFc	165	3747	22,7
мАт11008	1:20	a-mFc	103	324	3,1
мАт10998	1:20	a-mFc	74	218	2,9
мАт10996	1:20	a-mFc	51	85	1,7
мАт11002	1:20	a-mFc	156	146	0,9
Только среда	1:10	a-hFc	30	35	1,2
Только среда	1:20	a-mFc	35	20	0,6
Только среда	1:10	a-hFc	39	29	0,7

Пример 5: Нейтрализация антителами инфекционности псевдовируса VSV-SARS-CoV-2-S

[000175] С целью исследования способности панели моноклональных антител против SARS-CoV-2-S нейтрализовать SARS-CoV-2, разработали анализ нейтрализации *in vitro* с использованием псевдовируса VSV-SARS-CoV-2-S.

[000176] Как описано выше, вирусы псевдотипа VSV получали путем временной трансфекции клеток 293Т плазмидой, кодирующей белок шипов SARS-CoV-2. Клетки высевали в 15-сантиметровые планшеты из расчета $1,2 \times 10^7$ клеток на планшет в полную среду DMEM за один день до трансфекции ДНК белка шипов в количестве 15 мкг/планшет с использованием 125 мкл липофектамина LTX, 30 мкл реагента PLUS и до 3 мл Opti-Mem.

Через 24 часа после трансфекции клетки промывали 10 мл PBS, затем инфицировали вирусом VSV Δ G:mNeon в количестве 0,1 MOI в 10 мл Opti-Mem. Вирус инкубировали с клетками в течение 1 часа, осторожно встряхивая каждые 10 минут. Клетки 3 раза промывали 10 мл PBS, затем покрывали 20 мл среды для заражения перед инкубированием при 37 °C, 5% CO₂ в течение 24 часов. Супернатант собирали в 250-мл центрифужные пробирки на льду, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут для осаждения остатков клеток, аликвотировали на льду, а затем замораживали до -80 °C. Инфекционность проверяли на клетках Vero перед использованием в анализах нейтрализации. Этот материал называли VSV-SARS-CoV-2-S.

Анализ нейтрализации VSV-SARS-CoV-2-S

[000177] В 1 день клетки Vero высевали при 80% конфлюэнтности во флаконы T225. Для засева среду отделяли от клеток, клетки промывали 20 мл PBS (Gibco: 20012-043), добавляли 5 мл TrypLE и инкубировали в течение ~5 минут при 37°C до отделения клеток. Для инактивации трипсина добавляли 5 мл полной среды DMEM и перемешивали пипеткой для распределения клеток. Для подсчета ресуспендированных клеток 20000 клеток Vero высевали в 100 мкл предварительно нагретой полной среды DMEM на лунку 96-луночного черного полистирольного микропланшета (Corning: 3904).

[000178] На 2 день VSV-SARS-CoV-2-S размораживали на льду и разбавляли в соотношении 1:1 инфекционной средой.

[000179] В 96-луночном планшете с V-образным дном получали разбавление каждого супернатанта в 60 мкл инфекционной среды. Для образцов среды (отрицательный контроль) в лунки добавляли 60 мкл разбавленной кондиционированной среды. 60 мкл разбавленного VSV-SARS-CoV-2-S добавляли в каждую лунку, кроме контрольных лунок со средой. В эти лунки добавляли 60 мкл инфекционной среды. Затем псевдовirus инкубировали с разбавленными супернатантами в течение 30 минут при комнатной температуре. Из планшетов с клетками Vero удаляли среду, 100 мкл смесей супернатанта/псевдовirusа переносили к клеткам и инкубировали планшет при 37 °C, 5% CO₂ в течение 24 часов. Конечные разведения супернатанта в соотношении 1:4 и 1:20, а для некоторых образцов 1:100, использовали для оценки нейтрализации псевдовirusов VSV-SARS-CoV-2-S.

[000180] На 3 день после 24-ч инкубирования супернатант удаляли из лунок с клетками и заменяли 100 мкл PBS. Затем планшеты считывали на SpectraMax i3 с цитометром для визуализации MiniMax.

[000181] Способность антител против SARS-CoV-2-S нейтрализовать псевдотипированный вирус на основе VSV, экспрессирующий SARS-CoV-2-S, оценивали с помощью анализа нейтрализации фокусов флуоресценции. Ниже приведены сводные результаты связывания по трем анализам. Эффективность нейтрализации антитела при каждом разбавлении представлена в процентах по сравнению с контрольным образцом, имитирующим супернатант. Все антитела демонстрировали нейтрализующую способность, причем антитела, демонстрировавшие более высокую нейтрализацию, могли обладать

более эффективной нейтрализующей способностью, особенно в отношении набора антител, подвергавшихся оценке при разбавлении 1:100.

Таблица 6: Нейтрализация VLP

Супернатант	Нейтрализация (разбавление 1:4)	Нейтрализация (разбавление 1:20)	Нейтрализация (разбавление 1:100)
мАт10913	99,5	95,5	69,1
мАт10914	94,2	74,8	43,6
мАт10915	96,7	74,2	29,6
мАт10932	99,8	94,6	68
мАт10933	99,8	98,9	88,4
мАт10934	99,9	99,8	98,4
мАт10935	99,6	98,5	88,8
мАт10936	99,7	99,1	92,9
мАт10937	97,5	87,7	56,3
мАт10920	99,5	95,5	69,1
мАт10921	98,2	91,4	46,1
мАт10922	99,8	99,1	88,4
мАт10923	99,5	92,9	67,7
мАт10924	98,1	85,4	55,2
мАт10930	99,1	91,1	59
мАт10938	98,1	83	54,2
мАт10939	98,6	90,5	64
мАт10940	97	89,9	66,4

МАТ10941	98,9	92,9	73,8
МАТ10982	97,4	83,8	44,5
МАТ10984	99,8	95,1	83,4
МАТ10985	99,7	88,4	63,5
МАТ10986	99,7	98	86
МАТ10987	99,3	97,7	94,6
МАТ10988	97,6	87,6	62,2
МАТ10989	100	99,8	98,2
МАТ10969	97,2	91	63,7
МАТ10970	99,6	96,7	82,4
МАТ10971	99,5	97	73,9
МАТ10964	99,7	99,7	94,1
МАТ10965	98,5	87,6	68,6
МАТ10966	99,5	95,5	76,2
МАТ10967	98,9	91,4	69,2
МАТ10954	99,8	96	70,7
МАТ10955	98,8	88,6	62,7
МАТ10956	97,1	84,1	61,6
МАТ10957	97,6	76,4	48
МАТ10977	95,5	79	47,7
МАТ11010	85	54	Н/П
МАТ11004	77	40	Н/П

мАт11000	98	82	Н/П
мАт11006	91	54	Н/П
мАт11008	96	77	Н/П
мАт10998	88	59	Н/П
мАт10996	85	58	Н/П
мАт11002	35	-1	Н/П

*Н/П: не проверяли

Пример 6: Исследование антител в суррогатном анализе антителозависимой клеточно-опосредованной токсичности

[000182] Способность антител, мишенью которых является белок шипов SARS-CoV-2, взаимодействовать с FcγR3a, Fc-рецептором, явно экспрессирующимся на естественных киллерах (NK) и индуцирующим антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), измеряли с помощью суррогатного биологического анализа с использованием репортерных клеток и клеток-мишеней, связанных с антителами. В этом анализе использовали Т-клетки Jurkat, модифицированные с целью экспрессии репортерного гена люциферазы под контролем фактора транскрипции NFAT (NFAT-Luc) вместе с рецептором FcγR3a человека аллотипа ¹⁷⁶Val с высоким сродством (Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a ¹⁷⁶Val). Клетки-мишени представляли собой рекомбинантные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие CD20 человека (используемые в качестве положительного контроля с антителом IgG1 человека, мишенью которого является CD20) и полноразмерный белок шипов SARS-CoV-2 под контролем промотора, индуцируемого доксициклином. Репортерные клетки инкубировали с клетками-мишенями, и вовлечение FcγR3a через Fc-домен антител IgG1 человека, связанных с клетками-мишенями, приводило к активации фактора транскрипции NFAT в репортерных клетках и стимулировало экспрессию люциферазы, которую затем измеряли посредством считывания люминесценции.

[000183] Т-клетки Jurkat модифицировали с целью конститутивной экспрессии полноразмерного CD20 человека (аминокислоты M1-P297, номер доступа в NCBI NP_690605.1), трансаактиваторного белка Tet3G (клонированного с использованием вектора Takara pEF1α-Tet3G, № по каталогу 631167), а также индуцируемого доксициклином полноразмерного белка шипов SARS-CoV-2 (аминокислоты M1-T1273, номер доступа в NCBI YP_009724390.1). Рекомбинантные клетки, экспрессирующие белок шипов Jurkat/Tet3G/hCD20/SARS-CoV2, сортировали по высокой экспрессии белка шипов и в дальнейшем поддерживали в ростовой среде RPMI+10% FBS без тетрациклина+P/S/G+500 мкг/мл G418+1 мкг/мл пурамицина+250 мкг/мл гигромицина.

[000184] Т-клетки Jurkat модифицировали с целью стабильной экспрессии

репортерного конструктора "ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) - люцифераза" вместе с рецептором FcγR3a человека аллотипа ¹⁷⁶Val с высоким сродством (аминокислоты M1-K254, номер доступа в NCBI P08637 VAR_003960). Рекомбинантные репортерные клетки поддерживали в ростовой среде RPMI1640+10% FBS+P/S/G+0,5 мкг/мл пурамицина+500 мкг/мл G418.

[000185] За 36 часов до начала суррогатного анализа ADCC 5×10^5 клеток-мишеней/мл индуцировали в среде для культивирования клеток RPMI+10% FBS без тетрациклина+P/S/G, содержащей 1 мкг/мл доксициклина (Sigma). За день до эксперимента репортерные клетки разделяли до плотности $7,5 \times 10^5$ клеток/мл в ростовой среде RPMI 1640+10% FBS+P/S/G+0,5 мкг/мл пурамицина+500 мкг/мл G418.

[000186] Вкратце, в день эксперимента клетки-мишени и репортерные клетки переносили в среду для анализа (RPMI+10% FBS без тетрациклина+P/S/G) и добавляли в соотношении 3:2 (3×10^4 клеток-мишеней/лунку и 2×10^4 репортерных клеток/лунку) в 384-луночные белые титрационные микропланшеты с последующим добавлением супернатанта антител против SARS-CoV-2-S в различных концентрациях. Образец положительного контроля (антитело CD20 с IgG1 человека) и образец отрицательного контроля, не содержащий антител, включали в каждый планшет для нормировки обнаруженной активности ADCC супернатантов антител против SARS-CoV-2-S. Планшеты инкубировали при 37 °C/5% CO₂ в течение 5 часов с последующим добавлением равного объема реагента ONE-Glo™ (Promega) для лизирования клеток и обнаружения активности люциферазы. Испускаемое световое излучение регистрировали в относительных световых единицах (RLU) на многоканальном планшет-ридере Envision (PerkinElmer), данные анализировали и нормировали с использованием следующего уравнения:

Активность ADCC (%) = $100 \times \frac{\text{среднее значение RLU (экспериментальные образцы)}}{\text{среднее RLU (фоновый сигнал)}}$

(Среднее значение RLU (положительный контроль) - среднее значение RLU (фоновый сигнал))

[000187] Способность антител против SARS-COV-2-S активировать рецепторы FcγR3a оценивали в суррогатном анализе ADCC с использованием Jurkat/NFAT-Luc/FcγR3a ¹⁷⁶Val) в качестве репортерных клеток и Jurkat/hCD20/SARS-CoV2 Spike в качестве клеток-мишеней. Каждое проанализированное антитело содержало домен IgG1.

[000188] В таблице 7 приведены сводные результаты, показывающие необработанные значения активности люциферазы и рассчитанный % от положительного контроля. Наблюдали диапазон % активности ADCC, указывающий на активацию FcγR3a антителами в супернатантах. Все образцы демонстрировали некоторую степень суррогатной активности ADCC, а 10 супернатантов антител продемонстрировали суррогатную активность ADCC, превосходящую активность, наблюдаемую для положительного контроля.

Таблица 7: Суррогатная активность ADCC супернатантов антител против SARS-CoV-2-S.

мАт	Среднее значение RLU ADCC	ADCC (Активность (%))
мАт10913	11480	111,9
мАт10914	21960	265,8
мАт10915	14280	153
мАт10932	13020	108,8
мАт10933	9740	68,5
мАт10934	11680	92
мАт10935	11540	90,4
мАт10936	15160	133,8
мАт10937	12340	100,1
мАт10920	15480	137,8
мАт10921	10080	67,7
мАт10922	9140	56,3
мАт10923	13340	107,1
мАт10924	7220	33
мАт10930	8900	53,4
мАт10938	12960	102,5
мАт10939	9440	59,7
мАт10940	12520	106,2
мАт10941	10340	77,2

мАт10982	7900	59,4
мАт10984	6780	6,8
мАт10985	5840	2,8
мАт10986	6200	4,4
мАт10987	12020	29,4
мАт10988	7200	8,7
мАт10989	10200	21,5
мАт10969	10500	23,1
мАт10970	7640	10,6
мАт10971	7480	10
мАт10964	6380	5,1
мАт10965	6780	6,9
мАт10966	7080	10,4
мАт10967	6740	8,6
мАт10954	6940	9,8
мАт10955	6740	8,7
мАт10956	6760	8,8
мАт10957	7120	10,8
мАт10977	12980	33,8

Пример 7: Анализ специфичности связывания антител против SARS-CoV-2-S

[000189] Анализ связывания Lumineх выполняли для определения связывания антител против SARS-COV-2-S с панелью антигенов. Для этого анализа антигены иммобилизовали посредством аминного связывания или захвата стрептавидином в микросферы Lumineх следующим образом: приблизительно 10 миллионов микросфер MagPlex (Lumineх Corp., MagPlex Microspheres, № в каталоге MC10000 и MC12000), ресуспендировали встряхиванием на вортексе в 500 мкл 0,1 М NaPO₄, pH 6,2 (буфер для

активации), а затем центрифугировали для удаления супернатанта. Микросферы защищали от света, поскольку они светочувствительны. Микросферы ресуспендировали в 160 мкл буфера для активации и активировали карбоксилатные группы (-COOH) добавлением 20 мкл 50 мг/мл N-гидроксисукцинимид (NHS, Thermo Scientific, № в каталоге 24525) с последующим добавлением 20 мкл 50 мг/мл 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида (EDC, ThermoScientific, № в каталоге 22980) при 25 °С. Через 10 минут pH реакции снижали до 5,0 добавлением 600 мкл 50 mM MES, pH 5 (буфер для связывания), микросферы встряхивали на вортексе и центрифугировали для удаления супернатанта. Активированные микросферы немедленно смешивали с 500 мкл 25 мкг/мл белкового антигена или стрептавидина в буфере для связывания и инкубировали в течение двух часов при 25 °С. Реакцию связывания останавливали добавлением 50 мкл 1M трис-HCl, pH 8,0, микросферы встряхивали на вортексе, центрифугировали и трижды промывали 800 мкл PBS 0,005% (Tween20 0,05%) для удаления несвязанных белков и других компонентов реакции. Микросферы ресуспендировали в 1 мл PBS, 2% БСА, 0,05% азида натрия, из расчета 10 миллионов микросфер/мл. Для захвата антигенов стрептавидином 500 мкл 12,5 мкг/мл биотинилированного белка в PBS добавляли к микросферам, связанным со стрептавидином, и инкубировали в течение одного часа при 25 °С. Микросферы встряхивали на вортексе, центрифугировали и трижды промывали 800 мкл PBS, а затем блокировали, используя 500 мкл 30 mM биотина (Millipore-Sigma, № в каталоге B4501) в 0,15 M трис, pH 8,0. Микросферы инкубировали в течение 30 минут, затем встряхивали на вортексе, центрифугировали и трижды промывали 800 мкл PBS. Микросферы ресуспендировали в 1 мл PBS, 2% БСА, 0,05% азида натрия, из расчета 10 миллионов микросфер/мл.

[000190] Микросферы для различных белков и биотинилированные белки смешивали из расчета 2700 гранул/мл, и 75 мкл микросфер вносили в лунку 96-луночного планшета ProcartaPlex с плоским дном (ThermoFisher, № в каталоге EPX-44444-000) и смешивали с 25 мкл отдельных супернатантов, содержащих антитела против SARS-CoV-2. Образцы и микросферы инкубировали в течение двух часов при 25 °С, а затем дважды промывали 200 мкл DPBS с 0,05% Tween 20. Для определения уровней антител, связанных с отдельными микросферами, добавляли 100 мкл 2,5 мкг/мл F(ab')₂ козы против каппа-цепей человека, конъюгированного с R-фикоэритрином (Southern Biotech, № в каталоге 2063-09) в блокирующем буфере (для антител с Fc-областями мыши) или 100 мкл 1,25 мкг/мл AffiniPure F(ab')₂ фрагмента антитела козы против IgG мыши с R-фикоэритрином, специфичного по отношению к F(ab')₂-фрагменту (Jackson ImmunoResearch, № в каталоге 115-116-072) в блокирующем буфере (для антител с Fc-областями человека), и инкубировали в течение 30 минут при 25 °С. Через 30 минут образцы дважды промывали 200 мкл промывочного буфера и ресуспендировали в 150 мкл промывочного буфера. Планшеты считывали на Luminex FlexMap 3D® (Luminex Corp.) и программном обеспечении Luminex xPonent® версии 4.3 (Luminex Corp.). Белки SARS-CoV-2, используемые в анализе, представляли собой:

RBD_ (R319-F541).mmh: SEQ ID NO: 829

RBD_ (R319-F541).mFc: SEQ ID NO: 830

RBD_ (R319-F541).hFc: SEQ ID NO: 831

[000191] Результаты связывания Luminex показаны в таблице 8 и таблице 9 в виде сигнала медианной интенсивности флуоресценции (MFI). Результаты показывают, что 46 супернатантов антител против SARS-CoV-2-S специфично связывались с белками RBD SARS-CoV-2-S. Эти результаты также показывают, что пять из этих антител перекрестно реагировали с RBD белка шипов коронавируса SARS, причем сигнал связывания превышал 1000 MFI.

Таблица 8: Сигнал связывания (MFI) белков SARS-CoV-2 Spike RBD, SARS-CoV-2 Spike S1, SARS RBD, SARS Spike S1, MERS Spike и MERS RBD с моноклональными антителами против SARS-CoV-2 (с hFc)

SARS-CoV-2									
Супернатант	Белок шипов SARS-CoV-2 (RBD) (R319-F541).mmH	Белок шипов SARS-CoV-2 (RBD) (R319-F541).mmH	Белок шипов Bt-SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541).mFc	Белок шипов SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541).mFc	Белок шипов Bt-SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541).hFc	Белок шипов SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541).hFc	SARS-CoV-2 Spike (RBD, Fc-маркер) (Sino 40592-V05H)	Белок шипов SARS-CoV-2 (субъединица S1, Fc-маркер) (Sino 40591-V02H)	Белок шипов SARS-CoV-2 (субъединица S1, Fc-маркер) (Sino 40591-V08H)
мАт10913	30709	29247	16645	33023	27452	31929	31561	18899	24931
мАт10914	31967	29650	15986	30740	25957	30464	30591	14914	21609
мАт10915	31795	30293	20062	31772	30625	32437	31267	17595	22917
мАт10932	29984	30133	17697	30640	26220	30559	29880	17627	22099
мАт10933	33356	32090	19383	34944	30110	35106	34484	21178	27509
мАт10934	33797	32649	21238	34325	33016	35841	33636	20643	27483
мАт10935	34853	32603	19328	35886	31444	35611	35037	19991	25554
мАт10936	33947	32305	21636	33740	32810	33912	33613	19487	25187
мАт10937	33866	32225	19689	34233	31501	34624	33878	19553	26404
мАт10920	34842	34440	20254	36415	31708	36828	36277	21085	28516
мАт10921	24977	23596	11307	19429	18186	22306	21766	8959	12212
мАт10922	31768	30755	18629	32355	27854	33609	31376	18287	24678
мАт10923	35208	34289	19593	37372	33555	37756	36324	22502	28855
мАт10924	29730	27987	17044	28308	26898	28744	28423	15672	20577
мАт10930	25119	25131	16563	28560	25922	28870	28744	16530	21151
мАт10938	29409	27069	17205	30533	24638	29593	29134	15431	21163
мАт10939	32196	30883	18746	33900	28857	32864	32472	18171	23928
мАт10940	35221	35290	21000	35978	30675	36507	34945	21350	25807
мАт10941	32392	31171	20428	34061	28431	33347	33232	19668	26738
мАт10982	24263	22180	12278	23296	19935	23020	23066	10847	14017

МАТ10984	27854	26197	17054	28350	22479	28442	27808	15590	19245
МАТ10985	30214	27854	15488	29443	24827	31054	28936	16219	20787
МАТ10986	27187	25196	15921	28407	23388	27693	27693	16034	19061
МАТ10987	32171	29074	16736	33115	26059	32757	31238	17465	23089
МАТ10988	23858	22160	12659	26095	21793	24822	23949	12910	16208
МАТ10989	17687	17286	11189	19568	16117	22435	19316	12263	14234
МАТ10969	29550	27587	15391	31386	26565	31042	30950	18466	23959
МАТ10970	33154	31662	20184	34739	29182	34991	34704	21047	24625
МАТ10971	29355	28850	16660	28746	24602	30032	29848	16986	21579
МАТ10964	31754	28907	19225	32420	27736	33074	32317	18650	24154
МАТ10965	30812	26863	13707	27139	23351	29618	28034	14133	18864
МАТ10966	30939	27440	17905	30363	25115	30778	29869	16403	23308
МАТ10967	28453	26496	16771	29650	24263	28660	28061	15776	21869
МАТ10954	30410	28281	18394	31284	24677	31768	29604	16626	21270
МАТ10955	29627	28476	16785	30790	24689	31227	31054	17858	22675
МАТ10956	27900	25690	12891	28349	24505	30225	28810	15013	19981
МАТ10957	23411	20615	10566	18692	16725	22560	20258	8451	11989
МАТ10977	16770	14605	8845	13827	12774	15216	16783	6476	9406

Таблица 8 (продолжение)

	SARS			MER S							
	Белок шипов коронавируса человека (рецептор-связывающий домен), Fc кролика (Sino 40150-V31B2)	Белок шипов коронавируса человека (рецептор-связывающий домен, His-маркер) (Sino 40150-V08B2)	Белок субъединицы S1 шипов коронавируса человека His-маркер) (Sino 40150-V08B1)	Белок шипов в MERS-CoV (SAR S-CoV-2) (ECD, AK 1-1297, His-маркер) (Sino 40069 - V08B)	Белок шипов в MERS-CoV (SAR S-CoV-2) S2 (AK 726-1296, His-маркер) (Sino 40070 - V08B)	Белок шипов в MERS-CoV (SAR S-CoV-2) S1 (AK 1-725, His-маркер) (Sino, 40069 - V08H)	Фрагмент белка шипов MERS-CoV (NCoV/новый коронавирус) (RBD, AK 367-606, His-маркер) (Sino 40071-V08B1)	Белок S1 белка шипов MERS-CoV (NCoV/новый коронавирус) (AK 1-725, His-маркер) (Sino 40069-V08B1)	MERS.m Fc (мАт266 3-L1)	MERS.h Fc (мАт266 4-L1)	Bt-MERS.h Fc (мАт266 4-L2)
Супернатант											
мАт10913	35	39	21	20	26	14	34	26	29	28	29
мАт10914	47	39	22	19	28	15	31	23	86	71	49
мАт10915	42	40	21	18	23	15	31	24	86	91	56
мАт10932	34	26	19	14	19	12	26	19	60	49	40
мАт10933	39	31	18	14	19	14	24	17	22	21	26
мАт10934	38	27	18	15	18	10	24	20	77	68	47
мАт10935	37	25	21	15	18	14	25	17	74	67	42
мАт10936	46	36	20	19	21	13	29	20	32	26	32
мАт10937	44	50	21	19	26	14	27	22	21	23	29
мАт10920	59	68	26	24	30	13	39	27	38	35	44
мАт10921	35	31	19	19	19	12	23	18	55	44	39
мАт10922	36	41	18	19	18	9	29	22	20	21	24

МАТ10923	53	66	29	23	36	14	37	25	24	29	39
МАТ10924	41	30	18	17	19	12	29	22	19	22	28
МАТ10930	42	49	19	16	20	14	27	22	29	24	29
МАТ10938	38	36	19	16	19	13	25	20	86	65	46
МАТ10939	38	50	19	16	18	14	27	19	41	27	30
МАТ10940	32	28	20	15	18	11	22	19	18	21	25
МАТ10941	45	37	22	19	22	15	30	24	82	69	47
МАТ10982	30	54	24	17	21	13	29	20	64	60	42
МАТ10984	33	31	22	21	25	13	29	20	237	341	172
МАТ10985	31537	32343	22721	18	28	14	31	22	168	195	159
МАТ10986	39	38	21	15	19	14	27	20	233	286	184
МАТ10987	33	27	22	15	23	15	28	23	196	235	172
МАТ10988	41	67	25	17	29	14	32	25	169	181	130
МАТ10989	47	73	21	16	22	11	24	19	161	206	186
МАТ10969	37	34	20	16	20	11	26	19	21	22	29
МАТ10970	38	25	19	14	16	15	23	17	35	23	28
МАТ10971	32	31	20	15	13	13	20	19	44	29	24
МАТ10964	19999	23855	5186	15	17	13	20	19	19	22	26
МАТ10965	30	23	16	19	20	12	26	23	58	53	43
МАТ10966	35	21	20	16	16	12	24	16	56	53	42
МАТ10967	35	30	21	17	19	13	23	21	61	71	45
МАТ10954	30	26	15	17	16	10	18	21	57	61	41
МАТ10955	36	21	14	15	18	16	20	19	57	48	42
МАТ10956	32	24	16	15	16	13	22	24	58	49	41
МАТ10957	32	22	16	15	18	11	22	19	40	29	28
МАТ10977	36	28	23	17	19	13	24	21	17	20	25

Таблица 9: Сигнал связывания (MFI) белков RBD SARS-CoV-2, Spike S1 SARS-CoV-2, RBD SARS, Spike S1 SARS, SPIKE MERS и RBD MERS с моноклональными антителами против SARS-CoV-2-S (с mFc)

Супернатант	SARS-CoV-2								
	Белок шипов SARS-CoV-2 (RBD) (R319-F541).mm H (мАт10620-L1)	Белок шипов SARS-CoV-2 (RBD) (R319-F541).mm H (мАт10620-L2)	Белок шипов Bt-SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541).mFc (мАт10621-L2)	Белок шипов SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541).mFc (мАт10621-L1)	Белок шипов Bt-SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541).hFc (мАт10622-L2)	Белок шипов SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541).hFc (мАт10622-L1)	SARS-CoV-2 Spike (RBD, Fc-маркер) (Sino 40592-V05H)	Белок шипов SARS-CoV-2 (2019-nCoV) (субъединица S1, Fc-маркер) (Sino 40591-V02H)	Белок шипов SARS-CoV-2 (2019-nCoV) (субъединица S1, Fc-маркер) (Sino 40591-V08H) t
мАт11010	11024	12885	9349	14432	15688	8880	9628	5136	10794
мАт11004	3350	11337	4299	4583	7625	4877	6905	4482	9526
мАт11000	17802	10971	11335	23007	11593	22316	5671	9356	5415
мАт11006	5134	4744	1396	2866	3812	3985	3749	2052	1037
мАт11008	4047	3178	3047	4260	4106	2570	2311	6880	1419
мАт10998	1847	3837	2228	2230	467	1740	2005	724	717
мАт10996	9142	2906	4319	8738	5398	2084	16101	1425	6232
мАт11002	11558	10181	2197	9530	5471	9382	8461	1107	2867

Таблица 9 (продолжение)

	SARS			MERS							
	Белок шипов коронавируса SARS человека (рецептор-связывающий домен), Fc кролика (Sino 40150-V31B2)	Белок шипов коронавируса SARS человека (рецептор-связывающий домен, His-маркер) (Sino 40150-V08B2)	Белок субъединицы S1 шипов коронавируса SARS человека His-маркер) (Sino 40150-V08B1)	Белок шипов MERS-CoV (NCoV/Новой коронавирус) (ECD, AK 1-1297, His-маркер) (Sino 40069-V08B)	Белок шипов MERS-CoV (NCoV/Новой коронавирус) S2 (AK 726-1296, His-маркер) (Sino 40070-V08B)	Белок шипов MERS-CoV (NCoV/Новой коронавирус) S1 (AK 1-725, His-маркер) (Sino 40070-V08H)	Фрагмент белка шипов MERS-CoV (NCoV/Новой коронавирус) (RBD, AK 367-606, His-маркер) (Sino 40071-V08B1)	Белок S1 белка шипов MERS-CoV (NCoV/Новой коронавирус) (AK 1-725, His-маркер) (Sino 40069-V08B1)	MERS mFc (MAT 2663-L1)	MERS R.h Fc (MAT 2664-L1)	Bt-MERS . hFc (MAT 2664-L2)
МАТ11010	18276	16793	7421	7	14	14	19	18	134	28	28
МАТ11004	5524	740	33	15	20	12	26	17	228	24	25
МАТ11000	39	31	18	13	19	9	27	17	384	82	49
МАТ11006	615	667	339	18	17	13	15	18	156	16	24
МАТ11008	120	174	31	18	16	15	20	18	45	19	32
МАТ10998	29	37	16	19	18	14	24	19	48	29	32
МАТ10996	1355	1279	28	13	21	14	26	18	185	132	95
МАТ11002	80	56	31	10	22	13	25	18	288	52	32

Пример 8: Анализ разнообразия антител против SARS-CoV-2-S

[000192] Анализ связывания выполняли для определения профиля связывания антител против SARS-COV-2-S. Для этого анализа антигены иммобилизовали путем аминного связывания, как описано выше для анализа связывания Luminex. Вкратце, приблизительно 9 миллионов микросфер MagPlex для 16 различных областей гранул (Luminex Corp., MagPlex Microspheres, № в каталоге MagPlex MC10000 и MC12000), ресуспендировали встряхиванием на вортексе в 500 мкл 0,1 М NaPO₄, pH 6,2, а затем центрифугировали для удаления супернатанта. Микросферы ресуспендировали в 160 мкл буфера для активации и активировали карбоксилатные группы (-COOH) добавлением 20 мкл 50 мг/мл N-гидроксисукцинимид (NHS, Thermo Scientific, № в каталоге 24525), а затем добавляли 20 мкл 50 мг/мл 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида (EDC, ThermoScientific, № в каталоге 22980) при 25 °C. Через 10 минут pH реакции снижали до 5,0 добавлением 600 мкл 50 мМ MES, pH 5 (буфер для связывания), микросферы встряхивали на вортексе и центрифугировали для удаления супернатанта. Активированные микросферы немедленно смешивали с 500 мкл 20 мкг/мл белка шипов SARS-CoV-2 (RBD)(R319-F541)-mmH в буфера для связывания и инкубировали в течение двух часов при температуре 25 °C. Реакцию связывания останавливали добавлением 50 мкл 1М трис-HCl, pH 8,0, микросферы встряхивали на вортексе, центрифугировали и трижды промывали 1000 мкл PBS. Микросферы ресуспендировали в 250 мкл PBS при 9 млн. микросфер/мл.

[000193] 15 из 16 областей микросфер с белком, присоединенным за счет связывания с амином, модифицировали для количественного анализа связывания следующим образом: микросферы дважды промывали PBS с 5% ДМСО, и 500 мкл химического вещества или фермента растворяли в соответствии с рекомендациями производителя и добавляли в концентрации 10 нМ в микросферы, связанные с амином, описанные выше. Затем реакционную смесь встряхивали на вортексе и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре с вращением. Микросферы 3 раза промывали PBS с 2% БСА. Микросферы ресуспендировали в 1 мл PBS при концентрации 9 миллионов микросфер/мл.

[000194] Модифицированные белком и немодифицированные белком (интактные) микросферы смешивали в количестве 2700 гранул/мл, и вносили в планшеты в количестве 75 мкл микросфер на лунку 96-луночного планшета ProcartaPlex с плоским дном (ThermoFisher, № в каталоге EPX-44444-000) и смешивали с 25 мкл отдельных супернатантов, содержащих антитела против SARS-CoV-2-S. Образцы и микросферы инкубировали в течение двух часов при 25 °C, а затем дважды промывали 200 мкл DPBS с 0,05% Tween 20. Для определения уровней антител, связанных с отдельными микросферами, добавляли 100 мкл 2,5 мкг/мл F(ab')₂ козы против каппа-цепей человека, конъюгированного с R-фикоэритрином (Southern Biotech, № в каталоге 2063-09) в блокирующем буфере (для антител с hFc) или 100 мкл 1,25 мкг/мл AffiniPure F(ab')₂ фрагмента антитела козы против IgG мыши с R-фикоэритрином, специфичного по отношению к F(ab')₂-фрагменту (Jackson ImmunoResearch, №: 115-116-072) в блокирующем буфере (для антител с mFc) или 100 мкл 1,25 мкг/мл антитела против His-маркера,

конъюгированного с R-фикоэритрином (Biolegend, № в каталоге 362603) в блокирующем буфере (для контроля ACE-2, R&D, № в каталоге 933-3H), и инкубировали в течение 30 минут при 25 °C. Через 30 минут образцы дважды промывали 200 мкл промывочного буфера и ресуспендировали в 150 мкл промывочного буфера. Планшеты считывали на FlexMap 3D® (Luminex Corp.) и программном обеспечении Luminex xPonent® версии 4.3 (Luminex Corp.).

[000195] Результаты количественного анализа связывания Luminex показаны в таблице 10 в виде сигнала медианной интенсивности флуоресценции (MFI). Для определения кластеров данные нормировали по интактному белку (немодифицированные микросферы) и группировали в кластеры. 46 антител против SARS-CoV-2 классифицировали в 9 кластерах с 2 или более антителами, а 11 антител классифицировали как отдельные узлы. Кластеры присваивали на основе полученных результатов иерархической кластеризации и дендрограммы. Эти результаты показывают, что 46 супернатантов антител против SARS-CoV-2-S обладали различными характеристиками и профилями связывания, что позволяет предположить, что данная коллекция антител связывалась с различными эпитопами на белке шипов SARS-CoV-2.

Таблица 10: Сигнал связывания (MFI) и кластерная принадлежность моноклональных антител против SARS-CoV-2-S к RBD.mmH SARS-CoV-2-S (немодифицированных и химически или ферментативно модифицированных)

Образец	КЛАСТЕР	НЕМОДИ ФИЦИРОВ АННЫЕ - белок шипов SARS-CoV- 2 (RBD)(R319 - F541).mmH	MOD1 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD2 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD3 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD4 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD5 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD6 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD7 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H
ACE2 человека (10 нМ)	1	5727	873	5119	1852	5106	202	5408	5013
ACE2 человека (100 нМ)	1	10681	1447	10320	2260	9661	559	9593	8624
ACE2 человека (50 нМ)	1	9269	991	8238	2185	7707	391	7859	7577
мАт10969	3	28551	54	24177	425	26049	3546	20577	23878
мАт10965	3	28080	38	21996	135	25727	3250	22419	24062
мАт10913	4	31694	102	28389	23270	29344	5018	28738	27854
мАт10920	4	35534	162	26783	28090	32185	7105	32942	30958
мАт10923	4	38711	153	32305	33866	36082	7540	35335	33924
мАт10930	4	29502	110	21579	21533	27843	6195	26600	25103
мАт10940	4	38871	94	34337	33453	36690	7817	36128	34544
мАт10989	4	19671	49	16697	18260	15785	3369	19568	15206
мАт11006	4	2044	30	705	3773	2553	517	2024	2503
мАт10934	5	33057	81	27716	25092	31664	6648	30801	29926
мАт10924	5	39205	118	32707	29366	36507	6378	35565	34210
мАт10939	5	33647	62	24895	26392	31390	6276	31275	29594
мАт10988	5	23009	68	15983	14842	20830	3536	20176	19499
мАт10957	5	20879	52	15728	19383	19993	3582	17727	17989
мАт10914	6	36047	143	32282	26967	34199	7162	32787	31823

MAт10915	6	36690	159	32489	26427	33545	9731	33568	31823
MAт10932	6	34024	191	28833	28557	31560	9946	31123	29765
MAт10938	6	34522	174	28465	19403	31252	8932	29225	30918
MAт10941	6	36369	140	31868	26129	33637	9455	33154	31478
MAт10984	6	25759	109	22445	20925	24747	6880	23630	23895
MAт10985	6	27394	99	24286	22986	26151	5519	25874	25023
MAт10986	6	25414	118	20868	20557	23619	6591	23066	22813
MAт10977	6	16980	54	14108	16590	15851	3505	14528	12779
MAт10933	7	35267	69	30617	5243	32665	6161	32930	31043
MAт10982	7	27505	80	20338	6650	25051	4585	24178	23770
MAт10987	7	29327	54	25311	2235	27981	4110	27095	25690
MAт10935	8	31883	81	28683	12724	30329	6457	27417	27785
MAт10970	8	32271	94	26863	22547	30537	7029	27679	28333
MAт10971	8	27415	106	23890	22184	27850	6869	25337	25164
MAт10964	8	29963	122	23580	23419	27896	7085	27483	25968
MAт10921	9	31657	91	28216	18123	30441	6821	28629	28756
MAт10966	9	29489	85	22836	19866	25736	5869	24217	26013
MAт10967	9	26784	107	20787	13760	25104	6192	21329	23434
MAт10954	9	28476	74	21915	19038	26186	5948	25299	24332
MAт10955	9	28637	39	24585	21155	27912	4141	23849	24862
MAт10996	S1	3403	20	5275	164	5562	488	3042	9125
MAт10937	S2	33561	94	24890	104	31164	5904	30327	28675
MAт10936	S3	32919	136	26818	312	31261	7856	31008	29293
MAт10922	S4	33183	102	25384	1107	31348	5822	31313	29386
MAт11002	S5	9881	16	3348	155	8615	153	9542	7562
MAт10956	S6	24562	29	21685	19337	23769	2275	19422	21961
MAт11010	S7	6388	18	4155	5441	8832	384	7444	5766
MAт11008	S8	7096	26	926	1525	2776	198	2750	1007
MAт10998	S9	2557	18	247	1336	1524	104	2937	723
MAт11004	S10	6514	18	2205	604	3566	1155	4522	2229
MAт11000	S11	16670	19	3416	12787	13493	2009	17756	12409

Таблица 10 (продолжение)

Образец	КЛАСТЕР	MOD8 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD9 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD10 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD11 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD12 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD13 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD14 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H	MOD15 - белок шипов SARS- CoV-2 (RBD)(R3 19- F541).mm H
ACE2 человека (10 нМ)	1	36	4500	4091	4618	4505	5094	4743	3173
ACE2 человека (100 нМ)	1	36	6212	7922	8440	8957	8948	7927	5370
ACE2 человека (50 нМ)	1	35	5518	6447	7064	7233	7600	7112	4407
МАТ10969	3	154	18918	24407	22409	27036	24269	23672	14196
МАТ10965	3	110	19061	22355	21414	25635	23144	23156	14072
МАТ10913	4	15939	28645	27110	28878	31159	28971	27784	26272
МАТ10920	4	17228	32758	31463	31910	35144	32185	32323	29949
МАТ10923	4	20961	34187	33809	36323	38596	35381	33338	33131
МАТ10930	4	10235	23744	24516	26738	27958	26968	25126	23951
МАТ10940	4	14572	35967	34704	36070	39285	35462	34922	33614
МАТ10989	4	6136	17756	15530	16838	15137	17411	18100	15946
МАТ11006	4	299	2442	3749	1076	4622	2818	3344	3568
МАТ10934	5	6410	31261	30364	30709	32873	30502	28591	27785
МАТ10924	5	6594	32856	33797	35875	38424	34647	33476	31524
МАТ10939	5	4808	28465	29444	30699	33475	30596	29721	27129
МАТ10988	5	2980	18329	19660	20692	21770	20130	18948	16558
МАТ10957	5	2171	17357	19487	18596	21247	18757	17810	16081
МАТ10914	6	5475	31226	31467	33235	35175	32626	31100	29217
МАТ10915	6	9277	33442	31984	32902	35462	31937	32397	30009
МАТ10932	6	9711	30122	29074	30433	33379	30283	29880	26795

MAт10938	6	7536	28109	30308	31264	33394	30814	30538	27751
MAт10941	6	7518	29802	31421	33958	35290	32925	31777	29159
MAт10984	6	3527	20212	22065	22318	26163	23227	22283	19349
MAт10985	6	6821	23642	23572	24654	27394	24677	24493	20787
MAт10986	6	2838	20672	21766	21720	25207	23400	22214	19694
MAт10977	6	4005	14193	12616	13320	16332	13632	14312	13136
MAт10933	7	1556	27705	29926	30801	34427	30409	30525	24367
MAт10982	7	1065	20361	23131	23247	26412	24027	23549	16765
MAт10987	7	1444	25621	25345	26335	29995	27049	26082	22871
MAт10935	8	2534	26151	27958	28752	30847	28522	27452	24816
MAт10970	8	1968	25233	27793	27610	31869	29871	26909	23775
MAт10971	8	1598	22587	25646	24384	27391	25761	24774	19590
MAт10964	8	2414	24740	25658	26439	29113	27243	26783	22405
MAт10921	9	941	23674	27586	27367	30969	28480	28331	21220
MAт10966	9	833	21800	24332	24977	27440	26554	24585	18580
MAт10967	9	574	19521	22352	22997	25506	22641	22836	17387
MAт10954	9	929	22237	24516	23457	28200	24897	24539	19717
MAт10955	9	1141	22191	24805	23688	27210	25575	24677	18944
MAт10996	S1	28	8940	6336	6789	6229	5821	3484	1312
MAт10937	S2	1231	27597	27092	29937	32116	29661	29386	20543
MAт10936	S3	2916	29074	28775	30813	31711	29189	28522	21674
MAт10922	S4	2248	29845	28629	30373	32931	30625	28962	23399
MAт11002	S5	17	4144	6415	6790	8465	7688	6804	2016
MAт10956	S6	331	16954	21282	21524	26646	21547	22767	15077
MAт11010	S7	162	5567	6718	9557	12522	5287	5898	4915
MAт11008	S8	60	2350	2759	2824	3301	2745	2130	2831
MAт10998	S9	85	1611	2260	1206	2513	2186	727	1029
MAт11004	S10	71	1465	12665	10667	5925	5531	11578	1144
MAт11000	S11	56	14151	19230	17204	21718	17952	17117	5151

Пример 9: Кинетика связывания моноклональных антител против SARS-CoV-2-S на Biacore

[000196] Константы равновесной диссоциации (K_D) различных антител SARS-CoV-2-S из первичных супернатантов клеток CHOt или из гибридом определяли с использованием биосенсора Biacore T200/Biacore 8K на основе поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени. Все исследования связывания выполняли в рабочем буфере 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25 °C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 вначале модифицировали путем присоединения через амин моноклональным антителом мыши против Fc человека или моноклональным антителом кролика против Fc μ мыши (GE, № в каталоге BR-1008-38) для захвата антител против SARS-CoV-2. Исследования связывания выполняли на примере внеклеточного домена RBD SARS-CoV-2 человека, экспрессируемого с С-концевым мус-мус-гексагистиридиновым маркером (RBD-MMH SARS-COV-2), внеклеточного домена RBD SARS-CoV-2, экспрессируемого с С-концевым IgG2a мыши (RBD-mFc SARS-CoV-2) или внеклеточного домена RBD SARS-CoV-2, экспрессируемого с С-концевым IgG1 человека (RBD-hFc SARS-CoV-2). Однократные концентрации RBD-MMH SARS-COV-2 (100 нМ); RBD-mFc SARS-CoV-2 (50 нМ) или RBD-hFc SARS-CoV-2 (50 нМ) в рабочем буфере HBS-ET вводили в течение 1,5 минут при скорости потока 30 мкл/мин, диссоциацию различных реагентов RBD SARS-CoV-2, связанных с антителом, отслеживали в течение 2 минут в рабочем буфере HBS-ET. В конце каждого цикла поверхность для захвата антител против RBD SARS-CoV-2 регенерировали с использованием 10-секундной инъекции 20 mM фосфорной кислоты для поверхности с моноклональным антителом мыши против Fc человека или 40-секундной инъекции 10 mM буфера глицин-HCl, pH 1,5, для поликлонального антитела кролика против Fc μ мыши. Константы скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в реальном времени моделью связывания 1:1 с ограничением массопереноса с использованием программного обеспечения BiaEvaluation версии 3.1 или программного обеспечения Biacore Insight Evaluation версии 2.0 или программного обеспечения для аппроксимации кривых. Константу равновесия диссоциации связывания (K_D) и период полураспада диссоциации ($t^{1/2}$) рассчитывали на основе скоростей кинетики как:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t^{1/2} (\text{мин}) = \frac{n(2)}{60 * k_d}$$

[000197] Параметры кинетики связывания для различных моноклональных антител против SARS-CoV-2, связывающихся с различными реагентами RBD SARS-COV-2 согласно настоящему изобретению при 25 °C, показаны в таблицах 11 и 12.

Таблица 11: Кинетика связывания RBD-MMH SARS-COV-2 с моноклональными антителами против SARS-CoV-2 при 25 °C

Супернатант	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывание 50 нМ Аг (ЕО)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
мАт10913	2010	381	4,91E+05	2,28E-02	4,64E-08	0,5
мАт10914	3169	174	3,49E+05	1,36E-02	3,89E-08	0,8
мАт10915	824	109	8,85E+04	3,18E-04	3,59E-09	36,3
мАт10932	2261	326	8,50E+04	1,26E-04	1,48E-09	92
мАт10933	1414	428	1,05E+06	4,08E-03	3,88E-09	2,8
мАт10934	2918	981	1,01E+06	4,35E-03	4,32E-09	2,7
мАт10935	3293	694	2,11E+05	3,99E-03	1,89E-08	2,9
мАт10936	2491	717	3,03E+05	8,81E-04	2,91E-09	13,1
мАт10937	1846	504	3,81E+05	5,73E-03	1,50E-08	2
мАт10920	1295	234	6,22E+05	2,20E-02	3,54E-08	0,5
мАт10921	1024	141	9,52E+04	4,99E-04	5,24E-09	23,1
мАт10922	2395	786	3,91E+05	2,00E-03	5,11E-09	5,8
мАт10923	1278	322	2,94E+05	6,04E-03	2,06E-08	1,9
мАт10924	766	166	1,97E+05	3,65E-03	1,85E-08	3,2
мАт10930	3137	328	8,90E+04	1,85E-03	2,08E-08	6,2
мАт10938	2167	180	6,60E+04	3,48E-04	5,28E-09	33,2
мАт10939	1505	241	1,69E+05	3,38E-03	2,00E-08	3,4
мАт10940	2149	698	3,34E+05	2,38E-03	7,15E-09	4,9

МАТ10941	1811	288	9,85E+04	5,17E-04	5,25E-09	22,3
МАТ10982	1096	188	1,32E+05	2,71E-03	2,06E-08	4,3
МАТ10984	1654	387	1,55E+05	3,70E-04	2,39E-09	31,2
МАТ10985	1974	749	9,41E+05	1,45E-03	1,54E-09	8
МАТ10986	1560	524	3,21E+05	2,56E-04	7,97E-10	45,2
МАТ10987	1242	356	4,50E+05	1,04E-02	2,32E-08	1,1
МАТ10988	1227	291	1,27E+06	3,52E-02	2,77E-08	0,3
МАТ10989	692	257	1,60E+06	3,14E-03	1,96E-09	3,7
МАТ10969	2200	427	1,80E+05	4,71E-03	2,61E-08	2,5
МАТ10970	1865	438	1,37E+05	7,99E-04	5,82E-09	14,4
МАТ10971	1482	358	1,68E+05	4,49E-04	2,67E-09	25,8
МАТ10964	1208	460	1,06E+06	7,56E-04	7,14E-10	15,3
МАТ10965	1046	168	1,19E+05	2,73E-03	2,28E-08	4,2
МАТ10966	1422	343	1,57E+05	4,40E-04	2,81E-09	26,3
МАТ10967	1421	175	1,12E+05	1,08E-04	9,66E-10	106,9
МАТ10954	1150	338	2,34E+05	4,05E-04	1,73E-09	28,5
МАТ10955	1032	199	1,38E+05	2,69E-03	1,95E-08	4,3
МАТ10956	1303	184	2,02E+05	5,31E-03	2,62E-08	2,2
МАТ10957	736	163	1,34E+05	3,15E-04	2,35E-09	36,7
МАТ10977	221	57	2,33E+05	7,17E-04	3,08E-09	16,1
МАТ11010	1027	108	3,35E+05	1,48E-03	4,42E-09	7,8
МАТ11004	1111	161	1,88E+05	3,12E-03	1,66E-08	3,7

мАТ11000	381	16	1,40E+05	2,41E-02	1,72E-07	0,5
мАТ11006	1118	49	8,97E+04	3,67E-04	4,10E-09	31,5
мАТ11008	887	56	6,73E+04	4,00E-03	5,94E-08	2,9
мАТ10998	1155	69	1,95E+05	2,28E-02	1,17E-07	0,5
мАТ10996	616	28	1,53E+05	1,10E-02	7,18E-08	1,1
мАТ11002	1070	8	3,21E+05	2,54E-02	7,93E-08	0,5

Таблица 12: Кинетика связывания RBD-mFc SARS-CoV-2 или RBD-hFc SARS-CoV-2 с моноклональными антителами против SARS-CoV-2-S при 25 °C

Супернатант	Уровень захвата мАТ (ЕО)	Связывание 50 нМ Аг (ЕО)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
мАТ10913	961	575	6,23E+05	1,52E-04	2,44E-10	76,1
мАТ10914	1467	313	1,83E+05	1,00E-05*	5,47E-11	1155*
мАТ10915	392	141	2,81E+05	1,00E-05*	3,56E-11	1155*
мАТ10932	1060	372	2,42E+05	1,00E-05*	4,13E-11	1155*
мАТ10933	681	465	1,23E+06	2,12E-04	1,73E-10	54,4
мАТ10934	1401	949	1,41E+06	1,17E-04	8,32E-11	98,3
мАТ10935	1667	830	3,83E+05	1,00E-05*	2,61E-11	1155*
мАТ10936	1171	699	6,52E+05	1,00E-05*	1,53E-11	1155*
мАТ10937	904	575	6,39E+05	7,28E-05	1,14E-10	158,7
мАТ10920	617	357	7,02E+05	2,92E-04	4,16E-10	39,5
мАТ10921	489	170	2,66E+05	1,00E-05*	3,75E-11	1155*

МАТ10922	1286	828	7,19E+05	2,42E-05	3,36E-11	478,2
МАТ10923	613	362	6,51E+05	2,83E-05	4,35E-11	407,7
МАТ10924	465	223	3,67E+05	8,13E-05	2,22E-10	142,1
МАТ10930	2156	449	2,32E+05	1,00E-05*	4,31E-11	1155*
МАТ10938	1363	333	3,11E+05	1,00E-05*	3,22E-11	1155*
МАТ10939	904	324	2,99E+05	1,15E-05	3,87E-11	1004,3
МАТ10940	1508	893	5,61E+05	2,86E-05	5,09E-11	403,8
МАТ10941	1132	371	2,60E+05	1,00E-05*	2,15E-11	1155*
МАТ10982	529	236	3,10E+05	1,69E-05	5,44E-11	683,6
МАТ10984	1213	573	4,02E+05	1,00E-05*	2,49E-11	1155*
МАТ10985	1463	1040	1,09E+06	1,27E-05	1,17E-11	910,9
МАТ10986	1168	752	6,33E+05	1,00E-05*	1,58E-11	1155*
МАТ10987	902	632	8,20E+05	1,70E-04	2,08E-10	67,8
МАТ10988	892	628	1,24E+06	3,46E-04	2,79E-10	33,4
МАТ10989	505	378	2,07E+06	9,30E-05	4,50E-11	124,2
МАТ10969	1658	738	3,05E+05	1,51E-05	4,96E-11	764
МАТ10970	1370	661	3,48E+05	1,00E-05*	2,88E-11	1155*
МАТ10971	1081	556	3,95E+05	1,00E-05*	2,53E-11	1155*
МАТ10964	875	651	1,43E+06	1,00E-05*	7,00E-12	1155*
МАТ10965	762	322	2,97E+05	1,00E-05*	3,36E-11	1155*
МАТ10966	921	430	4,02E+05	1,00E-05*	2,49E-11	1155*
МАТ10967	945	355	3,99E+05	1,00E-05*	2,51E-11	1155*

мАТ10954	734	414	5,77E+05	1,00E-05*	1,73E-11	1155*
мАТ10955	634	292	3,96E+05	2,34E-05	5,92E-11	493,6
мАТ10956	842	339	3,74E+05	1,48E-04	3,95E-10	78
мАТ10957	449	209	3,58E+05	1,00E-05*	2,79E-11	1155*
мАТ10977	161	102	5,56E+05	1,04E-04	1,87E-10	110,9
мАТ11010	1014	163	4,24E+05	1,00E-05*	2,36E-11	1155*
мАТ11004	1101	241	3,46E+05	6,63E-05	1,91E-10	174,2
мАТ11000	380	61	4,38E+05	1,83E-03	4,17E-09	6,3
мАТ11006	1112	75	1,88E+05	1,00E-05*	5,32E-11	1155*
мАТ11008	872	110	1,61E+05	1,15E-04	7,15E-10	100,4
мАТ10998	1140	227	3,30E+05	5,21E-04	1,58E-09	22,2
мАТ10996	629	83	2,88E+05	9,32E-04	3,24E-09	12,4
мАТ11002	1068	60	2,69E+05	4,49E-03	1,67E-08	2,6

*: Расчетное значение, основанное на пределе измерения константы скорости диссоциации и периода полураспада диссоциации в экспериментальных условиях.

Пример 10: Исследование моноклональных антител против SARS-CoV-2-S с помощью твердофазного ИФА блокирования

[000198] Анализ блокирования на основе твердофазного ИФА разработали для определения способности антител против SARS-CoV2-S блокировать связывание рецепторсвязывающего домена белка шипов SARS-CoV-2 (RBD) с ангиотензин-превращающим ферментом 2 человека (hACE2).

[000199] Белок SARS-CoV-2, использованный в экспериментах, состоял из фрагмента рецепторсвязывающего домена (RBD) белка шипов SARS-CoV-2 (аминокислоты от Arg319 до Phe541), экспрессированного с С-концевым Fc-фрагментом IgG1 человека (RBD-hFc SARS-CoV-2; см. номер доступа в NCBI MN908947.3). Белок ACE2 человека, используемый в экспериментах, приобрели в R&D systems, он состоял из аминокислот от глутамин-18 до серина-740 с С-концевым 10X-гистиридиновым маркером (hACE2-His; номер доступа в NCBI Q9BYF1).

[000200] Эксперименты выполняли в соответствии со следующей процедурой. Моноклональное антитело против пента-His (Qiagen) наносили на 96-луночный

титрационный микропланшет в концентрации 1 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4 °С. Рецептор hACE2-His добавляли в концентрации 0,2 мкг/мл в PBS и связывали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем блокировали сайты неспецифического связывания с использованием 0,5% (мас./об.) раствора БСА в PBS. В других титрационных микропланшетах постоянное количество, равное 10 пМ или 15 пМ (как указано в таблице 13) белка RBD-hFc SARS-CoV-2 связывали с антителами, разбавленными PBS+0,5% БСА в соотношении 1:10 или 1:20. Эти комплексы антитело-белок после часового инкубирования переносили на титрационный микропланшет с иммобилизованным hACE2-His. После 1,5 часов инкубирования при комнатной температуре лунки промывали, а связанный с планшетом белок RBD-hFc SARS-CoV-2 обнаруживали с помощью антитела козы против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ) (Jackson). Затем планшеты проявляли с использованием раствора субстрата ТМБ (BD Biosciences, № в каталоге 555214) в соответствии с рекомендациями производителя, и измеряли оптическую плотность при 450 нм на планшет-риде Victor X5.

[000201] Данные анализировали путем расчета % снижения сигнала фиксированной концентрации RBD-hFc SARS-CoV-2-S в присутствии антитела по сравнению с отсутствием антитела. В расчетах сигнал связывания образца с постоянным уровнем RBD-hFc SARS-CoV-2-S без присутствия антитела для каждого планшета рассматривали как 100% связывание или 0% блокирование; исходный сигнал образца чистой среды без RBD-hFc SARS-CoV-2 рассматривали как 0% связывание или 100% блокирование.

[000202] Способность антител против SARS-CoV-2-S блокировать связывание RBD SARS-CoV-2-S с ACE2 человека оценивали с использованием формата твердофазного ИФА блокирования. Одноточечное блокирование связывания 10 пМ или 15 пМ RBD-hFc SARS-CoV-2-S с hACE2-His супернатантом анализируемого антитела, представленное на примере антитела против His-маркера, нанесенного на 96-луночные титрационные микропланшеты, обнаруживали с помощью антитела против hFc, конъюгированного с ПХ.

[000203] Сводные результаты блокирования по трем анализам приведены в таблице 13. Показаны сигнал связывания SARS-CoV-2-S (450 нм) и рассчитанный % блокирования. Для экспериментальных образцов наблюдали диапазон значений блокирования. Для образцов с указанием "Н/П" в столбцах 6 и 7 значение с поправкой на планшет включено в столбцы 4 и 5, поскольку данные согласуются с одним переключением планшета для этих образцов. 43 из 46 супернатантов антител блокировали более 50% связывания RBD-hFc SARS-CoV-2-S с ACE2 человека, иммобилизованным на планшете, причем 16 из них блокировали > 90% сигнала.

Таблица 13: Результаты твердофазного ИФА блокирования

Супернатант	Фиксированная концентрация RBD SARS-CoV-2	Разбавление супернатанта	Значение связывания RBD-hFc SARS-CoV-2 с ACE2,	% блокирования RBD-hFc SARS-CoV-2 с ACE2,	Связывание RBD-hFc SARS-CoV-2 с ACE2, представ	% блокирования RBD-hFc SARS-CoV-2 с ACE2,
-------------	---	--------------------------	--	---	--	---

			представ ленным с HIS- маркero м, с поправко й на планшет (погл. при 450 нм)	представ ленным с HIS- маркero м, с поправко й на планшет (погл. при 450 нм)	ленным с HIS- маркero м (погл. при 450 нм)	представ ленным с HIS- маркero м (погл. при 450 нм)
мАТ10913	15 пМ	1:10	0,206	80,5	0,206	80,5
мАТ10914	15 пМ	1:10	0,326	59,1	0,326	59,1
мАТ10915	15 пМ	1:10	0,171	89,7	0,171	89,7
мАТ10932	15 пМ	1:10	0,254	57,3	0,254	57,3
мАТ10933	15 пМ	1:10	0,158	96,3	0,158	96,3
мАТ10934	15 пМ	1:10	0,209	78	0,209	78
мАТ10935	15 пМ	1:10	0,238	69,4	0,238	69,4
мАТ10936	15 пМ	1:10	0,234	70,6	0,234	70,6
мАТ10937	15 пМ	1:10	0,176	88,1	0,176	88,1
мАТ10920	15 пМ	1:10	0,601	-56,5	0,601	-56,5
мАТ10921	15 пМ	1:10	0,192	82,7	0,192	82,7
мАТ10922	15 пМ	1:10	0,181	86,4	0,181	86,4
мАТ10923	15 пМ	1:10	0,237	43,6	0,237	43,6
мАТ10924	15 пМ	1:10	0,175	78,2	0,175	78,2
мАТ10930	15 пМ	1:10	0,241	42,5	0,241	42,5
мАТ10938	15 пМ	1:10	0,169	87,5	0,169	87,5
мАТ10939	15 пМ	1:10	0,204	65,6	0,204	65,6

мАТ10940	15 пМ	1:10	0,152	95,2	0,152	95,2
мАТ10941	15 пМ	1:10	0,174	97,2	0,174	97,2
мАТ10982	15 пМ	1:10	0,195	83,5	0,195	83,5
мАТ10984	15 пМ	1:10	0,166	96,3	Н/П	Н/П
мАТ10985	15 пМ	1:10	0,162	97	Н/П	Н/П
мАТ10986	15 пМ	1:10	0,158	97,8	Н/П	Н/П
мАТ10987	15 пМ	1:10	0,243	81,8	Н/П	Н/П
мАТ10988	15 пМ	1:10	0,244	84	0,244	84
мАТ10989	15 пМ	1:10	0,155	101,8	0,155	101,8
мАТ10969	15 пМ	1:10	0,221	87,8	0,221	87,8
мАТ10970	15 пМ	1:10	0,164	97,7	0,164	97,7
мАТ10971	15 пМ	1:10	0,17	96,7	0,17	96,7
мАТ10964	15 пМ	1:10	0,169	96,9	0,169	96,9
мАТ10965	15 пМ	1:10	0,158	98,8	0,158	98,8
мАТ10966	15 пМ	1:10	0,157	94,2	0,157	94,2
мАТ10967	15 пМ	1:10	0,145	97,9	0,145	97,9
мАТ10954	15 пМ	1:10	0,147	97,3	0,147	97,3
мАТ10955	15 пМ	1:10	0,162	92,7	0,162	92,7
мАТ10956	15 пМ	1:10	0,189	84,5	0,189	84,5
мАТ10957	15 пМ	1:10	0,154	95,1	0,154	95,1
мАТ10977	15 пМ	1:10	0,315	71,5	0,315	71,5
мАТ11010	10 пМ	1:20	0,186	82,1	0,186	82,1

мАт11004	10 пМ	1:20	0,211	70	0,211	70
мАт11000	10 пМ	1:20	0,173	72,7	0,173	72,7
мАт11006	10 пМ	1:20	0,236	58	0,236	58
мАт11008	10 пМ	1:20	0,213	69,1	0,213	69,1
мАт10998	10 пМ	1:20	0,185	61,6	0,185	61,6
мАт10996	10 пМ	1:20	0,295	-18,1	0,295	-18,1
мАт11002	10 пМ	1:20	0,177	79,2	0,177	79,2

Пример 11: Картирование эпитопов моноклональных антител против SARS-CoV-2-S на гликопротеин шипов с помощью масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом

[000204] Масс-спектрометрию с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS) выполняли для определения аминокислотных остатков рецепторсвязывающего домена белка шипов SARS-CoV-2 (RBD (аминокислоты R319-F541)), взаимодействующих с мАт10989, мАт10987, мАт10934, мАт10933, мАт10920, мАт10922, мАт10936, мАт10954, мАт10964, мАт10977, мАт10984 и мАт10986. Общее описание HDX-MS представлено, например, в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; м Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[000205] Эксперименты HDX-MS выполняли на комплексной платформе для HDX/MS, состоящей из системы Leaptac HDX PAL для мечения дейтерием и остановки реакции, Waters Acquity I-Class (система для работы с двухкомпонентными растворителями) для расщепления и загрузки образцов, Waters Acquity I-Class (система для работы с двухкомпонентными растворителями) для аналитического градиента и масс-спектрометра Thermo Q Exactive HF для измерения массы пептидов.

[000206] Раствор для мечения получали в виде буфера PBS в D₂O при рD 7,0 (10 мМ фосфатного буфера, 140 мМ NaCl и 3 мМ KCl, что эквивалентно рН 7,4 при 25 °C). Для мечения дейтерием 10 мкл белка RBD или белка RBD, предварительно смешанного с каждым из 12 антител, перечисленных выше, инкубировали при 20°C с 90 мкл раствора для мечения D₂O в различные моменты времени в двух повторностях. Для мАт10989, мАт10987, мАт10934 и мАт10933 моменты времени составляли 0 мин (недейтерированный контроль), 5 мин и 10 мин. Для мАт10920, мАт10922, мАт10936, мАт10954, мАт10964, мАт10977, мАт10984 и мАт10986 моменты времени составляли 0 мин (недейтерированный контроль) и 10 мин. Реакцию дейтерирования останавливали добавлением 90 мкл предварительно охлажденного буфера для остановки реакции (0,5 М ТСЕР-НСl, 4 М мочевины и 0,5% муравьиная кислота) к каждому образцу в течение 90 секунд инкубирования при 20 °C. После остановки реакции образцы вводили в систему Leaptac

HDX PAL для расщепления пепсином/протеазой XIII в реальном времени. Расщепленные пептиды улавливали колонкой C18 (2,1 мм x 5 мм, Waters) и разделяли другой колонкой C18 (2,1 мм x 50 мм, Waters) при -5°C с 20-минутным градиентом (для мАт10989, мАт10987, мАт10934 и мАт10933) или 10-минутным градиентом (для мАт10920, мАт10922, мАт10936, мАт10954, мАт10956, мАт10964, мАт10977 и мАт10984) от 0% до 90% раствора подвижной фазы В (раствор подвижной фазы А: 0,5% муравьиная кислота и 4,5% ацетонитрила в воде, раствор подвижной фазы В: 0,5% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Элюированные пептиды анализировали посредством масс-спектрометрии на Q Exactive HF в режиме ЖХ-МС/МС или ЖХ-МС.

[000207] Данные ЖХ-МС/МС для образца недейтерированного белка RBD сравнивали с базой данных, включающей аминокислотные последовательности белка RBD, пепсина, протеазы XIII и их обратные последовательности с использованием поискового алгоритма Byonic (Protein Metrics). Параметры поиска были установлены по умолчанию с использованием неспецифичного ферментативного расщепления и гликозилирования белков человека в качестве общей вариабельной модификации. Затем список выявленных пептидов импортировали в программное обеспечение HDExaminer (версия 3.1) для расчета поглощения дейтерия (D-поглощения) и значений разности в процентном содержании дейтерия ($\Delta\%D$) для всех дейтерированных образцов. Разность процентного содержания дейтерия ($\Delta\%D$) рассчитывали следующим образом.

Разность поглощения дейтерия (ΔD) = D-поглощение (RBD-мАт) - D-поглощение (только RBD)

$$\text{Разность процентного поглощения дейтерия } (\Delta\%D) = \frac{\Delta D}{\text{Теоретическое максимальное D — поглощение пептида}} \times 100$$

[000208] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10989 выявили в общей сложности 190 пептидов RBD, что составляло 86,06% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 467-513 (DISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL) (SEQ ID NO: 835) RBD, были значимо защищены мАт10989.

[000209] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10987 выявили в общей сложности 187 пептидов RBD, что составляло 86,06% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 432-452 (CVIAWNSNLDSKVGGNYNYL) (SEQ ID NO: 836) RBD, были значимо защищены мАт10987.

[000210] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10934 выявили в общей сложности 188 пептидов RBD, что составляло 86,06% покрытия

последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 432-452 (CVAWNSNNLDSKVGGNYNYL) (SEQ ID NO: 836), 467-474 (DSTEIYQ) (SEQ ID NO: 837) и 480-513 (CNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL) (SEQ ID NO: 838) RBD, были значимо защищены мАт10934.

[000211] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10933 выявили в общей сложности 188 пептидов RBD, что составляло 86,06% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 467-510 (DSTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRV) (SEQ ID NO: 839) RBD, были значимо защищены мАт10933.

[000212] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10920 выявили в общей сложности 75 пептидов RBD, что составляло 83,27% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 471-486 (EIYQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO: 840) и 491-515 (PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL) (SEQ ID NO: 841) RBD, были значимо защищены мАт10920.

[000213] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10922 выявили в общей сложности 86 пептидов RBD, что составляло 87,25% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 432-452 (CVAWNSNNLDSKVGGNYNYL) (SEQ ID NO: 836) RBD, были значимо защищены мАт10922.

[000214] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10936 выявили в общей сложности 81 пептид RBD, что составляло 82,07% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 351-360 (YAWNKRKISN) (SEQ ID NO: 842), 432-452 (CVAWNSNNLDSKVGGNYNYL) (SEQ ID NO: 836), 467-486 (DSTEIYQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO: 843) и 491-513 (PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL) (SEQ ID NO: 844) RBD, были значимо защищены мАт10936.

[000215] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10954 выявили в общей сложности 84 пептида RBD, что составляло 87,25% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 400-422 (FVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYN) (SEQ ID NO: 845), 453-486 (YRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO: 846) и 490-515 (FPLQSYGFQPTNGVGYPYRVVLSF) (SEQ ID NO: 847) RBD, были значимо защищены мАт10954.

[000216] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10964 выявили в общей сложности 109 пептидов RBD, что составляло 83,67% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 401-424 (VIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYK) (SEQ ID NO: 848) и 471-513 (EIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYPYRVVVL) (SEQ ID NO: 849) RBD, были значимо защищены мАт10964.

[000217] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10977 выявили в общей сложности 78 пептидов RBD, что составляло 87,25% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 351-364 (YAWNRRKISNCVAD) (SEQ ID NO: 850) и 471-486 (EIQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO: 840) RBD, были значимо защищены мАт10977.

[000218] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10984 выявили в общей сложности 88 пептидов RBD, что составляло 87,25% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 400-422 (FVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYN) (SEQ ID NO: 845) и 453-486 (YRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO: 846) RBD, были значимо защищены мАт10984.

[000219] Как для RBD по отдельности, так и для RBD в комплексе с образцами мАт10986 выявили в общей сложности 84 пептида RBD, что составляло 87,25% покрытия последовательности RBD. Любой пептид, демонстрировавший снижение поглощения дейтерия на 5% или более (т.е. значение $\Delta\%D$ менее -5%, например, -6%, -10% и так далее) при связывании мАт, определяли как значимо защищенный. Пептиды, соответствующие аминокислотам 400-422 (FVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYN) (SEQ ID NO: 845), 453-486 (YRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO: 846) и 490-515 (FPLQSYGFQPTNGVGYPYRVVLSF) (SEQ ID NO: 847) RBD, были значимо защищены

мАт10986.

[000220] В целом большинство проанализированных нейтрализующих антител связывались с RBD, перекрывая остатки RBD, составляющие область взаимодействия с ACE2; кроме того, антитела можно группировать на основе картины их контакта с поверхностью RBD, как показано на фигуре 15. Вышеприведенные сводные данные также представлены в таблицах 14-25.

Таблица 14: Пептиды рецепторсвязывающего домена (RBD) белка шипов со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАт по сравнению с RBD самим по себе

RBD	5-мин инкубирование			10-мин инкубирование			
	RBD- мАт10989	RBD	ΔD	RBD- мАт10989	RBD	ΔD	
	D- поглощение	D- поглощение		D- поглощение	D- поглощение		
Остатки							Δ% D
467-474	2,67	3,16	0,49	2,53	3,17	0,64	-10,5
470-473	0,48	0,98	0,50	0,47	0,98	0,51	-28,0
470-474	0,99	1,46	0,47	0,99	1,44	0,45	-16,9
471-474	0,51	0,89	0,38	0,51	0,89	0,38	-20,9
475-486	2,20	2,93	0,73	2,11	2,94	0,83	-9,7
475-487	3,31	4,50	1,19	3,61	4,48	0,87	-11,4
475-489	2,77	4,48	1,71	2,78	4,53	1,75	-16,0
475-490	2,63	4,96	2,33	2,67	4,97	2,30	-19,8
480-489	1,82	3,67	1,85	1,77	3,69	1,92	-26,2
483-486	0,31	0,78	0,47	0,30	0,78	0,48	-26,5
487-489	0,05	0,40	0,35	0,02	0,39	0,37	-40,4

487-490	0,11	0,90	- 0,79	0,11	0,84	- 0,73	-42,3
487-491	0,10	1,05	- 0,95	0,10	1,03	- 0,93	-52,0
487-495	0,62	1,59	- 0,97	0,67	1,57	- 0,90	-17,4
487-509	5,63	6,99	- 1,36	5,68	7,02	- 1,34	-8,3
487-510	6,08	7,37	- 1,29	6,08	7,44	- 1,36	-7,7
487-512	5,72	6,48	- 0,76	5,60	6,77	- 1,17	-5,1
487-513	5,15	6,16	- 1,01	5,07	6,14	- 1,07	-5,3
488-490	0,03	0,22	- 0,19	0,00	0,23	- 0,23	-23,2
488-491	0,04	0,37	- 0,33	0,04	0,36	- 0,32	-36,3

Таблица 15: Пептиды RBD белка шипов со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАт10987 по сравнению с RBD самим по себе

RBD	5-мин инкубирование			10-мин инкубирование			
	RBD- мАт10987	RBD		RBD- мАт10987	RBD		
	D- поглощение	D- поглощение	ΔD	D- поглощение	D- поглощение	ΔD	
Остатки							Δ% D
432-441	1,62	2,17	- 0,55	1,64	2,18	- 0,54	-7,6
432-449	5,60	6,59	- 0,99	5,54	6,59	- 1,05	-7,1
432-452	6,20	7,49	- 1,29	6,20	7,46	- 1,26	-7,5
433-441	1,50	2,00	- 0,50	1,49	2,01	- 0,52	-8,1
440-452	3,95	4,81	- 0,86	4,03	4,80	- 0,77	-8,3

442-449	2,49	2,98	- 0,49	2,60	2,99	- 0,39	-8,2
---------	------	------	-----------	------	------	-----------	-------------

Таблица 16: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАТ10934 по сравнению с RBD самим по себе

RBD	5-мин инкубирование			10-мин инкубирование			
	RBD- мАт10934	RBD	ΔD	RBD- мАт10934	RBD	ΔD	
	D- поглощение	D- поглощение		D- поглощение	D- поглощение		
Остатки							$\Delta\%$ D
432-452	5,70	7,49	- 1,79	5,62	7,46	- 1,84	-10,6
433-441	1,60	2,00	- 0,40	1,63	2,01	- 0,38	-6,2
434-441	2,24	2,42	- 0,18	2,13	2,52	- 0,39	-5,3
440-452	3,12	4,81	- 1,69	3,10	4,80	- 1,70	-17,1
442-449	2,37	2,98	- 0,61	2,37	2,99	- 0,62	-11,4
442-452	2,67	4,21	- 1,54	2,66	4,23	- 1,57	-19,1
443-452	2,53	3,78	- 1,25	2,52	3,78	- 1,26	-17,5
444-451	1,79	2,73	- 0,94	1,80	2,73	- 0,93	-17,2
444-452	1,82	3,09	- 1,27	1,75	3,09	- 1,34	-20,7
445-452	1,24	2,42	- 1,18	1,24	2,43	- 1,19	-22,0
467-474	2,64	3,16	- 0,52	2,58	3,17	- 0,59	-10,2
470-473	0,51	0,98	- 0,47	0,55	0,98	- 0,43	-25,0
470-474	1,03	1,46	- 0,43	1,01	1,44	- 0,43	-16,0

471-474	0,56	0,89	- 0,33	0,55	0,89	- 0,34	-18,6
480-489	3,19	3,67	- 0,48	3,19	3,69	- 0,50	-6,8
487-489	0,04	0,40	- 0,36	0,06	0,39	- 0,33	-38,6
487-490	0,54	0,90	- 0,36	0,53	0,84	- 0,31	-18,8
487-491	0,63	1,05	- 0,42	0,70	1,03	- 0,33	-20,5
487-495	0,73	1,59	- 0,86	0,71	1,57	- 0,86	-16,0
487-509	5,55	6,99	- 1,44	5,57	7,02	- 1,45	-8,9
487-510	5,89	7,37	- 1,48	6,00	7,44	- 1,44	-8,5
487-513	4,37	6,16	- 1,79	4,79	6,14	- 1,35	-7,9
488-509	4,50	5,49	- 0,99	4,60	5,52	- 0,92	-6,2
488-510	5,84	6,58	- 0,74	5,65	6,67	- 1,02	-5,4
490-509	5,16	6,01	- 0,85	5,30	6,12	- 0,82	-5,8
490-512	5,15	6,37	- 1,22	5,30	6,28	- 0,98	-6,4
490-513	4,90	6,10	- 1,20	5,05	6,05	- 1,00	-6,1
503-509	1,19	1,39	- 0,20	1,21	1,41	- 0,20	-5,5

Таблица 17: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАТ10933 по сравнению с RBD самим по себе

RBD	5-мин инкубирование		10-мин инкубирование		
	RBD- мАТ10933	RBD	RBD- мАТ10933	RBD	

Остатки	D- поглощение	D- поглощение	ΔD	D- поглощение	D- поглощение	ΔD	$\Delta\%$ D
467-474	2,52	3,16	- 0,64	2,55	3,17	- 0,62	-11,7
470-474	1,03	1,46	- 0,43	1,03	1,44	- 0,41	-15,6
471-474	0,54	0,89	- 0,35	0,54	0,89	- 0,35	-19,5
475-487	3,62	4,50	- 0,88	3,63	4,48	- 0,85	-9,6
475-489	3,21	4,48	- 1,27	3,26	4,53	- 1,27	-11,8
480-486	1,79	2,06	- 0,27	1,87	2,07	- 0,20	-5,1
480-489	2,13	3,67	- 1,54	2,18	3,69	- 1,51	-21,2
483-486	0,61	0,78	- 0,17	0,62	0,78	- 0,16	-9,3
487-489	0,02	0,40	- 0,38	0,02	0,39	- 0,37	-41,6
487-490	0,42	0,90	- 0,48	0,40	0,84	- 0,44	-25,6
487-491	0,46	1,05	- 0,59	0,46	1,03	- 0,57	-32,0
487-495	0,74	1,59	- 0,85	0,82	1,57	- 0,75	-14,8
487-509	6,01	6,99	- 0,98	6,14	7,02	- 0,88	-5,7
487-510	6,29	7,37	- 1,08	6,14	7,44	- 1,30	-7,0
488-490	0,19	0,22	- 0,03	0,13	0,23	- 0,10	-7,4
488-491	0,26	0,37	- 0,11	0,25	0,36	- 0,11	-12,3

Таблица 18: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса

RBD-мАт10920 по сравнению с RBD самим по себе

RBD	10-мин инкубирование			
	RBD-мАт10920	RBD		
	Остатки	D-поглощение	D-поглощение	ΔD
471-486	4,63	5,40	-0,77	-6,6
475-486	2,74	3,27	-0,53	-6,5
491-513	5,45	6,57	-1,12	-6,6
495-510	4,51	5,43	-0,92	-8,5
495-513	4,41	5,13	-0,72	-5,4
496-515	3,58	4,35	-0,77	-5,4

Таблица 19: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАт10922 по сравнению с RBD самим по себе

RBD	10-мин инкубирование			
	RBD-мАт10922	RBD		
	Остатки	D-поглощение	D-поглощение	Δ D
432-441	1,86	2,23	- 0,37	- 5,3
442-452	3,52	4,57	- 1,05	- 13,0

Таблица 20: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАт10936 по сравнению с RBD самим по себе

RBD	10-мин инкубирование			
	RBD-мАт10936	RBD		
	Остатки	D-поглощение	D-поглощение	ΔD
351-360	2,68	3,10	-0,42	-5,9
432-441	1,85	2,23	-0,38	-5,3
442-452	2,55	4,57	-2,02	-25,0
443-452	2,98	4,01	-1,03	-14,2
467-470	0,69	0,84	-0,15	-8,1
471-486	4,73	5,40	-0,67	-5,8
491-513	5,48	6,57	-1,09	-6,4

495-510	4,38	5,43	-1,05	-9,8
---------	------	------	-------	-------------

Таблица 21: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАт10954 по сравнению с RBD самим по себе

RBD Остатки	10-мин инкубирование			
	RBD-мАт10954	RBD		
	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	$\Delta\%D$
400-420	3,67	4,56	-0,89	-5,5
401-420	3,39	4,22	-0,83	-5,5
401-421	3,44	4,28	-0,84	-5,2
406-420	3,32	4,10	-0,78	-7,2
406-421	3,23	4,11	-0,88	-7,6
406-422	3,41	4,16	-0,75	-5,9
407-420	2,86	3,62	-0,76	-7,7
407-422	2,97	3,74	-0,77	-6,6
453-466	1,53	2,23	-0,70	-7,1
453-470	3,63	4,53	-0,90	-6,7
453-471	4,42	5,22	-0,80	-5,6
471-486	4,34	5,40	-1,06	-9,1
472-486	4,47	5,29	-0,82	-7,6
490-512	5,64	6,65	-1,01	-5,9
490-513	5,61	6,57	-0,96	-5,3
491-513	5,26	6,57	-1,31	-7,7
493-512	4,86	5,69	-0,83	-5,7
493-513	4,74	5,72	-0,98	-6,4
495-510	4,77	5,43	-0,66	-6,2
495-513	4,10	5,13	-1,03	-7,6
496-512	3,60	4,60	-1,00	-8,6
496-515	3,43	4,35	-0,92	-6,4

Таблица 22: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАт10964 по сравнению с RBD самим по себе

RBD Остатки	10-мин инкубирование			
	RBD-мАт10964	RBD		
	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	$\Delta\%D$

401-421	3,87	4,84	-0,97	-6,0
406-419	3,34	3,91	-0,57	-5,8
406-420	3,47	4,15	-0,68	-6,3
406-421	3,53	4,22	-0,69	-5,9
406-422	3,66	4,37	-0,71	-5,6
406-424	3,31	4,24	-0,93	-6,5
410-422	3,04	3,56	-0,52	-5,8
471-486	4,65	5,41	-0,76	-6,4
475-489	3,34	4,56	-1,22	-11,3
480-489	2,32	3,19	-0,87	-12,1
487-509	6,38	7,58	-1,20	-7,4
495-513	4,50	5,20	-0,70	-5,2
496-512	4,17	4,80	-0,63	-5,4
496-513	3,90	4,85	-0,95	-7,5

Таблица 23: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАт10977 по сравнению с RBD самим по себе

RBD	10-мин инкубирование			
	RBD-мАт10977	RBD		
	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	Δ%D
Остатки				
351-364	4,82	5,38	-0,56	-5,2
471-486	3,81	5,40	-1,59	-13,6
472-486	4,20	5,29	-1,09	-10,1

Таблица 24: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАт10984 по сравнению с RBD самим по себе

RBD Остатки	10-мин инкубирование			
	RBD-мАт10984	RBD		
	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	Δ%D
400-420	3,73	4,56	-0,83	-5,2
401-421	3,47	4,28	-0,81	-5,1
406-420	3,35	4,10	-0,75	-7,0
406-421	3,31	4,11	-0,80	-6,9
406-422	3,47	4,16	-0,69	-5,5
407-420	2,88	3,62	-0,74	-7,5

407-422	2,94	3,74	-0,80	-6,8
453-466	1,51	2,23	-0,72	-7,3
453-470	3,70	4,53	-0,83	-6,2
453-471	4,49	5,22	-0,73	-5,1
471-486	4,45	5,40	-0,95	-8,1
472-486	4,63	5,29	-0,66	-6,1

Таблица 25: Пептиды RBD со значимой защитой при образовании комплекса RBD-мАТ10986 по сравнению с RBD самим по себе

RBD	10-мин инкубирование			
	RBD-мАТ10986	RBD		
	D-поглощение	D-поглощение	ΔD	$\Delta\%D$
Остатки				
400-420	3,58	4,56	-0,98	-6,1
400-421	3,60	4,61	-1,01	-5,9
401-420	3,30	4,22	-0,92	-6,1
401-421	3,29	4,28	-0,99	-6,1
401-422	3,44	4,43	-0,99	-5,8
406-420	3,28	4,10	-0,82	-7,6
406-421	3,24	4,11	-0,87	-7,5
406-422	3,35	4,16	-0,81	-6,4
407-420	2,81	3,62	-0,81	-8,2
407-422	2,91	3,74	-0,83	-7,1
453-466	1,53	2,23	-0,70	-7,1
453-470	3,55	4,53	-0,98	-7,3
453-471	4,41	5,22	-0,81	-5,6
471-486	4,13	5,40	-1,27	-10,9
490-510	5,13	6,44	-1,31	-8,6
490-512	5,33	6,65	-1,32	-7,7
490-513	5,25	6,57	-1,32	-7,3
491-513	4,29	6,57	-2,28	-13,3
493-512	4,46	5,69	-1,23	-8,5
493-513	4,62	5,72	-1,10	-7,2
495-513	3,89	5,13	-1,24	-9,3
496-513	3,36	4,53	-1,17	-9,3
496-515	3,05	4,35	-1,30	-9,1

Пример 12: Нейтрализация белка шипов SARS-CoV-2 дикого типа и вариантов белка шипов

[000221] Для проверки способности антител против SARS-CoV-2 нейтрализовать варианты SARS-CoV-2 эти антитела подвергали скринингу против панели вирусов псевдотипа VSV, экспрессирующих белки шипов дикого типа и их варианты. Вирусы псевдотипа VSV получали путем временной трансфекции клеток 293Т плазмидой, кодирующей белок шипов SARS-CoV-2, или той же плазмидой, содержащей изменения нуклеотидной последовательности, кодирующие известные варианты аминокислотной последовательности белка шипов SARS-CoV-2. Все плазмиды подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Клетки высевали в 15-см планшеты из расчета $1,2 \times 10^7$ клеток на планшет в полную среду DMEM (1000 мл DMEM, Gibco; 100 мл FBS, Gibco; 10 мл PSG, Gibco) за один день до трансфекции в количестве 15 мкг ДНК гена шипов/планшет с использованием 125 мкл липофектамина LTX, 30 мкл реагента PLUS и до 3 мл Opti-Mem. Через 24 часа после трансфекции клетки промывали 10 мл PBS, а затем инфицировали вирусом VSV Δ G:mNeon в количестве 0,1 MOI в 10 мл Opti-Mem. Вирус инкубировали с клетками в течение 1 часа, осторожно встряхивая каждые 10 минут. Клетки 3 раза промывали 10 мл PBS, затем покрывали 20 мл среды для заражения (1000 мл DMEM, Gibco; 10 мл пирувата натрия, Gibco; 7 мл BCA, Sigma; 5 мл гентамицина, Gibco) перед инкубированием при 37 °C, 5% CO₂ в течение 24 часов. Супернатант псевдовirusа собирали в 250-мл центрифужные пробирки на льду, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут для осаждения остатков клеток, аликвотировали на льду, а затем замораживали до -80 °C. Инфекционность проверяли на клетках Vero перед использованием в анализах нейтрализации. Этот материал называли псевдовиром VSV Δ G:mNeon/Spike или VSV Δ G:mNeon/Spike_ (вариантная аминокислотная мутация) (например, VSV Δ G:mNeon/Spike_H49Y)

[000222] В 1 день клетки Vero высевали при 80% конфлюэнтности во флаконы T225, клетки промывали PBS (Gibco: 20012-043), добавляли TrypLE для отделения клеток от флакона и добавляли полную среду DMEM для инактивации трипсина. 20000 клеток Vero высевали в 100 мкл предварительно нагретой полной среды DMEM на лунку 96-луночного черного полистирольного микропланшета (Corning: 3904). На 2 день псевдовир VSV Δ G:mNeon/Spike размораживали на льду и разбавляли инфекционной средой. Антитела разбавляли в 96-луночном планшете с U-образным дном, создавая разведение каждого антитела в 210 мкл инфекционной среды при 2-кратной концентрации для анализа. 120 мкл разбавленных антител переносили в свежий планшет с U-образным дном, и в каждый планшет добавляли среду и контрольное антитело IgG1. 120 мкл разбавленного псевдовirusа добавляли в каждую лунку, кроме контрольных лунок со средой. В эти лунки добавляли 120 мкл среды для заражения. Псевдовир с антителами инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем от клеток Vero удаляли среду. К клеткам добавляли 100 мкл смеси антител/псевдовirusа, а затем инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 24 часов. На 3 день из лунок с клетками удаляли супернатант и заменяли

его 100 мкл PBS. Планшеты считывали на SpectraMax i3 с цитометром для визуализации MiniMax.

[000223] Помимо анализа нейтрализующей способности с нереплицирующимся вирусом VSV-SARS-CoV-2-S, антитела также проанализировали с вирусом SARS-CoV-2. Моноклональные антитела и комбинации антител последовательно разбавляли DMEM (Quality Biological) с добавлением 10% (об./об.) термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина (Gemini Bio-products) и 1% (об./об.) L-глутамин (конечная концентрация 2 мМ, Gibco) (среда VeroE6) до конечного объема 250 мкл. Затем к каждому разведению сыворотки и к 250 мкл среды в качестве необработанного контроля добавляли 250 мкл среды VeroE6, содержащей SARS-CoV-2 (WA-1) (1000 БОЕ/мл). Смеси вирус-антитело инкубировали в течение 60 мин при 37 °C. После инкубирования определяли титры вирусов в смесях с помощью анализа бляшек. Наконец, рассчитывали значения титра нейтрализации, вызывавшего 50% уменьшение количества бляшек (PRNT50) (разведения сыворотки, при которых образование бляшек снижалось на 50% по сравнению с необработанным контролем), путем аппроксимации данных процентной нейтрализации 4-параметрической логистической кривой (GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния, США).

[000224] Половинную ингибирующую концентрацию (IC50) отдельных моноклональных антител против псевдовируса VSV-SARS-CoV-2, кодирующего последовательность белка шипов (S-дт) Wuhan-Hu-1 (регистрационный номер в NCBI MN908947.3) и экспрессирующего белок шипов (S), определяли в клетках Vero (таблица 26). Большинство антител проявляли эффективность нейтрализации в пикомолярном диапазоне (пМ), а некоторые проявляли эффективность нейтрализации в наномолярном (нМ) диапазоне.

[000225] Хотя рекомбинантный ACE2 мог опосредовать нейтрализацию псевдочастиц VSV-spike, как сообщалось ранее, его эффективность была намного ниже, чем у моноклональных антител, уступая лучшим нейтрализующим мАт более чем в 1000 раз (фигура 10А). Кроме того, в анализах нейтрализации подтвердили выраженную нейтрализующую активность мАт10987, мАт10989, мАт10933 и мАт10934, включая нейтрализацию SARS-CoV-2 в клетках VeroE6 (фиг. 10В). Все анализы нейтрализации позволили получить сходную эффективность для четырех мАт (мАт10987, мАт10989, мАт10933 и мАт10934), и ни одна комбинация не демонстрировала синергетической нейтрализующей активности (фигура 10В).

Таблица 26: Эффективность нейтрализации мАт (IC50 (М)) против штамма дикого типа псевдочастиц VSV-SARS-CoV-2-S в клетках Vero

Антитело	IC50 (М)
мАт10934	5,44E-11
мАт10936	1,11E-10
мАт10987	4,06E-11

МАТ10924	1,36E-10
МАТ10935	2,21E-10
МАТ10913	2,31E-10
МАТ10939	2,36E-10
МАТ10937	2,62E-10
МАТ10920	2,64E-10
МАТ10941	2,78E-10
МАТ10923	3,29E-10
МАТ10915	3,40E-10
МАТ10932	3,58E-10
МАТ10921	3,74E-10
МАТ10914	3,94E-10
МАТ10940	5,43E-10
МАТ10989	7,23E-12
МАТ10938	6,65E-10
МАТ10922	1,21E-10
МАТ10930	1,07E-09
МАТ10954	9,22E-11
МАТ10955	1,19E-10
МАТ10933	4,28E-11
МАТ10956	1,28E-10
МАТ10957	1,76E-10
МАТ10964	5,70E-11
МАТ10965	1,42E-10
МАТ10966	1,00E-10
МАТ10967	2,43E-10
МАТ10970	1,26E-10
МАТ10971	1,55E-10
МАТ10977	5,15E-11
МАТ10982	3,69E-10
МАТ10984	9,73E-11
МАТ10985	2,57E-10
МАТ10986	9,91E-11
МАТ10988	2,98E-10

мАт10969	2,27E-09
мАт10996	1,13E-08
мАт10998	9,51E-09
мАт11002	не является нейтрализующим
мАт11000	2,79E-08
мАт11004	6,00E-09
мАт11006	1,40E-09
мАт11008	2,05E-08
мАт11010	не является нейтрализующим

[000226] Аминокислотные варианты белка шипов (S) выявили из более чем 7000 общедоступных последовательностей SARS-CoV-2, представляющих собой изоляты, циркулирующие во всем мире, и клонировали в псевдочастицы VSV. Для оценки влияния каждого варианта на эффективность нейтрализации моноклональных антител выполняли анализы нейтрализации с псевдочастицами, кодирующими указанный вариант. В таблице 27 показана относительная эффективность нейтрализации моноклональных антител против псевдочастиц, кодирующих вариант, по сравнению с белком шипов SARS-CoV-2 (S-дт) при разовой концентрации 5 мкг/мл. Процент нейтрализации по сравнению с S-дт фиксировали для каждого отдельного антитела и варианта. Ни одно из антител не демонстрировало потери нейтрализующей способности в концентрации 5 мкг/мл, за исключением мАт10985 и варианта R408I. Эти данные демонстрируют широкий охват функциональной нейтрализации моноклональных антител против вариантов белка шипов SARS-CoV-2, циркулирующего во всем мире.

[000227] Для дополнительного исследования влияния вариантов белка S на эффективность нейтрализации моноклональных антител строили полные кривые нейтрализации для определения значения IC₅₀ наиболее эффективных нейтрализующих антител против подмножества вариантов, локализованных в рецепторсвязывающем домене (RBD) белка S. В таблице 28 показаны значения IC₅₀ нейтрализации для каждого варианта псевдочастицы. Результаты анализа нейтрализации псевдочастиц характеризовались внутренней изменчивостью вплоть до 3-кратных различий, но это не указывало на изменение эффективности нейтрализации. Эти данные демонстрируют, что антитела сохранили свою нейтрализующую способность против панели различных вариантов RBD белка S.

Таблица 27. Относительная нейтрализация вариантов VSV-SARS-CoV-2, кодирующих белок S, при концентрации антител 5 мкг/мл в клетках Vero

мАт	дт	H49Y	S50 L	V341I	N354D	S359N	V367F	K378 R
мАт10989	100%	100%	88%	100%	100%	99%	100%	100%
мАт10987	100%	100%	96%	99%	100%	99%	100%	100%

МАТ10933	100%	100%	96%	99%	100%	99%	100%	99%
МАТ10977	100%	100%	98%	100%	99%	100%	100%	100%
МАТ10934	100%	100%	95%	100%	100%	99%	100%	99%
МАТ10964	100%	100%	90%	100%	99%	99%	100%	100%
МАТ10954	100%	100%	92%	100%	100%	99%	100%	100%
МАТ10984	100%	100%	95%	100%	99%	99%	100%	99%
МАТ10986	100%	100%	98%	100%	99%	99%	100%	100%
МАТ10966	100%	100%	90%	100%	99%	99%	100%	100%
МАТ10936	100%	100%	96%	100%	99%	99%	100%	100%
МАТ10955	100%	100%	95%	99%	99%	99%	100%	100%
МАТ10922	100%	100%	98%	99%	99%	99%	100%	99%
МАТ10970	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%
МАТ10956	100%	100%	96%	99%	99%	99%	100%	100%
МАТ10924	100%	100%	96%	100%	99%	99%	100%	99%
МАТ10965	100%	100%	96%	100%	99%	100%	100%	100%
МАТ10971	100%	100%	90%	99%	99%	99%	100%	99%
МАТ10957	100%	100%	91%	99%	99%	98%	100%	99%
МАТ10935	100%	н/о	н/о	н/о	н/о	99%	н/о	99%
МАТ10913	100%	100%	93%	100%	99%	98%	100%	99%
МАТ10939	100%	100%	93%	98%	99%	100%	100%	99%
МАТ10967	100%	100%	90%	99%	99%	98%	100%	100%
МАТ10985	100%	100%	96%	99%	99%	98%	100%	99%
МАТ10937	100%	100%	92%	99%	100%	98%	100%	99%
МАТ10920	100%	100%	92%	99%	99%	99%	100%	99%
МАТ10941	100%	99%	97%	99%	100%	99%	100%	100%
МАТ10988	100%	100%	99%	100%	99%	98%	100%	100%
МАТ10923	100%	101%	102 %	97%	103%	105%	104%	103%
МАТ10915	100%	100%	95%	100%	99%	99%	100%	99%
МАТ10932	100%	100%	93%	100%	99%	99%	100%	99%
МАТ10982	100%	100%	94%	99%	99%	99%	100%	100%

Таблица 27 (продолжение)

МАТ	R408I	Q409 E	A435 S	K458 R	G476 S	Y483 A	Y508 H	H519 P	D614 G
-----	-------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

МАТ10989	100%	101%	100%	99%	99%	100%	100%	97%	100%
МАТ10987	99%	100%	100%	99%	99%	99%	100%	97%	100%
МАТ10933	100%	99%	100%	99%	99%	100%	100%	98%	100%
МАТ10977	100%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	97%	100%
МАТ10934	100%	100%	100%	98%	98%	99%	100%	97%	100%
МАТ10964	99%	100%	99%	98%	100%	99%	100%	96%	100%
МАТ10954	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	100%
МАТ10984	99%	100%	100%	99%	99%	100%	100%	96%	100%
МАТ10986	100%	100%	100%	98%	99%	100%	100%	99%	100%
МАТ10966	99%	100%	100%	99%	100%	99%	100%	96%	100%
МАТ10936	99%	100%	100%	99%	99%	99%	100%	97%	100%
МАТ10955	100%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	97%	100%
МАТ10922	99%	100%	100%	98%	99%	99%	100%	97%	99%
МАТ10970	100%	101%	100%	100%	99%	99%	100%	99%	100%
МАТ10956	100%	100%	99%	99%	100%	99%	100%	97%	100%
МАТ10924	99%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	98%	100%
МАТ10965	99%	100%	100%	99%	100%	99%	100%	98%	100%
МАТ10971	99%	100%	100%	99%	99%	99%	100%	98%	100%
МАТ10957	99%	100%	99%	98%	99%	99%	100%	98%	100%
МАТ10935	н/о	н/о	н/о	н/о	98%	н/о	99%	н/о	н/о
МАТ10913	99%	100%	100%	99%	98%	99%	99%	97%	100%
МАТ10939	99%	100%	99%	98%	97%	98%	100%	96%	100%
МАТ10967	99%	99%	99%	98%	99%	98%	100%	97%	100%
МАТ10985	26%	100%	100%	99%	99%	100%	99%	97%	99%
МАТ10937	100%	99%	99%	99%	99%	100%	99%	98%	100%
МАТ10920	99%	100%	100%	99%	98%	100%	99%	98%	100%
МАТ10941	99%	100%	100%	98%	98%	98%	100%	96%	100%
МАТ10988	100%	101%	99%	99%	99%	100%	99%	98%	100%
МАТ10923	103%	104%	100%	100%	96%	98%	101%	97%	101%
МАТ10915	98%	100%	100%	98%	97%	100%	99%	97%	100%
МАТ10932	99%	100%	99%	99%	98%	100%	99%	98%	100%
МАТ10982	99%	100%	99%	98%	99%	99%	100%	98%	100%

Таблица 28. IC50 (М) нейтрализации вариантов RBD VSV-SARS-CoV-2-S в клетках Vero

	Q321S	V341I	A348T	N354D	S359N	V376F	K378S	R408I
мАт10933	6,85E-11	3,37E-11	4,13E-11	5,89E-11	2,12E-11	2,40E-11	3,52E-11	1,98E-11
мАт10934	6,84E-11	7,42E-11	1,42E-10	9,76E-11	3,04E-11	3,20E-11	4,65E-11	2,75E-11
мАт10984	2,75E-10	2,49E-10	2,01E-10	2,64E-10	1,23E-10	1,53E-10	1,88E-10	1,35E-10
мАт10986	2,06E-10	1,92E-10	1,03E-10	2,49E-10	8,91E-11	1,49E-10	1,54E-10	6,14E-11
мАт10987	5,02E-11	3,38E-11	2,98E-11	2,68E-11	2,41E-11	1,78E-11	2,40E-11	1,71E-11
мАт10989	1,46E-11	1,61E-11	7,33E-12	1,14E-11	4,30E-12	1,33E-11	1,21E-11	1,09E-11
мАт10964	5,65E-11	1,13E-10	3,52E-11	1,93E-10	6,83E-11	8,92E-11	6,19E-11	4,96E-11
мАт10954	2,32E-10	2,52E-10	1,84E-10	2,84E-10	1,09E-10	1,29E-10	1,65E-10	9,88E-11
Изотипический контроль IgG1	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д

Таблица 28 (продолжение)

	Q409E	A435S	K458R	I472V	G476S	V483A	Y508H	H519P
мАт10933	5,65E-11	4,71E-11	3,43E-11	9,17E-11	1,41E-10	1,54E-11	4,77E-11	3,03E-11
мАт10934	5,94E-11	8,07E-11	3,46E-11	9,40E-11	3,51E-11	4,43E-11	6,73E-11	3,56E-11
мАт10984	1,52E-10	2,18E-10	1,59E-10	2,61E-10	2,10E-10	1,71E-10	2,83E-10	1,08E-10
мАт10986	1,95E-10	1,51E-10	1,00E-10	2,24E-10	1,13E-10	9,70E-11	2,01E-10	6,14E-11
мАт10987	4,06E-11	3,88E-11	1,68E-11	4,18E-11	1,86E-11	2,60E-11	2,75E-11	2,20E-11
мАт10989	2,12E-10	1,10E-10	7,51E-11	2,27E-10	6,80E-11	8,78E-11	1,71E-10	4,51E-11

	11	11	12	11	12	12	11	12
мАт10964	6,61E-11	7,90E-11	5,46E-11	1,01E-10	3,42E-11	4,50E-11	1,02E-10	4,45E-11
мАт10954	2,64E-10	2,11E-10	1,45E-10	3,44E-10	1,83E-10	1,12E-10	2,05E-10	1,40E-10
Изотипический контроль IgG1	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д

Пример 13: Кинетика связывания очищенных моноклональных антител против SARS-CoV-2-S на Biacore

[000228] Константу равновесной диссоциации (K_D) для различных реагентов RBD SARS-COV-2, связанных с выделенными из клеток CHOt очищенными моноклональными антителами (мАт) против SARS-COV-2, определяли с использованием биосенсора Biacore T200/Biacore 8K на основе поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени. Все исследования связывания выполняли в рабочем буфере 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25°C и 37 °C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 вначале модифицировали путем присоединения через амин мАт мыши против Fc человека (Regeneron, мАт2567) для захвата мАт против SARS-CoV-2. Исследования связывания выполняли на примере внеклеточного домена RBD SARS-CoV-2 человека, экспрессируемого с С-концевым тус-тус-гексагистиридиновым маркером (RBD-MMH SARS-COV-2) и внеклеточного домена RBD SARS-CoV-2, экспрессируемого с С-концевым IgG2a мыши (RBD-mFc SARS-CoV-2). Использование этих реагентов позволило проверить способность антител связывать мономерные и димерные пептиды RBD, соответственно.

[000229] Различные концентрации hRBD-MMH SARS-COV-2 (90 нМ-3,33 нМ, 3-кратное разбавление) и RBD-mFc SARS-CoV-2 (30 нМ-1,11 нМ, 3-кратное разбавление) в рабочем буфере HBS-ET, вводили в течение 3 минут при скорости потока 50 мкл/мин, в то время как диссоциацию мАт, связанного с различными реагентами RBD SARS-COV-2, отслеживали в течение 6-10 минут в рабочем буфере HBS-ET. В конце каждого цикла поверхность захвата мАт против RBD SARS-COV-2 регенерировали с использованием 12-секундной инъекции 20 mM фосфорной кислоты при использовании поверхности с мАт мыши против Fc человека. Константы скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в реальном времени моделью связывания 1:1 с ограничением массопереноса с использованием программного обеспечения BiaEvaluation версии 3.1 или программного обеспечения Biacore Insight Evaluation версии 2.0 или программного обеспечения для аппроксимации кривых. Константу равновесия диссоциации связывания (K_D) и период полураспада диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали на основе скоростей кинетики как:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

[000230] Параметры кинетики связывания для различных мАт против SARS-CoV-2, связывающихся с различными реагентами RBD SARS-COV-2 согласно настоящему изобретению при 25°C и 37 °C, показаны в таблицах 29-32, соответственно.

Таблица 29: Параметры кинетики связывания RBD-ММН SARS-COV-2 с моноклональными антителами против SARS-COV-2-S при 25 °C.

Захваченны е мАт (№ антитела)	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывани е 90 нМ Аг (ЕО)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (M)	$t_{1/2}$ (мин)
мАт10913	287+3	55,9	4,04E+05	2,12E-02	5,26E-08	0,5
мАт10914	310+2	51,1	8,81E+04	3,76E-03	4,26E-08	3,1
мАт10915	310+2	63,2	9,61E+04	1,08E-04	1,13E-09	106,9
мАт10920	307+3	73,9	4,52E+05	1,30E-02	2,87E-08	0,9
мАт10921	307+3	61,4	1,01E+05	4,75E-04	4,71E-09	24,3
мАт10922	312,2 ± 1,7	120,2	6,14E+05	1,48E-03	2,41E-09	7,8
мАт10923	283+2	80,4	4,66E+05	6,17E-03	1,32E-08	1,9
мАт10924	319+2	94,6	2,07E+05	1,74E-03	8,40E-09	6,6
мАт10930	284,7 ± 0,7	59,6	1,24E+05	3,34E-03	2,70E-08	3,5
мАт10932	315+3	79,4	8,99E+04	1,21E-04	1,35E-09	95,5
мАт10933	280+1	99,8	1,52E+06	2,78E-03	1,83E-09	4,2
мАт10934	280+1	103,4	4,82E+06	5,77E-03	1,20E-09	2,0
мАт10935	337+2	107,8	3,93E+05	4,19E-03	1,07E-08	2,8
мАт10936	311+2	107,3	5,45E+05	1,07E-03	1,97E-09	10,8
мАт10937	311+2	102,2	5,72E+05	4,76E-03	8,34E-09	2,4
мАт10938	338+3	61,5	7,27E+04	1,75E-04	2,41E-09	66,0
мАт10939	343+2	82,3	1,63E+05	2,84E-03	1,74E-08	4,1
мАт10940	338+3	103,5	8,01E+05	2,51E-03	3,13E-09	4,6
мАт10941	327+1	92,1	1,20E+05	4,12E-04	3,43E-09	28,0
мАт10954	286,9 ± 3	110,5	4,04E+05	3,64E-04	8,99E-10	31,7
мАт10955	298,3 ± 2,5	88,8	1,61E+05	2,12E-03	1,32E-08	5,4
мАт10956	293,7 ± 0,6	86,6	2,22E+05	4,06E-03	1,82E-08	2,8
мАт10957	286,7 ± 2	93,0	1,38E+05	2,53E-04	1,84E-09	45,7
мАт10964	259,6 ± 1,2	99,9	1,65E+06	3,90E-04	2,36E-10	29,6
мАт10965	253,1 ± 1,9	63,6	1,24E+05	2,92E-03	2,35E-08	4,0

мАт10966	266,6 ± 3	97,4	2,37E+05	3,65E-04	1,54E-09	31,6
мАт10967	260,2 ± 0,9	70,7	1,24E+05	6,28E-05	5,08E-10	183,9
мАт10969	272,2 ± 1,3	87,1	2,45E+05	3,80E-03	1,55E-08	3,0
мАт10970	307,3 ± 1,3	102,8	2,27E+05	1,10E-03	4,85E-09	10,5
мАт10971	263,1 ± 1,1	89,3	2,15E+05	3,75E-04	1,74E-09	30,8
мАт10977	305 ± 3	98,5	2,43E+05	2,57E-04	1,06E-09	44,9
мАт10982	267,8 ± 0,5	69,3	1,23E+05	2,06E-03	1,68E-08	5,6
мАт10984	334 ± 2,1	117,9	2,04E+05	4,26E-04	2,09E-09	27,1
мАт10985	306,9 ± 2,1	113,4	1,44E+06	1,55E-03	1,08E-09	7,5
мАт10986	268,8 ± 0,9	104,3	4,64E+05	1,49E-04	3,21E-10	77,5
мАт10987	270,8 ± 1,3	78,0	5,60E+05	1,20E-02	2,14E-08	1,0
мАт10988	279,2 ± 2,3	63,6	8,29E+05	2,71E-02	3,27E-08	0,4
мАт10989	316,7 ± 1,6	114,3	1,86E+06	2,78E-03	1,50E-09	4,2
мАт10996	414,2 ± 2,8	37,5	1,41E+05	2,28E-02	1,61E-07	0,5
мАт10998	212,3 ± 1	17,7	3,54E+05	1,84E-02	5,21E-08	0,6
мАт11000	322,6 ± 3,5	73,6	1,09E+06	1,14E-03	1,04E-09	10,1
мАт11002	291,7 ± 2,7	13,8	1,65E+05	6,73E-03	4,07E-08	1,7
мАт11004	232,9 ± 0,6	76,4	3,79E+05	3,24E-03	8,54E-09	3,6
мАт11006	277,2 ± 1,1	66,9	9,67E+04	4,40E-04	4,55E-09	26,3
мАт11008	214,9 ± 1,5	40,8	9,30E+04	3,27E-03	3,52E-08	3,5
мАт11010	221,8 ± 1,3	76,8	1,11E+06	2,74E-03	2,47E-09	4,2
мАт1932	205 ± 0,8	5,3	Н/С	Н/С	Н/С	Н/С

Таблица 30: Параметры кинетики связывания RBD-ММН SARS-COV-2 с моноклональными антителами против SARS-COV-2-S при 37 °C.

Захваченны е мАт (№ антитела)	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывани е 90 нМ Аг (ЕО)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
мАт10913	366+6	49	5,29E+05	5,56E-02	1,05E-07	0,2
мАт10914	401+3	63	2,51E+05	1,58E-02	6,27E-08	0,7
мАт10915	401+3	93	1,57E+05	7,57E-04	4,84E-09	15,3
мАт10920	394+3	73	6,10E+05	3,41E-02	5,60E-08	0,3
мАт10921	394+3	87	1,60E+05	2,07E-03	1,29E-08	5,6
мАт10922	405,6 ± 1,7	130	1,04E+06	9,27E-03	8,89E-09	1,2

МАТ10923	355+3	84	6,15E+05	2,76E-02	4,48E-08	0,4
МАТ10924	406+5	110	2,99E+05	6,18E-03	2,07E-08	1,9
МАТ10930	373,9 ± 3,5	42	2,30E+05	1,87E-02	8,14E-08	0,6
МАТ10932	406+4	119	1,43E+05	6,55E-04	4,57E-09	17,6
МАТ10933	368+3	124	2,37E+06	8,28E-03	3,49E-09	1,4
МАТ10934	368+3	117	4,62E+06	2,32E-02	5,02E-09	0,5
МАТ10935	430+5	75	4,37E+05	3,74E-02	8,56E-08	0,3
МАТ10936	402+3	126	9,75E+05	5,51E-03	5,65E-09	2,1
МАТ10937	402+3	107	9,68E+05	2,43E-02	2,51E-08	0,5
МАТ10938	434+3	100	1,06E+05	1,12E-03	1,05E-08	10,3
МАТ10939	439+5	90	2,40E+05	9,46E-03	3,95E-08	1,2
МАТ10940	434+3	124	1,42E+06	1,23E-02	8,70E-09	0,9
МАТ10941	418+3	134	1,97E+05	1,75E-03	8,87E-09	6,6
МАТ10954	371,8 ± 2	131	5,68E+05	1,35E-03	2,38E-09	8,6
МАТ10955	384,1 ± 6,3	81	2,85E+05	1,26E-02	4,43E-08	0,9
МАТ10956	383 ± 2,3	89	3,56E+05	1,30E-02	3,65E-08	0,9
МАТ10957	322 ± 2,1	124	2,44E+05	6,19E-04	2,54E-09	18,7
МАТ10964	333,3 ± 4,6	121	3,68E+06	2,08E-03	5,64E-10	5,6
МАТ10965	326,8 ± 1,2	67	2,23E+05	9,19E-03	4,12E-08	1,3
МАТ10966	350,2 ± 2,9	118	4,40E+05	1,67E-03	3,79E-09	6,9
МАТ10967	336 ± 2,2	108	1,91E+05	2,62E-04	1,38E-09	44,1
МАТ10969	349,5 ± 3	86	4,07E+05	1,59E-02	3,92E-08	0,7
МАТ10970	393,8 ± 3,4	104	3,33E+05	7,58E-03	2,28E-08	1,5
МАТ10971	347 ± 1,9	116	3,92E+05	9,79E-04	2,50E-09	11,8
МАТ10977	341 ± 1,4	122	4,35E+05	1,31E-03	3,01E-09	8,8
МАТ10982	347,5 ± 1,3	67	1,94E+05	9,42E-03	4,85E-08	1,2
МАТ10984	422,5 ± 0,7	144	3,28E+05	1,82E-03	5,55E-09	6,3
МАТ10985	395,5 ± 2,5	134	2,57E+06	4,23E-03	1,65E-09	2,7
МАТ10986	349,3 ± 1,5	129	8,24E+05	5,83E-04	7,07E-10	19,8
МАТ10987	354 ± 5,3	82	8,38E+05	2,51E-02	3,00E-08	0,5
МАТ10988	364,4 ± 2,6	52	9,19E+05	5,78E-02	6,29E-08	0,2
МАТ10989	405,6 ± 1,9	128	2,97E+06	1,16E-02	3,90E-09	1,0
МАТ10996	524,3 ± 2,8	43	1,06E+05	1,25E-02	1,19E-07	0,9

мАТ10998	271,1 ± 0,6	15	2,81E+05	7,54E-03	2,68E-08	1,5
мАТ11000	418,2 ± 1	87	2,89E+05	9,10E-03	3,14E-08	1,3
мАТ11002	370,1 ± 2,5	12	2,81E+05	7,54E-03	2,68E-08	1,5
мАТ11004	297,8 ± 0,4	79	1,75E+06	1,48E-03	8,48E-10	7,8
мАТ11006	350,2 ± 1,2	92	6,28E+05	1,48E-02	2,35E-08	0,8
мАТ11008	289,4 ± 2,7	38	1,42E+05	1,51E-03	1,06E-08	7,6
мАТ11010	286,3 ± 0,5	96	1,67E+05	1,45E-02	8,71E-08	0,8
мАТ1932	265,3 ± 1,4	5	H/C	H/C	H/C	H/C

Таблица 31: Параметры кинетики связывания RBD-mFc SARS-CoV-2 с моноклональными антителами против SARS-COV-2-S при 25 °C.

Захваченны е мАт (№ антитела)	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывани е 30 нМ Аг (ЕО)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
мАТ10913	107±0,4	65	5,00E+06	2,77E-04	5,53E-11	41,7
мАТ10914	116±0,8	44	2,59E+05	1,40E-04	5,40E-10	82,5
мАТ10915	103±0,2	41	2,83E+05	9,13E-06	3,23E-11	1265,1
мАТ10920	116±0,9	69	5,08E+06	2,55E-04	5,02E-11	45,3
мАТ10921	104±0,2	39	2,66E+05	3,34E-05	1,25E-10	345,8
мАТ10922	111,4 ± 0,8	80	3,20E+06	5,64E-05	1,76E-11	204,8
мАТ10923	110±1,0	71	3,69E+06	1,35E-04	3,67E-11	85,6
мАТ10924	121±0,5	74	8,09E+05	7,63E-05	9,43E-11	151,4
мАТ10930	104,2 ± 0,9	61	9,43E+05	1,71E-04	1,81E-10	67,5
мАТ10932	121±0,8	60	2,95E+05	2,85E-05	9,67E-11	405,3
мАТ10933	108±0,5	72	6,16E+06	6,10E-05	9,89E-12	189,3
мАТ10934	113±0,5	70	1,12E+07	1,56E-04	1,39E-11	74,0
мАТ10935	128±0,8	88	1,35E+06	1,07E-04	7,94E-11	107,9
мАТ10936	117±0,4	74	1,78E+06	5,04E-05	2,83E-11	229,2
мАТ10937	106±0,3	67	1,78E+06	5,40E-05	3,04E-11	213,9
мАТ10938	128±1,5	47	2,42E+05	1,69E-05	7,02E-11	683,4
мАТ10939	127±0,8	67	7,22E+05	8,74E-05	1,21E-10	132,2
мАТ10940	102±0,4	67	3,72E+06	4,66E-05	1,25E-11	247,9
мАТ10941	125±0,2	68	3,70E+05	3,48E-05	9,43E-11	331,9
мАТ10954	108,8 ± 1	86	2,35E+06	4,78E-05	2,03E-11	241,6

мАт10955	109,8 ± 0,8	76	1,20E+06	9,22E-05	7,71E-11	125,3
мАт10956	104,1 ± 0,5	74	1,46E+06	1,30E-04	8,87E-11	88,8
мАт10957	104,7 ± 0,5	77	1,02E+06	3,35E-05	3,27E-11	344,8
мАт10964	93,3 ± 0,3	70	9,30E+06	3,69E-05	3,97E-12	313,0
мАт10965	94,2 ± 0,8	63	6,94E+05	1,56E-04	2,25E-10	74,0
мАт10966	100,2 ± 0,4	73	1,50E+06	3,37E-05	2,24E-11	342,7
мАт10967	93,3 ± 0,2	60	6,64E+05	1,35E-05	2,03E-11	855,6
мАт10969	111,4 ± 0,8	80	4,64E+05	1,00E-04	2,16E-10	115,5
мАт10970	113,4 ± 0,7	85	2,19E+06	4,05E-04	1,85E-10	28,5
мАт10971	99 ± 0,5	72	1,40E+06	4,09E-05	2,92E-11	282,4
мАт10977	109,1 ± 0,4	73	1,82E+06	2,29E-05	1,26E-11	504,4
мАт10982	94,8 ± 0,1	59	9,10E+05	8,06E-05	8,86E-11	143,3
мАт10984	121 ± 0,6	89	1,39E+06	3,97E-05	2,86E-11	290,9
мАт10985	112,7 ± 0,3	77	8,09E+06	8,51E-05	1,05E-11	135,7
мАт10986	94,2 ± 0,5	66	2,70E+06	2,40E-05	8,88E-12	481,3
мАт10987	98 ± 0,7	73	3,19E+06	4,24E-04	1,33E-10	27,2
мАт10988	101,6 ± 0,6	69	4,96E+06	5,08E-04	1,02E-10	22,7
мАт10989	112,1 ± 0,4	77	1,08E+07	9,63E-05	8,95E-12	119,9
мАт10996	104,2 ± 0,9	61	5,62E+05	8,02E-04	1,43E-09	14,4
мАт10998	94,8 ± 0,1	59	1,47E+06	3,58E-03	2,44E-09	3,2
мАт11000	112,7 ± 0,3	77	1,11E+06	1,27E-04	1,15E-10	90,9
мАт11002	121 ± 0,6	89	5,54E+05	2,47E-03	4,46E-09	4,7
мАт11004	94,2 ± 0,5	66	6,95E+05	6,40E-05	9,21E-11	180,5
мАт11006	98 ± 0,7	73	3,30E+05	5,21E-05	1,58E-10	221,7
мАт11008	101,6 ± 0,6	69	3,90E+05	1,92E-04	4,92E-10	60,2
мАт11010	112,1 ± 0,4	77	1,14E+06	8,99E-05	7,89E-11	128,5
мАт1932	97,8 ± 0,2	3	H/C	H/C	H/C	H/C

Таблица 32: Параметры кинетики связывания RBD-mFc SARS-CoV-2 с моноклональными антителами против SARS-COV-2-S при 37 °C

Захваченные мАт (№ антитела)	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывание 30 нМ Аг (ЕО)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин)
мАт10913	147±0,8	75	6,32E+06	1,73E-03	2,74E-10	6,7

МАТ10914	163+1,2	70	6,91E+05	2,20E-04	3,18E-10	52,5
МАТ10915	141+0,6	63	4,41E+05	6,89E-05	1,56E-10	167,6
МАТ10920	155+1,1	83	6,31E+06	7,53E-04	1,19E-10	15,3
МАТ10921	135+0,3	62	4,58E+05	1,25E-04	2,73E-10	92,4
МАТ10922	149,1 ± 1	97	4,60E+06	1,60E-04	3,49E-11	72,2
МАТ10923	144+0,8	88	5,53E+06	1,85E-04	3,36E-11	62,4
МАТ10924	160+1,1	98	1,17E+06	1,31E-04	1,12E-10	88,2
МАТ10930	142,9 ± 0,4	72	1,49E+06	5,97E-04	3,99E-10	19,3
МАТ10932	164+ 1,5	89	4,48E+05	6,86E-05	1,53E-10	168,4
МАТ10933	152+ 0,9	89	7,30E+06	7,94E-05	1,09E-11	145,5
МАТ10934	151+0,7	87	1,36E+07	2,93E-04	2,16E-11	39,4
МАТ10935	171+0,8	101	5,68E+06	4,94E-04	8,69E-11	23,4
МАТ10936	161+ 1,0	94	3,81E+06	6,75E-05	1,77E-11	171,1
МАТ10937	141+0,6	85	4,47E+06	5,74E-05	1,29E-11	201,2
МАТ10938	172+1,2	76	3,78E+05	6,56E-05	1,73E-10	176,1
МАТ10939	169+0,6	92	1,06E+06	1,65E-04	1,55E-10	70,0
МАТ10940	136+0,6	85	5,54E+06	5,04E-05	9,10E-12	229,2
МАТ10941	164+0,8	100	8,02E+05	8,01E-05	1,00E-10	144,2
МАТ10954	142,4 ± 0,8	105	3,02E+06	1,12E-04	3,69E-11	103,1
МАТ10955	146,8 ± 0,7	91	1,92E+06	3,88E-04	2,02E-10	29,8
МАТ10956	136,6 ± 0,4	91	2,17E+06	3,42E-04	1,58E-10	33,8
МАТ10957	137,7 ± 1,2	100	1,55E+06	7,19E-05	4,63E-11	160,6
МАТ10964	122,5 ± 0,3	84	1,05E+07	1,26E-04	1,20E-11	91,7
МАТ10965	125,7 ± 1	81	1,42E+06	3,38E-04	2,37E-10	34,2
МАТ10966	137,3 ± 1,1	92	2,45E+06	9,93E-05	4,05E-11	116,3
МАТ10967	123,3 ± 0,9	81	1,45E+06	3,33E-05	2,29E-11	346,8
МАТ10969	149,1 ± 1	97	8,11E+05	1,41E-04	1,74E-10	81,9
МАТ10970	149,9 ± 0,6	102	2,18E+06	4,20E-04	1,92E-10	27,5
МАТ10971	136,1 ± 0,8	90	2,37E+06	9,41E-05	3,97E-11	122,7
МАТ10977	145,8 ± 0,7	93	2,50E+06	1,07E-04	4,28E-11	107,9
МАТ10982	125,5 ± 0,8	74	1,23E+06	2,58E-04	2,10E-10	44,8
МАТ10984	158,4 ± 0,7	110	2,07E+06	8,36E-05	4,04E-11	138,2
МАТ10985	151,8 ± 0,7	87	9,36E+06	3,75E-04	4,01E-11	30,8

мАт10986	125 ± 0,7	83	4,59E+06	5,79E-05	1,26E-11	199,5
мАт10987	131,5 ± 0,7	87	5,04E+06	3,90E-04	7,75E-11	29,6
мАт10988	138,6 ± 0,5	82	8,34E+06	7,90E-04	9,47E-11	14,6
мАт10989	146,1 ± 0,6	92	1,38E+07	3,65E-04	2,65E-11	31,6
мАт10996	142,9 ± 0,4	72	9,35E+05	2,47E-03	2,64E-09	4,7
мАт10998	125,5 ± 0,8	74	8,79E+05	1,97E-02	2,24E-08	0,6
мАт11000	151,8 ± 0,7	87	1,63E+06	2,71E-04	1,66E-10	42,6
мАт11002	158,4 ± 0,7	110	5,06E+05	1,65E-02	3,26E-08	0,7
мАт11004	125 ± 0,7	83	1,01E+06	1,18E-04	1,17E-10	97,9
мАт11006	131,5 ± 0,7	87	3,88E+05	7,65E-05	1,97E-10	151,0
мАт11008	138,6 ± 0,5	82	4,64E+05	4,05E-04	8,72E-10	28,5
мАт11010	146,1 ± 0,6	92	1,59E+06	8,02E-05	5,05E-11	144,0
мАт1932	128 ± 0,3	5	Н/С	Н/С	Н/С	Н/С

Пример 14: Антитела против SARS-CoV-2 блокируют связывание RBD с hACE2 согласно определению с помощью твердофазного ИФА.

[000231] Анализ блокирования на основе твердофазного ИФА использовали для определения способности антител против SARS-CoV-2 блокировать связывание рецепторсвязывающего домена (RBD) белка шипов SARS-CoV-2 с его рецептором - ангиотензин-превращающим ферментом 2 человека (hACE2).

[000232] Белок SARS-CoV-2, использованный в данном анализе, состоял из фрагмента рецепторсвязывающего домена (RBD) белка шипов SARS-CoV-2 (аминокислоты от Arg319 до Phe541), экспрессированного с С-концевым Fc-фрагментом IgG1 человека (RBD-hFc SARS-CoV-2). Белок ACE2 человека, используемый в экспериментах, приобрели в R&D Systems, он состоял из аминокислот от Gln18 до Ser740 с С-концевым 10X-гистиридиновым маркером (hACE2-His; номер доступа в NCBI Q9BYF1).

[000233] Эксперименты выполняли в соответствии со следующей процедурой. Моноклональное антитело против пента-His (Qiagen) наносили на 96-луночный титрационный микропланшет в концентрации 1 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4 °С. Рецептор hACE2-His добавляли в концентрации 0,2 мкг/мл в PBS и связывали в течение двух часов при комнатной температуре (КТ). Затем блокировали сайты неспецифического связывания с использованием 0,5% (мас./об.) раствора БСА в PBS. В других титрационных микропланшетах постоянное количество, равное 100 пМ белка RBD-hFc SARS-CoV-2 связывали с антителами против SARS-COV-2 и антителом изотипического контроля IgG1, разбавленными PBS +0,5% БСА до концентраций от 0,0008 нМ до 50 нМ. Растворы смесей после часового инкубирования переносили на титрационный микропланшет с иммобилизованным hACE2-His. После 1,5 часов инкубирования при комнатной температуре лунки промывали, а связанный с планшетом SARS-CoV2 обнаруживали с

помощью антитела козы против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ) (Jackson). Затем планшеты проявляли с использованием раствора субстрата ТМБ (BD Biosciences, № 555214) в соответствии с рекомендациями производителя, и измеряли оптическую плотность при 450 нм на планшет-ридере Victor X5.

[000234] Данные связывания анализировали с использованием сигмоидальной модели зависимости реакции от дозы в программном обеспечении Prism™ (GraphPad). Рассчитанное значение IC50, определяемое как концентрация антитела, необходимая для 50% снижения связывания RBD-hFc SARS-CoV-2 с hACE2-His, иммобилизованным на планшете, использовали в качестве индикатора эффективности блокирования. Процент блокирования определяли на основе сигнала связывания с поправкой на фоновое значение, наблюдаемого при максимальной концентрации антитела, проанализированной с использованием этой формулы, и регистрировали для всех анализируемых антител:

$$\text{Блокирован}\% = 100 - \left(\frac{[\text{Экспериментальный сигнал}_{(\text{максимальная конц. Ат})} - \text{фоновый сигнал}_{(\text{буфер})}]}{[\text{Максимальный сигнал}_{(\text{только hEGF.mFc})} - \text{фоновый сигнал}_{(\text{буфер})}]} \right) \cdot 100$$

[000235] Антитела, блокировавшие связывание на 50% или менее при максимальной проанализированной концентрации, классифицировали как неблокирующие, и значения IC50 для этих антител не регистрировали.

[000236] Способность антител против SARS-CoV-2 блокировать связывание RBD SARS-CoV-2 с ACE2 человека оценивали с использованием твердофазного ИФА блокирования. В этом анализе 100 пМ RBD-hFc SARS-CoV-2 титровали с широким диапазоном концентраций антитела против SARS-CoV-2-S и оценивали ингибирование связывания RBD с hACE2-His в присутствии антитела. RBD-hFc, связанный с планшетом, выявляли с помощью антитела против hFc, конъюгированного с ПХ.

[000237] Сводные данные об IC50 блокирования и максимальном блокировании при наибольших проанализированных концентрациях антител против SARS-CoV-2-S приведены в таблице 33, а кривые блокирования показаны на фигурах 1-8. 44 из 46 проанализированных антител демонстрировали блокирование связывания RBD.hFc с hACE-2 в зависимости от концентрации. Значения IC50 варьировались от 41 пМ до 4,5 нМ, а значения максимального блокирования - от 55% до приблизительно 100% при наивысшей проанализированной концентрации антитела. Два антитела из 46 проанализированных не проявили блокирующей активности в условиях анализа. Неспецифичное контрольное изотипическое антитело не демонстрировало блокирующей активности, как и ожидалось.

Таблица 33: Блокирующая способность антител против SAR-COV-2 в отношении связывания RBD-hFc белка шипов с иммобилизованным ACE-2 человека

мАт	№ цикла анализа	Блокирование связывания 100 пМ (RBD).hFc с ACE2, IC ₅₀ , М	Блокирование связывания 100 пМ (RBD).hFc с ACE2, % блокирования

mAtI0913	1	2,17E-10	80
mAtI0914	1	9,80E-10	93
mAtI0915	1	3,21E-10	99
mAtI0920	1	3,38E-10	95
mAtI0920	3	1,39E-10	87
mAtI0921	1	4,33E-10	99
mAtI0921	3	5,07E-10	94
mAtI0922	2	6,65E-11	97
mAtI0923	1	1,49E-10	94
mAtI0923	3	1,84E-10	85
mAtI0924	1	1,63E-10	98
mAtI0924	2	1,27E-10	98
mAtI0930	2	2,82E-10	86
mAtI0932	1	3,73E-10	99
mAtI0933	1	7,07E-11	99
mAtI0933	3	6,53E-11	95
mAtI0933	2	5,22E-11	101
mAtI0934	1	6,60E-11	96
mAtI0934	3	5,97E-11	98
mAtI0934	2	4,80E-11	96
mAtI0935	1	1,02E-10	99
mAtI0935	2	6,94E-11	98
mAtI0936	1	8,75E-11	95
mAtI0936	2	7,10E-11	97
mAtI0937	1	6,49E-11	99
mAtI0938	1	2,75E-10	99
mAtI0939	1	1,75E-10	97
mAtI0939	3	2,63E-10	93
mAtI0940	1	6,52E-11	92
mAtI0941	1	2,27E-10	100
mAtI0941	2	2,06E-10	100
mAtI0954	2	7,11E-11	95
mAtI0955	2	1,41E-10	97
mAtI0956	2	1,85E-10	99

мАтI0957	2	1,69E-10	99
мАтI0964	3	6,83E-11	93
мАтI0964	2	6,25E-11	95
мАтI0965	2	2,13E-10	97
мАтI0966	2	1,60E-10	99
мАтI0967	2	2,80E-10	98
мАтI0969	3	2,15E-10	95
мАтI0970	2	1,07E-10	97
мАтI0971	2	1,49E-10	98
мАтI0977	3	8,71E-11	77
мАтI0977	2	7,11E-11	65
мАтI0982	2	1,16E-10	93
мАтI0984	2	7,75E-11	90
мАтI0985	3	6,96E-11	97
мАтI0985	2	4,11E-11	99
мАтI0986	2	7,54E-11	98
мАтI0987	3	2,85E-10	93
мАтI0987	2	1,81E-10	95
мАтI0988	2	8,64E-11	95
мАтI0989	3	5,91E-11	96
мАтI0989	2	4,28E-11	98
мАтI0996	3	6,10E-09	71
мАтI0998	3	4,30E-09	55
мАтI1000	3	4,50E-09	75
мАтI1002	3	Н/Б	7
мАтI1004	3	Н/Б	9
мАтI1006	3	2,20E-10	85
мАтI1008	3	1,49E-09	93
мАтI1010	3	1,47E-10	83
мАтI93250, контрольное IgG1	1	--	-8
мАтI93250, контрольное IgG1	3	--	-19
мАтI93250,	2	--	-15

контрольное IgG1			
------------------	--	--	--

Примечание: RBD-hFc в концентрации 100 пМ титровали антителами против SARS-CoV-2-S в последовательных разведениях от 50 нМ, связанный RBD-hFc на иммобилизованном hACE2 с 10х гистиридиновым маркером обнаруживали с помощью антитела против hFc, конъюгированного с ПХ. Н/Б - блокирование не обнаружено.

Пример 15: Перекрестная конкуренция между mAt10987, mAt10989, mAt10933 и mAt10934

[000238] mAt10987, mAt10989, mAt10933 и mAt10934 исследовали в анализах перекрестного конкурентного связывания (фигура 11), выявив несколько пар неконкурирующих mAt с пикомолярной нейтрализующей способностью, которые можно объединять, получая смеси антител, например, mAt10987 и mAt0933.

[000239] Объединение эпитопов mAt против SARS-CoV-2-S выполняли в сэндвич-формате с предварительным смешиванием с участием конкурирующих mAt, попарно комбинируя их друг с другом при связывании с белком RBD-MMH SARS-CoV-2 с использованием прибора для интерферометрии биослоя ForteBio Octet HTX (Molecular Devices ForteBio LLC, Фремонт, Калифорния, США) с рабочим буфером 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% (об./об.) Tween-20, pH 7,4, 1 мг/мл БСА. Анализы выполняли при температуре 30 °C и непрерывном перемешивании при 1000 об/мин. После получения начального базового сигнала в рабочем буфере 20 мкг/мл выполняли захват mAt против COVID19 на наконечниках биосенсоров с антителом против Fc человека (АНС) в течение 300 с. Для блокировки оставшихся свободных ненасыщенных сайтов связывания на АНС-наконечниках биосенсоров все сенсоры подвергали воздействию блокирующего раствора, содержащего 100 мкг/мл неспецифичного IgG1, в течение 240 с. После этого биосенсоры погружали в лунки, содержащие раствор предварительно смешанного 100 нМ белка SARS CoV-2 RBD-MMH и 600 нМ сайта связывания второго mAt на mAt против COVID19, на 300 с. На каждом этапе регистрировали ответ связывания, специфичный сигнал нормировали путем вычитания самоблокирующегося контрольного конкурентного mAt из набора данных. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis HT 10.0 с использованием процедуры Epitope Binning (Объединение эпитопов).

[000240] Сравнение анализов перекрестного конкурентного связывания с результатами HDX-MS, описанными выше, обеспечило структурное понимание механизма, с помощью которого неконкурентные пары антител могут одновременно связывать RBD и, таким образом, могут являться идеальными партнерами для терапевтической смеси антител. mAt10987 и mAt10933 представляют такую пару антител. Мишенью mAt10933 является область шиповидной петли на одном крае поверхности взаимодействия с ACE2. Внутри этой области остатки, демонстрирующие наиболее значимую защиту HDX при использовании mAt10933, обращены вверх, что позволяет предположить, что область Fab mAt10933 связывало RBD с верхнего направления, где mAt10933 значимо конфликтовало с ACE2. Во избежание конкуренции с mAt10933, mAt10987 связывалось только с определенными посредством HDX защищенными областями спереди или снизу-слева

(фигура 12, вид спереди на мАт10987). Это согласуется с вышеописанными данными нейтрализации, поскольку мАт10987 может располагаться в положении, которое с высокой вероятностью создает помехи для ACE2.

Пример 16: Определение структуры белка шипов, связанного с антителами

[000241] Для лучшего понимания связывания мАт10933 и мАт10987 с RBD белка шипов выполнили структурный анализ с помощью криоэлектронной микроскопии (криоЭМ). Fab-фрагменты мАт10933 и мАт10987 выделяли с использованием набора FabALACTICA (Genovis). 600 мкг Fab мАт10933 и 600 мкг Fab мАт10987 смешивали с 300 мкг RBD SARS-CoV-2-S и инкубировали на льду в течение ~1 часа, затем вводили в колонку для усиленной гель-фильтрации Superdex 200, уравновешенную до 50 mM трис, pH 7,5, 150 mM NaCl. Фракции пиков, содержащие комплекс Fab мАт10933 - Fab мАт10987 - RBD, собирали и концентрировали с использованием центробежного фильтра с MWCO 10 кДа. Для получения решетки криоЭМ образец белка разбавляли до 1,5 мг/мл и добавляли 0,15% Amphipol PMAL-C8. 3,5 мкл белка наносили на решетку UltrAufoil, непосредственно перед этим очищенную плазмой (1,2/1,3, 300 ячеек/дюйм). Избыток раствора удаляли фильтровальной бумагой и погружали в замороженном виде в жидкий этан с помощью Vitrobot Mark IV. Решетку криоЭМ переносили на Titan Krios (Thermo Fisher), оборудованный детектором K3 (Gatan). Фильмы собирали с использованием EPU (Thermo Fisher) при 105000-кратном увеличении, что соответствовало размеру пикселя 0,85 Å. Использовали мощность дозы 15 электронов на пиксель в секунду, продолжительность каждой видеозаписи составляла 2 секунды, что соответствует общей дозе ~40 электронов на Å².

[000242] Всю обработку данных криоЭМ выполняли с использованием cryoSPARC версии 2.14.2. 2821 видеозапись выровняли с использованием коррекции движения фрагментов и оценки CTF фрагментов. 2197 выровненных микрофотографий отобрали для дальнейшей обработки на основе расчетных значений расфокусировки и разрешений CTF-подгонки. Первоначальный набор частиц, выбранных с помощью средства выбора мелких объектов, подвергали 2D классификации для создания шаблонов для выбора шаблона. 989553 частицы, отобранные путем отбора шаблона, подвергли многократным циклам 2D-классификации для удаления несвязанных FAB и частиц, содержащих неполный комплекс. Реконструкция ab initio с тремя классами привела к получению одного класса, содержавшего 61707 частиц, которые соответствовали комплексу мАт10933 Fab - мАт10987 Fab - RBD. Гетерогенное уточнение частиц этого класса с последующим неоднородным уточнением привело к получению карты с разрешением 3,9 Å (FSC=0,143), содержащей 48140 частиц, которую использовали для построения модели. На эту карту вручную помещали модели RBD (взятые из PDB, код 6M17) и двух Fab (взятых из предшествующих структур антител, за исключением легкой лямбда-цепи мАт10987, которую получили из PDB кода 5U15). Затем эти модели вручную перестроили с помощью Coot и уточнили в реальном пространстве, сравнивая их с картой с помощью Phenix.

[000243] Подтверждая вышеописанные данные, криоЭМ одиночных частиц

комплекса RBD шипов SARS-CoV-2, связанного с Fab-фрагментами мАт10933 и мАт10987, показала, что два антитела в этой смеси могут одновременно связываться с разными областями RBD (фигура 13А, фигура 13В и фигура 14). 3D реконструированная карта комплекса с номинальным разрешением 3,9 Å показывает, что оба Fab-фрагмента связывались с разными эпитопами на RBD, подтверждая, что они не являются конкурирующими антителами. мАт10933 связывалось в верхней части RBD, в значительной степени перекрывая сайт связывания ACE2. С другой стороны, эпитоп для мАт10987 был расположен на боковой части RBD, вдали от эпитопа мАт10933, и практически не перекрывался с сайтом связывания ACE2.

Пример 17: Перекрестная конкуренция между мАт против SARS-CoV-2-S

[000244] Конкуренцию за связывание между моноклональными антителами против SARS-CoV-2-S определяли с помощью безметочной биослойной интерферометрии в реальном времени на платформе биосенсора Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент выполняли при 25°C в буфере 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл БСА, pH 7,4 (HBS-EBT) при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Для оценки того, способны ли два мАт конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами на внеклеточном домене RBD SARS-COV-2-S, экспрессируемом с С-концевым мус-мус-гексагистиридиновым маркером (RBD-MMH SARS-COV-2), ~0,51 нм RBD-MMH SARS-COV-2-S вначале захватывали на наконечниках биосенсора Octet, покрытых антителом против пента-His (ForteBio Inc, № 18-5122), путем погружения наконечников биосенсора на 1 минуту в лунки, содержащие 10 мкг/мл раствора RBD-MMH SARS-COV-2-S. Захватившие RBD-MMH SARS-COV-2-S наконечники биосенсора затем насыщали первым моноклональным антителом против SARS-CoV-2-S (в дальнейшем обозначаемым как мАт-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора мАт-1, на 5 минут. Затем наконечники биосенсора погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального антитела против SARS-CoV-2 (в дальнейшем обозначаемого как мАт-2), на 5 минут. Наконечники биосенсора промывали в буфере HBS-ET после каждой стадии эксперимента. Реакцию связывания в реальном времени отслеживали в течение всего эксперимента, регистрируя ответ при связывании в конце каждой стадии. Реакцию связывания мАт-2 с RBD-MMH SARS-COV-2, предварительно образовавшим комплекс с мАт-1, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител против SARS-CoV-2, как показано в таблице 34.

Таблица 34: Перекрестная конкуренция между антителами против SARS-CoV-2-S

мАт-1	мАт-2, конкурирующее с мАт-1
мАт10977	мАт10924

	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт11002
	мАт10933
	мАт10940
	мАт10922
	мАт11004
	мАт10937
	мАт10936

МАТ10924	МАТ10934
	МАТ10977
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955

	МАТ10954
	МАТ10933
	МАТ11000
	МАТ10985
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10989	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982

	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ10933
	МАТ10987
	МАТ10940
	МАТ10922
	МАТ11004
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10920	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932

	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10933
	МАТ10987
	МАТ10940
	МАТ10922
	МАТ11004
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10913	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964

	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10933
	МАТ11004
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10923	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989

	мАт10920
	мАт10913
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт10933
	мАт11004

	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10930	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967

	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10933
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10969	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982

	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10933
	МАТ10985
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
	МАТ10977
	МАТ10924
МАТ10988	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957

	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ10933
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10964	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938

	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10933
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10996	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984

	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт10933
	мАт10985
	мАт10934
мАт10966	мАт10977
	мАт10924
	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988

	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10933
	МАТ10985
	МАТ10934
МАТ10998	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913

	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт10985
	мАт10936
мАт10984	мАт10977
	мАт10924

	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт10985

МАТ11006

МАТ10977
МАТ10924
МАТ10989
МАТ10920
МАТ10913
МАТ10923
МАТ10930
МАТ10969
МАТ10988
МАТ10964
МАТ10996
МАТ10966
МАТ10998
МАТ10984
МАТ10921
МАТ10971
МАТ10938
МАТ10932
МАТ10970
МАТ10957
МАТ10956
МАТ10941
МАТ10939
МАТ10935
МАТ10914
МАТ10982
МАТ11008
МАТ10915
МАТ10965
МАТ10967
МАТ10986
МАТ10955
МАТ10954

	мАт11002
	мАт10933
	мАт10985
мАт10921	мАт10977
	мАт10924
	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967

	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
МАТ10971	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915

	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
МАТ10938	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982

	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
МАТ10932	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935

	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
МАТ10970	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941

	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
	МАТ10936
МАТ10957	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932

	МАТ10970
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
МАТ10956	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971

	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
МАТ10941	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006

	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт10985
мАт10939	мАт10977
	мАт10924
	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998

	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
мАт10935	мАт11002
	мАт10977
	мАт10924
	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966

	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
МАТ10914	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964

	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10933
	МАТ10985
МАТ10982	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930

	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт10985
мАт11008	мАт10977
	мАт10924
	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913

	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт10933
	мАт10985
мАт10915	мАт10924
	мАт10989

	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ11002
	МАТ10985
МАТ10965	МАТ10924

	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт10985

МАТ10967

МАТ10924
МАТ10989
МАТ10920
МАТ10913
МАТ10923
МАТ10930
МАТ10969
МАТ10988
МАТ10964
МАТ10996
МАТ10966
МАТ10998
МАТ10984
МАТ11006
МАТ10921
МАТ10971
МАТ10938
МАТ10932
МАТ10970
МАТ10957
МАТ10956
МАТ10941
МАТ10939
МАТ10935
МАТ10914
МАТ10982
МАТ11008
МАТ10915
МАТ10965
МАТ10986
МАТ10955
МАТ10954
МАТ11002

МАТ10986	МАТ10985
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10955
	МАТ10954

МАТ10955	МАТ11002
	МАТ10985
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986

	мАт10954
	мАт11002
	мАт10985
мАт10954	мАт10924
	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10998
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10939
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967

МАТ11002	МАТ10986
	МАТ10955
	МАТ11002
	МАТ10985
	МАТ10977
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ10998
	МАТ10984
	МАТ11006
	МАТ10921
	МАТ10971
	МАТ10938
	МАТ10932
	МАТ10970
	МАТ10957
	МАТ10956
	МАТ10941
	МАТ10939
	МАТ10935
	МАТ10914
	МАТ10982
	МАТ11008
	МАТ10915
	МАТ10965
	МАТ10967
	МАТ10986

	МАТ10955
	МАТ10954
	МАТ10933
	МАТ10985
	МАТ10936
МАТ10933	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10930
	МАТ10969
	МАТ10988
	МАТ10964
	МАТ10996
	МАТ10966
	МАТ11006
	МАТ10914
	МАТ11008
	МАТ11002
	МАТ11000
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ11000	МАТ10924
	МАТ10933
	МАТ10985
	МАТ11010
МАТ10985	МАТ10924
	МАТ10969
	МАТ10996
	МАТ10966

	мАт10998
	мАт10984
	мАт11006
	мАт10921
	мАт10971
	мАт10938
	мАт10932
	мАт10970
	мАт10957
	мАт10956
	мАт10941
	мАт10935
	мАт10914
	мАт10982
	мАт11008
	мАт10915
	мАт10965
	мАт10967
	мАт10986
	мАт10955
	мАт10954
	мАт11002
	мАт11000
	мАт11010
мАт11010	мАт11000
	мАт10985
мАт10987	мАт10989
	мАт10920
	мАт10940
	мАт10922
	мАт11004
	мАт10937
	мАт10936

	МАТ10934
МАТ10940	МАТ10977
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10987
	МАТ10922
	МАТ11004
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10922	МАТ10977
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10987
	МАТ10940
	МАТ11004
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ11004	МАТ10977
	МАТ10989
	МАТ10920
	МАТ10913
	МАТ10923
	МАТ10987
	МАТ10940
	МАТ10922
	МАТ10937
	МАТ10936
	МАТ10934
МАТ10937	МАТ10977
	МАТ10924
	МАТ10989

	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10933
	мАт10987
	мАт10940
	мАт10922
	мАт11004
	мАт10936
	мАт10934
	мАт10977
	мАт10924
мАт10936	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10998
	мАт10970
	мАт11002
	мАт10933
	мАт10987
	мАт10940
	мАт10922
	мАт11004
	мАт10937
	мАт10934
мАт10934	мАт10977

	мАт10924
	мАт10989
	мАт10920
	мАт10913
	мАт10923
	мАт10930
	мАт10969
	мАт10988
	мАт10964
	мАт10996
	мАт10966
	мАт10933
	мАт10987
	мАт10940
	мАт10922
	мАт11004
	мАт10937
	мАт10936

Пример 18: pH-чувствительность моноклональных антител против SARS-CoV-2-S, связывающихся с мономерными реагентами RBD SARS-CoV-2-S, измеренная при 37 °C

[000245] Константы скорости диссоциации (k_d) для различных моноклональных антител против SARS-CoV-2-S в буферах с pH 7,4, pH 6,0 и pH 5,0 определяли с использованием биосенсора Biacore T200 на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в реальном времени. Все исследования связывания выполняли при 37°C с использованием трех рабочих буферов: (i) PBS, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (PBS-T-pH 7,4) (ii) PBS, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 6,0 (PBS-T-pH 6,0) и (iii) PBS, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 5,0 (PBS-T-pH 5,0). Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 вначале модифицировали путем присоединения через амин мАт мыши против Fc человека (Regeneron) для захвата моноклональных антител против SARS-CoV-2-S. Исследования связывания выполняли на примере внеклеточного домена RBD SARS-COV-2-S человека, экспрессируемого с С-концевым тус-тус-гексагистиридиновым маркером (RBD-ММН SARS-COV-2). Единичные концентрации RBD-ММН SARS-COV-2-S (90 нМ) в буфере PBS-T-pH 7,4 вводили при скорости потока 25 мкл/мин в течение 3 минут с последующей диссоциацией связанного RBD-ММН SARS-COV-2-S в рабочих буферах PBS-T-pH 7,4,

PBS-T-pH 6,0 или PBS-T-pH 5,0 в течение 5 минут.

[000246] Константы скорости диссоциации (k_d) в четырех рабочих буферах с различными pH определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в реальном времени моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0с. Период диссоциативного полураспада ($t^{1/2}$) рассчитывали по значениям k_d следующим образом:

$$t^{1/2} \text{ (мин)} = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

[000247] Значения k_d и $t^{1/2}$ для связывания RBD-ММН SARS-COV-2-S с различными моноклональными антителами против SARS-CoV-2-S в PBS-T-pH 7,4 с последующей диссоциацией в PBS-T-pH 7,4 и PBS-T-pH 6,0 при 37°C показаны в таблице 35. Значения k_d и $t^{1/2}$ для связывания RBD-ММН SARS-COV-2-S с различными моноклональными антителами против SARS-CoV-2-S в PBS-T-pH 7,4 с последующей диссоциацией в PBS-T-pH 7,4 и PBS-T-pH 5,0 при 37°C показаны в таблице 36. Сравнение периода полураспада ($t^{1/2}$) RBD-ММН SARS-COV-2 в буферах с pH 7,4, pH 6,0 и pH 5,0.

Таблица 35: Связывание RBD-ММН SARS-COV-2-S с моноклональными антителами против SARS-CoV-2-S в буфере PBS-T-pH 7,4 и диссоциация в буфере PBS-T-pH 7,4 и pH 6,0 при 37 °С.

Захваченное мАт	Рабочий буфер: PBS-T, pH 7,4 при 37 °С.				Рабочий буфер: PBS-T, переход к pH 6,0 при 37 °С				Соотношен ие t ^{1/2}
	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывание 90 нМ RBD.mmh (ЕО)	kd (1/с)	t ^{1/2} (мин)	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывани е 90 нМ RBD.mmh (ЕО)	kd (1/с)	t ^{1/2} (мин)	pH 7,4 / pH 6,0
мАт10913	427	69	4,30E-02	0,3	421	67	4,38E-02	0,3	1
мАт10914	388	69	9,41E-03	1,2	386	62	1,16E-02	1	1,2
мАт10915	319	84	7,43E-04	15,5	312	88	1,51E-03	7,7	2
мАт10932	432	133	6,60E-04	17,5	438	131	1,28E-03	9	1,9
мАт10933	360	124	7,85E-03	1,5	353	119	8,53E-03	1,4	1,1
мАт10934	341	107	1,74E-02	0,7	334	108	2,11E-02	0,5	1,2
мАт10935	407	76	2,78E-02	0,4	404	72	1,71E-02	0,7	0,6
мАт10936	381	124	5,29E-03	2,2	375	120	8,69E-03	1,3	1,6
мАт10937	330	94	2,09E-02	0,6	323	98	2,09E-02	0,6	1
мАт10924	385	111	5,69E-03	2	379	110	1,20E-02	1	2,1
мАт10938	407	95	1,05E-03	11	407	90	2,99E-03	3,9	2,8
мАт10940	343	119	1,08E-02	1,1	339	127	1,04E-02	1,1	1
мАт10941	398	129	1,65E-03	7	396	127	2,04E-03	5,7	1,2

мАт10920	383	79	2,47E-02	0,5	380	73	5,39E-02	0,2	2,2
мАт10921	345	89	1,79E-03	6,5	339	92	2,01E-02	0,6	11,3
мАт10923	355	87	2,35E-02	0,5	349	88	2,43E-02	0,5	1
мАт10939	410	90	9,48E-03	1,2	412	83	1,18E-02	1	1,2
мАт10922	251	85	9,07E-03	1,3	240	92	9,61E-03	1,2	1,1
мАт10930	377	50	1,92E-02	0,6	372	46	1,67E-02	0,7	0,9
мАт10982	389	79	9,90E-03	1,2	387	74	7,72E-03	1,5	0,8
мАт10984	378	133	1,71E-03	6,8	370	135	1,94E-03	5,9	1,1
мАт10985	457	172	3,63E-03	3,2	464	172	3,19E-03	3,6	0,9
мАт10986	413	155	6,29E-04	18,4	411	152	1,24E-03	9,3	2
мАт10987	379	105	2,37E-02	0,5	372	109	1,83E-02	0,6	0,8
мАт10988	467	109	4,35E-02	0,3	469	103	5,37E-02	0,2	1,2
мАт10989	382	126	9,32E-03	1,2	375	119	7,36E-03	1,6	0,8
мАт10970	340	93	7,65E-03	1,5	334	96	6,37E-03	1,8	0,8
мАт10971	350	125	9,44E-04	12,2	342	125	1,27E-03	9,1	1,3
мАт10964	380	140	1,94E-03	6	379	137	2,51E-03	4,6	1,3
мАт10965	290	65	8,66E-03	1,3	281	70	9,47E-03	1,2	1,1

мАт10966	417	152	1,60E-03	7,2	409	149	1,41E-03	8,2	0,9
мАт10967	372	118	2,98E-04	38,8	367	115	3,45E-04	33,5	1,2
мАт10954	336	118	1,74E-03	6,6	331	124	2,70E-03	4,3	1,6
мАт10955	404	100	1,22E-02	0,9	403	97	1,46E-02	0,8	1,2
мАт10956	452	114	1,25E-02	0,9	446	106	1,50E-02	0,8	1,2
мАт10957	388	136	5,80E-04	19,9	382	140	7,67E-04	15,1	1,3
мАт10977	293	44	1,59E-02	0,7	285	44	3,39E-02	0,3	2,1
мАт10969	340	72	1,86E-02	0,6	336	71	1,01E-02	1,1	0,5
мАт10996	408	35	4,69E-02	0,2	405	37	4,37E-02	0,3	0,9
мАт10998	308	20	2,86E-02	0,4	307	19	2,84E-02	0,4	1
мАт11002	373	10	2,60E-02	0,4	368	4	5,91E-03	2	0,2
мАт11000	404	88	1,48E-03	7,8	403	90	2,85E-03	4,1	1,9
мАт11004	356	97	1,47E-02	0,8	353	96	2,09E-02	0,6	1,4
мАт11006	398	105	1,46E-03	7,9	398	98	1,98E-03	5,8	1,4
мАт11008	341	112	1,33E-03	8,7	338	118	1,28E-03	9	1
мАт11010	432	157	3,90E-03	3	431	156	7,51E-03	1,5	1,9
Изотипический контроль	430	4	Н/С	Н/С	427	9	Н/С	Н/С	Н/С

Таблица 36: Связывание RBD-ММН SARS-COV-2-S с моноклональными антителами против SARS-CoV-2 в буфере PBS-T pH 7,4 и диссоциация в буфере PBS-T pH 7,4 и pH 5,0 при 37 °С.

Захваченное мАт	Рабочий буфер: PBS-T, pH 7,4 при 37 °С.				Рабочий буфер: PBS-T, переход к pH 5,0 при 37 °С				Соотношение t½
	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывание 90 нМ RBD.mmh (ЕО)	kd (1/с)	t½ (мин)	Уровень захвата мАт (ЕО)	Связывание 90 нМ RBD.mmh (ЕО)	kd (1/с)	t½ (мин)	pH 7,4 / pH 5,0
мАт10913	427	69	4,30E-02	0,3	430	65	3,53E-02	0,3	0,8
мАт10914	388	69	9,41E-03	1,2	391	57	1,00E-02	1,2	1,1
мАт10915	319	84	7,43E-04	15,5	316	94	2,05E-03	5,6	2,8
мАт10932	432	133	6,60E-04	17,5	452	131	2,11E-03	5,5	3,2
мАт10933	360	124	7,85E-03	1,5	353	114	1,14E-02	1	1,5
мАт10934	341	107	1,74E-02	0,7	338	109	1,71E-02	0,7	1
мАт10935	407	76	2,78E-02	0,4	413	70	1,28E-02	0,9	0,5
мАт10936	381	124	5,29E-03	2,2	379	116	1,60E-02	0,7	3
мАт10937	330	94	2,09E-02	0,6	326	104	1,55E-02	0,7	0,7
мАт10924	385	111	5,69E-03	2	390	113	1,48E-02	0,8	2,6
мАт10938	407	95	1,05E-03	11	417	82	7,61E-03	1,5	7,2
мАт10940	343	119	1,08E-02	1,1	341	135	8,23E-03	1,4	0,8
мАт10941	398	129	1,65E-03	7	407	128	2,21E-03	5,2	1,3

мАт10920	383	79	2,47E-02	0,5	382	68	2,93E-02	0,4	1,2
мАт10921	345	89	1,79E-03	6,5	345	100	5,46E-02	0,2	30,6
мАт10923	355	87	2,35E-02	0,5	357	90	2,13E-02	0,5	0,9
мАт10939	410	90	9,48E-03	1,2	419	78	1,14E-02	1	1,2
мАт10922	251	85	9,07E-03	1,3	240	102	8,08E-03	1,4	0,9
мАт10930	377	50	1,92E-02	0,6	383	44	1,20E-02	1	0,6
мАт10982	389	79	9,90E-03	1,2	391	66	6,27E-03	1,8	0,6
мАт10984	378	133	1,71E-03	6,8	378	140	2,33E-03	5	1,4
мАт10985	457	172	3,63E-03	3,2	471	170	3,36E-03	3,4	0,9
мАт10986	413	155	6,29E-04	18,4	417	148	3,18E-03	3,6	5,1
мАт10987	379	105	2,37E-02	0,5	377	115	8,80E-03	1,3	0,4
мАт10988	467	109	4,35E-02	0,3	492	103	6,98E-02	0,2	1,6
мАт10989	382	126	9,32E-03	1,2	379	105	6,13E-03	1,9	0,7
мАт10970	340	93	7,65E-03	1,5	341	102	6,02E-03	1,9	0,8
мАт10971	350	125	9,44E-04	12,2	352	129	1,70E-03	6,8	1,8
мАт10964	380	140	1,94E-03	6	379	132	3,02E-03	3,8	1,6
мАт10965	290	65	8,66E-03	1,3	284	77	7,40E-03	1,6	0,9

мАт10966	417	152	1,60E-03	7,2	422	151	1,25E-03	9,2	0,8
мАт10967	372	118	2,98E-04	38,8	377	114	4,05E-04	28,5	1,4
мАт10954	336	118	1,74E-03	6,6	335	132	5,33E-03	2,2	3,1
мАт10955	404	100	1,22E-02	0,9	416	96	1,85E-02	0,6	1,5
мАт10956	452	114	1,25E-02	0,9	462	101	2,18E-02	0,5	1,7
мАт10957	388	136	5,80E-04	19,9	390	146	7,93E-04	14,6	1,4
мАт10977	293	44	1,59E-02	0,7	287	46	4,81E-02	0,2	3
мАт10969	340	72	1,86E-02	0,6	344	69	1,33E-02	0,9	0,7
мАт10996	408	35	4,69E-02	0,2	415	42	9,02E-02	0,1	1,9
мАт10998	308	20	2,86E-02	0,4	311	21	2,32E-02	0,5	0,8
мАт11002	373	10	2,60E-02	0,4	371	1	7,15E-04	16,2	0
мАт11000	404	88	1,48E-03	7,8	411	96	2,46E-03	4,7	1,7
мАт11004	356	97	1,47E-02	0,8	362	98	2,70E-02	0,4	1,8
мАт11006	398	105	1,46E-03	7,9	411	93	2,10E-03	5,5	1,4
мАт11008	341	112	1,33E-03	8,7	340	127	1,10E-03	10,5	0,8
мАт11010	432	157	3,90E-03	3	440	156	7,15E-03	1,6	1,8
Изотипический контроль	430	4	Н/С	Н/С	435	15	Н/С	Н/С	Н/С

Пример 19: Связывание антител против SARS-CoV-2-S с вирусоподобными частицами

[000248] С целью исследования способности панели моноклональных антител против SARS-CoV-2-S связывать гликопротеин шипов SARS-CoV-2 разработали анализ связывания *in vitro* с использованием вируса везикулярного стоматита (VSV), спевдотипированного по белку шипов SARS-CoV-2, на платформе обнаружения на основе электрохемилюминесценции (MSD).

[000249] Вирусоподобные частицы (VLP) псевдотипированного вируса везикулярного стоматита (VSV) получали из клеток HEK293T для временной экспрессии белка шипов SARS-CoV-2 (номер доступа MN908947.3, аминокислоты 16-1211). Кроме того, получили VLP, экспрессирующие только VSV, в качестве отрицательного контроля связывания.

[000250] Эксперименты выполняли в соответствии со следующей процедурой. Вышеописанные VLP из двух источников разбавляли PBS, высевали в 96-луночные планшеты с углеродными электродами (MULTI-ARRAY high-bind plate, MSD) и инкубировали в течение ночи при 4 °C, обеспечивая адгезию VLP. Сайты неспецифического связывания блокировали 2% (масс./об.) БСА в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). К связанным с планшетом частицам добавляли антитела против SARS-CoV-2 и несвязывающий контрольный IgG1 человека, разбавленные PBS+0,5% БСА, в диапазоне концентраций от 0,0008 нМ до 50 нМ, добавляли буфер без антител в двух повторностях и инкубировали планшеты в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Затем планшеты промывали 1X PBS для удаления несвязанных антител с использованием устройства для промывки планшетов AquaMax2000 (MDS Analytical Technologies). Связанные с планшетом антитела обнаруживали с использованием антитела против IgG человека, конъюгированного с SULFO-TAGTM (Jackson ImmunoResearch), в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания планшеты проявляли с помощью буфера для считывания (MSD) в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем, и регистрировали люминесцентные сигналы с помощью прибора SECTOR Imager 600 (Meso Scale Development). Сигналы прямого связывания (в RLU) регистрировали для VLP, экспрессирующих SARS-CoV-2, и VLP, содержащих только VSV.

[000251] Способность моноклональных антител против SARS-CoV-2-S связываться с VLP, экспрессирующими SARS-CoV-2-S, по сравнению со связыванием с неспецифическими VLP, экспрессирующими VSV, оценивали с помощью анализа иммунологического связывания. Связывание с иммобилизованными VLP на 96-луночных планшетах High Bind (MSD) выполняли с использованием серии разведений антитела, причем связанные антитела обнаруживали с использованием антитела против IgG человека, конъюгированного с SULFO-TAGTM. Электрохемилюминесцентные сигналы связывания регистрировали на Sector Imager 600 (MSD). Значения RLU определяли для связывания антител с VLP. Все антитела демонстрировали связывание в зависимости от концентрации,

и отношения связывания VLP, экспрессирующих SARS-COV-2-S, и VLP, содержащих только VSV, анализировали при 5,5 нМ и 0,20 нМ.

[000252] Сводные результаты связывания мАт против SARS-CoV-2-S в двух концентрациях с VLP, экспрессирующими VSV/spike и только VSV, приведены в таблице 37. 44 из 46 проанализированных антител специфично связывались с VSV/spike, причем отношением к VSV составляло 3 или более при любой концентрации. При 0,2 нМ антитела соотношение VSV/spike к VSV составляло от 3 до 56, а при 5 нМ - от 3 до 303. Хотя два антитела (мАт10998 и мАт11002) демонстрировали слабое связывание с VLP VSV/Spikes, при значении отношения к VLP VSV менее 3, их сигналы при концентрации 5 нМ были выше для VSV/spike, чем для VSV. Неспецифичное изотипическое IgG1-антитело, как и ожидалось, демонстрировало минимальное связывание.

Таблица 37: Специфичность связывания антител против SARS-COV-2-S с VLP VSV, экспрессирующими белок шипов, по сравнению с VSV, при использовании электрохемилюминесценции

	Сигнал связывания антитела (RLU)				Соотношение		
	5,5 нМ		0,20 нМ		5,5 нМ	0,20 нМ	
Концентрация антитела							
№ мАт	VSV/ Spike	VSV	VSV/ Spike	VSV	VSV/ Spike:VSV	VSV/ Spike:VSV	№ эксперимента
мАт10913	1140	302	434	51	4	9	1
мАт10914	6139	1823	911	85	3	11	1
мАт10915	16763	702	2868	77	24	37	1
мАт10920	7757	2536	1332	102	3	13	3
мАт10921	8174	705	938	89	12	11	3
мАт10922	1458	129	562	39	11	6	2
мАт10923	1444	132	446	33	11	14	3
мАт10924	1922	353	375	57	5	7	1
мАт10930	1488	291	429	38	5	4	2
мАт10932	11774	105	1282	35	113	37	1
мАт10933	631	82	446	29	8	16	1
мАт10934	1099	124	648	29	9	22	1
мАт10935	2526	387	611	47	7	13	1
мАт10936	5087	228	1702	41	22	42	1
мАт10937	1056	204	374	43	5	9	1
мАт10938	11418	395	1223	37	29	33	1

МАТ10939	4656	637	948	99	7	10	3
МАТ10940	947	58	384	34	16	11	1
МАТ10941	7297	69	958	17	106	56	1
МАТ10954	9727	205	2114	48	47	8	2
МАТ10955	2189	270	397	55	8	6	2
МАТ10956	1006	373	263	71	3	6	2
МАТ10957	10624	127	1606	68	84	11	2
МАТ10964	14252	47	9486	26	303	24	2
МАТ10965	1039	87	279	58	12	14	2
МАТ10966	9176	97	1406	88	95	15	2
МАТ10967	10744	122	1090	32	88	8	2
МАТ10969	1163	334	262	42	3	6	3
МАТ10970	5640	76	1061	50	74	13	2
МАТ10971	7995	60	1372	27	134	20	2
МАТ10977	26895	4283	9330	165	6	2	2
МАТ10982	1875	220	427	36	9	6	2
МАТ10984	9142	195	2270	33	47	9	2
МАТ10985	1497	90	529	65	17	8	2
МАТ10986	11155	177	2315	65	63	11	2
МАТ10987	1146	168	699	53	7	8	2
МАТ10988	967	163	438	39	6	4	2
МАТ10989	2195	128	1533	66	17	13	2
МАТ10996	812	309	82	65	3	1	3
МАТ10998	2253	1590	122	104	1	1	3
МАТ11000	580	139	94	47	4	2	3
МАТ11002	419	283	47	50	1	1	3
МАТ11004	1061	56	386	28	19	14	3
МАТ11006	26528	6299	7159	247	4	29	3
МАТ11008	508	48	80	28	11	3	3
МАТ11010	349	64	96	30	5	3	3
Изотипический контроль IgG1	113	84	32	21	1	2	1
Изотипический контроль IgG1	167	127	75	35	1	2	3

Изотипический контроль IgG1	94	99	99	31	1	1	2
-----------------------------	----	----	----	----	---	---	---

Пример 20: Связывание антител против SARS-CoV-2-S с клетками, экспрессирующими белок шипов

[000253] С целью исследования способности панели моноклональных антител против SARS-CoV-2-S связывать клетки, экспрессирующие SARS-CoV-2-S, разработали анализ связывания *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих SARS-CoV-2-S, на платформе обнаружения на основе электрохемилюминесценции (MSD).

[000254] Индуцируемые клетки Jurkat/Tet3G/hCD20/Tet-3G модифицировали с целью временной экспрессии белка шипов SARS-CoV-2 (номер доступа MN908947.3, аминокислоты 16-1211, Jurkat/Tet3G/hCD20/Tet-On 3G Inducible SARS-CoV-2 Spike Protein High Sorted), и подвергали проточно-цитометрической сортировке для отбора клеток с высокой степенью экспрессии белка SARS-CoV-2. Исходные клетки Jurkat/Tet3G/hCD20/Tet-3G также включали в эксперименты в качестве отрицательного контроля связывания.

[000255] Эксперименты выполняли в соответствии со следующей процедурой. Клетки двух линий, описанных выше, индуцировали 1 мкг/мл доксициклина при 37°C в течение 36 часов перед сбором, центрифугировали, промывали PBS, затем разбавляли PBS, засекали в 96-луночные планшеты с угольными электродами (MULTI-ARRAY high-bind plate, MSD), и инкубировали в течение ночи при 4 °C, обеспечивая адгезию клеток. Сайты неспецифического связывания блокировали 2% (масс./об.) БСА в PBS в течение часа при комнатной температуре (КТ). К связанным с планшетом клеткам добавляли антитела против SARS-CoV-2 и несвязывающий контрольный IgG1 человека, разбавленные PBS+0,5% БСА, в диапазоне концентраций от 0,0008 нМ до 50 нМ, добавляли буфер без антител в двух повторностях и инкубировали планшеты в течение одного часа при комнатной температуре при встряхивании. Затем планшеты промывали 1X PBS для удаления несвязанных антител с использованием устройства для промывки планшетов AquaMax2000 (MDS Analytical Technologies). Связанные с планшетом антитела обнаруживали с использованием антитела против IgG человека, конъюгированного с SULFO-TAGTM (Jackson ImmunoResearch), в течение часа при комнатной температуре. После промывания планшеты проявляли с помощью буфера для считывания (MSD) в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем, и регистрировали люминесцентные сигналы с помощью прибора SECTOR Imager 600 (Meso Scale Development). Сигналы прямого связывания (в RLU) регистрировались для клеток, экспрессирующих SARS-CoV-2-S, и клеточной линии для отрицательного контроля.

[000256] Способность моноклональных антител против SARS-CoV-2 связываться с клетками, экспрессирующими белок шипов SARS-CoV-2, по сравнению со связыванием с исходными клетками оценивали с помощью анализа иммунологического связывания. Связывание с иммобилизованными клетками на 96-луночных планшетах High Bind (MSD) выполняли с использованием серии разведений антитела, причем связанные антитела

обнаруживали с использованием антитела против IgG человека, конъюгированного с SULFO-TAGTM. Электрохемилюминесцентные сигналы связывания регистрировали на Sector Imager 600 (MSD). Все антитела демонстрировали связывание в зависимости от концентрации, и отношения связывания клеток, экспрессирующих белок шипов, и исходных клеток анализировали при 5,5 нМ и 0,20 нМ.

[000257] Сводные результаты связывания мАт против SARS-COV-2-S в двух концентрациях с клетками, экспрессирующими белок шипов, и исходными клетками Jurkat приведены в таблице 38. 44 из 46 проанализированных антител специфично связывались с клетками Jurkat/spike (клетки Jurkat/Tet3G/hCD20/Tet-On 3G Inducible SARS-CoV-2 Spike Protein High Sorted) с соотношением к родительским клеткам, равным 4 или выше при любой концентрации. При концентрации 0,2 нМ отношение сигналов связывания с клетками Jurkat/spike и исходными клетками составляло от 4 до 36, а при 5 нМ это соотношение составляло от 4 до 63. Хотя два антитела (мАт10998 и мАт11002) демонстрировали слабое связывание с клетками Jurkat/spike при отношении связывания с исходными клетками менее 4, при 5 нМ сигналы связывания были выше для Jurkat/spike, чем для исходных клеток. Неспецифичное изотипическое IgG1-антитело, как и ожидалось, демонстрировало минимальное связывание.

Таблица 38: Специфичность связывания антител против SARS-CoV-2-S с клетками Jurkat, экспрессирующими белок шипов, по сравнению с исходными клетками при использовании электрохемилюминесценции

	Сигнал связывания антитела (RLU)				Соотношение	
Концентрация антитела	5,5 нм		0,2 нм		5,5 нм	0,2 нм
№ МАТ	Jurkat/ Spike	Исходные	Jurkat/ Spike	Исходные	Jurkat/Spike: исходные	Jurkat/Spike: исходные
МАТ10913	907	174	576	36	5	16
МАТ10914	1624	569	262	64	3	4
МАТ10915	1814	217	269	42	8	6
МАТ10920	3501	597	1970	80	6	25
МАТ10921	3746	272	436	60	14	7
МАТ10922	399	63	225	22	6	10
МАТ10923	2561	103	1137	46	25	25
МАТ10924	1418	121	336	24	12	14
МАТ10930	673	151	175	25	4	7
МАТ10932	1525	65	206	29	23	7
МАТ10933	898	171	671	73	5	9
МАТ10934	762	146	697	46	5	15

МАТ10935	1572	209	513	28	8	19
МАТ10936	995	116	567	28	9	21
МАТ10937	867	95	388	30	9	13
МАТ10938	1678	165	195	30	10	7
МАТ10939	3195	292	901	119	11	8
МАТ10940	657	51	291	19	13	16
МАТ10941	1196	37	192	33	33	6
МАТ10954	929	110	327	46	8	7
МАТ10955	750	134	274	28	6	10
МАТ10956	801	136	214	42	6	5
МАТ10957	846	76	211	48	11	4
МАТ10964	896	37	724	20	24	36
МАТ10965	681	49	135	69	14	2
МАТ10966	969	65	245	53	15	5
МАТ10967	928	121	168	26	8	6
МАТ10969	2793	124	774	35	23	22
МАТ10970	743	59	246	57	13	4
МАТ10971	839	42	263	23	20	12
МАТ10977	2031	975	604	76	2	8
МАТ10982	737	117	211	25	6	8
МАТ10984	889	95	282	26	9	11
МАТ10985	527	63	179	65	8	3
МАТ10986	1050	92	341	33	11	10
МАТ10987	632	83	471	31	8	15
МАТ10988	367	83	272	41	4	7
МАТ10989	778	62	778	38	13	20
МАТ10996	1399	172	185	27	8	7
МАТ10998	1277	393	128	65	3	2
МАТ11000	1745	70	261	22	25	12
МАТ11002	241	160	30	36	2	1
МАТ11004	2031	48	748	34	43	22
МАТ11006	5052	1055	1044	70	5	15
МАТ11008	2382	38	237	50	63	5

мАт11010	387	52	140	33	8	4
Изотипический контроль IgG1	95	34	62	22	3	3
Изотипический контроль IgG1	58	65	21	48	1	0
Изотипический контроль IgG1	64	73	118	62	1	2

Таблица 39: Последовательности, исключенные из перечня последовательностей в формате ST.26

SEQ ID NO:	Последовательность
13	gacaataat
14	DNN
33	aaggcgtct
34	KAS
54	Gctgcatcc
55	AAS
110	tgggcatct
111	WAS
148	ggtgtatcc
149	GVS
193	gatgcatcc
194	DAS
293	ggtgcatcc
294	GAS
443	gctgcctcc
460	aaggcatct
583	ggtaacagc
584	GNS
631	ggtaacacc
632	GNT
649	gatgtcagt
650	DVS
669	agtaataat

670	SNN
819	actgcatcc
820	TAS

[000258] Все цитируемые в настоящем документе литературные источники включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, запись в базе данных (например, последовательности Genbank или записи GeneID), заявка на патент или патент были явным образом и отдельно указаны для включения посредством ссылки. Авторы настоящей заявки подразумевают, что указанное заявление о включении посредством ссылки предназначено для обращения к каждой отдельной публикации, записи в базе данных (например, последовательностям Genbank или записям GeneID), заявке на патент или патенту, даже если такая ссылка не является непосредственно смежной со специальным заявлением о включении посредством ссылки. Включение в описание специальных заявлений о включении посредством ссылки, при наличии таковых, никоим образом не ослабляет указанное общее заявление о включении посредством ссылки. Цитирование литературных источников в настоящем документе не предназначено в качестве признания того, что литературный источник относится к предшествующему уровню техники, и не является признанием содержания или даты этих публикаций или документов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает белок шипа SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, где указанное выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 646.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое содержит:

- (a) константную область иммуноглобулина;
- (b) константную область IgG1; или
- (c) константную область человеческого IgG1.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или п.2, которое содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 654.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, которое содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 656.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент:

- (a) является мультиспецифичным; и/или
- (b) представляет собой рекомбинантное антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5; и
- ii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

7. Полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает белок шипа SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, где указанная HCVR включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 640.

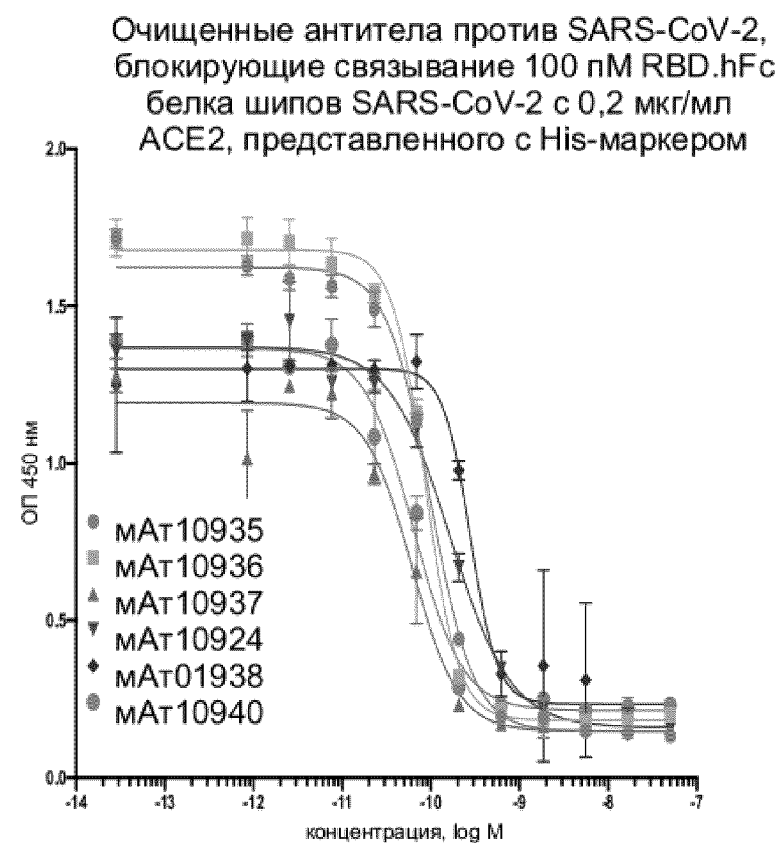
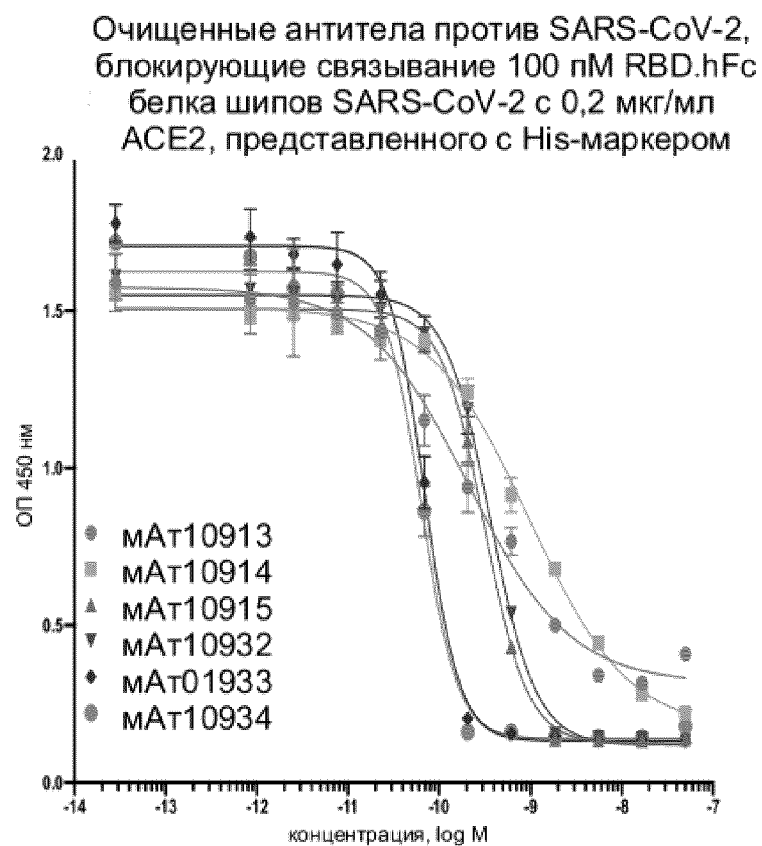
8. Полинуклеотид по п.7, где указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты HCVR, представленную в SEQ ID NO: 639.

9. Полинуклеотид по п.7, где указанное антитело дополнительно содержит константную область иммуноглобулина.

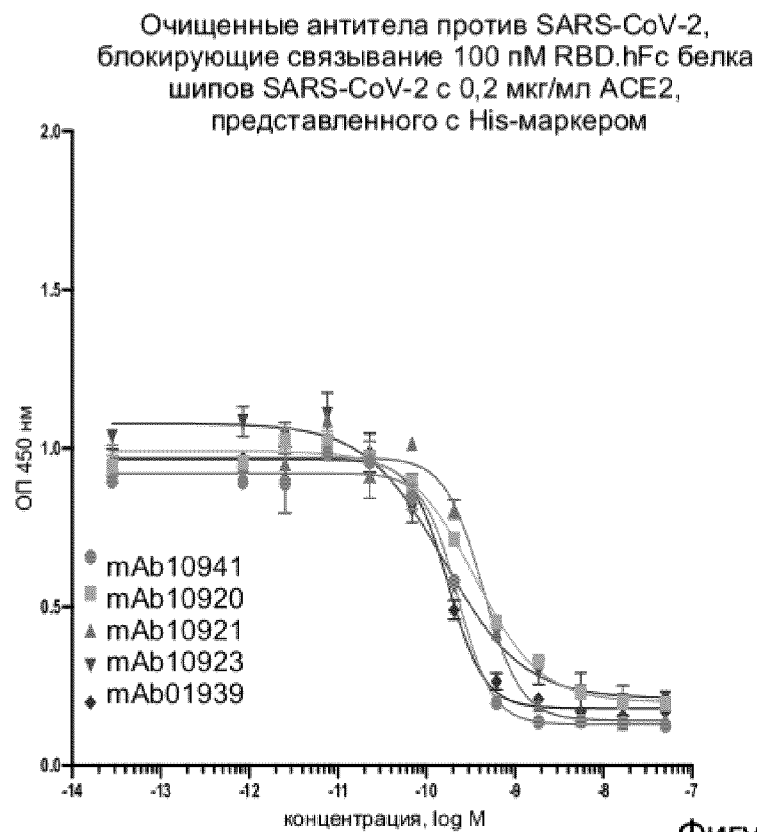
10. Полинуклеотид по п.9, где указанная константная область иммуноглобулина представляет собой константную область IgG1.

11. Полинуклеотид по п.7, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 654.
12. Полинуклеотид по п.7, где указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 653.
13. Полинуклеотид по п.7, где указанный полинуклеотид представляет собой полинуклеотид РНК.
14. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.7.
15. Вектор по п.14, где указанный вектор представляет собой лентивирусный вектор или вектор на основе аденоассоциированного вируса.
16. Липидная наночастица, содержащая полинуклеотид по п.7.
17. Полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи (LCVR) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывает белок шипа SARS-CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 832, где указанная LCVR включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 646.
18. Полинуклеотид по п.17, где указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты LCVR, представленную в SEQ ID NO: 645.
19. Полинуклеотид по п. 17, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 656.
20. Полинуклеотид по п.19, где указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 655.
21. Полинуклеотид по п.17, где указанный полинуклеотид представляет собой полинуклеотид РНК.
22. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.17.
23. Вектор по п.22, где указанный вектор представляет собой лентивирусный вектор или вектор на основе аденоассоциированного вируса.
24. Липидная наночастица, содержащая полинуклеотид по п.17.

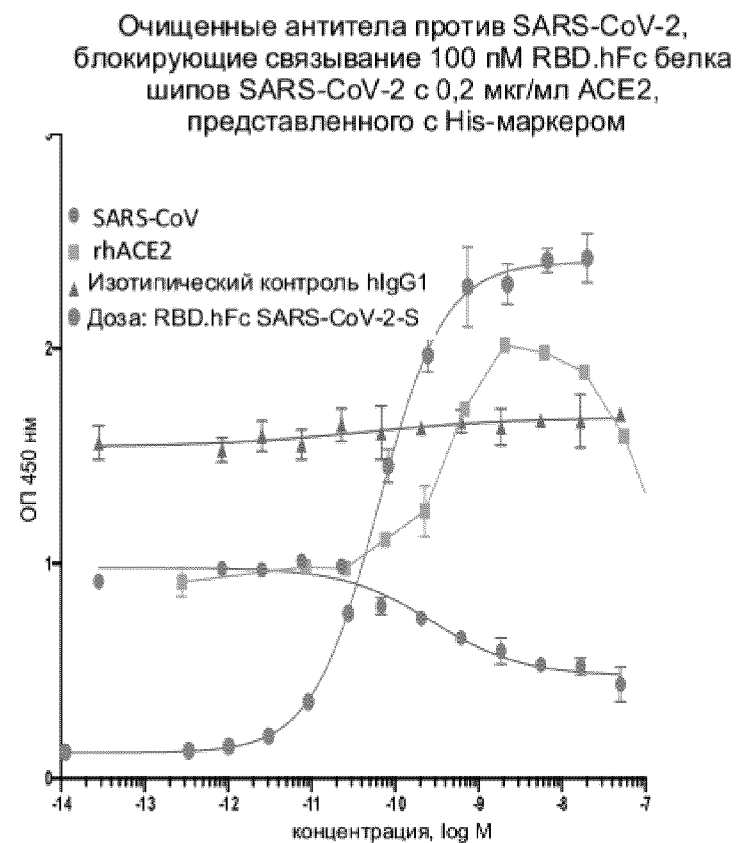
По доверенности



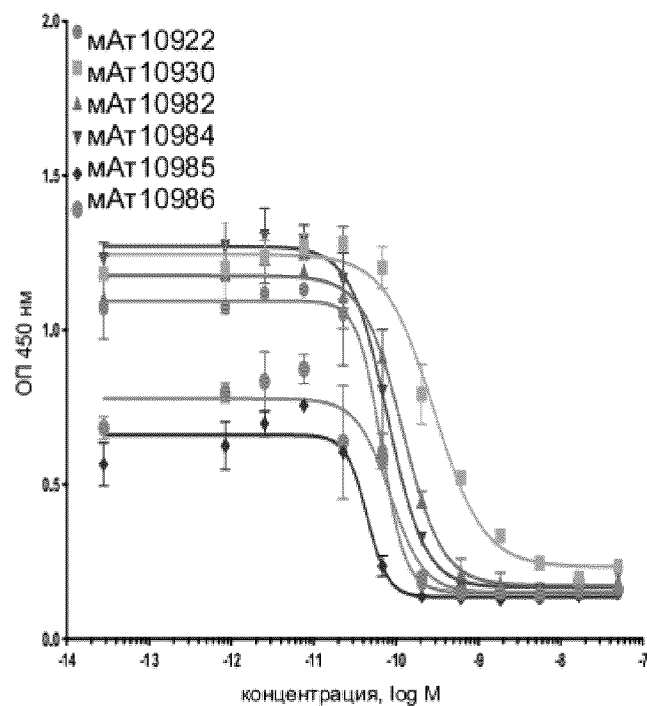
Фигура 1



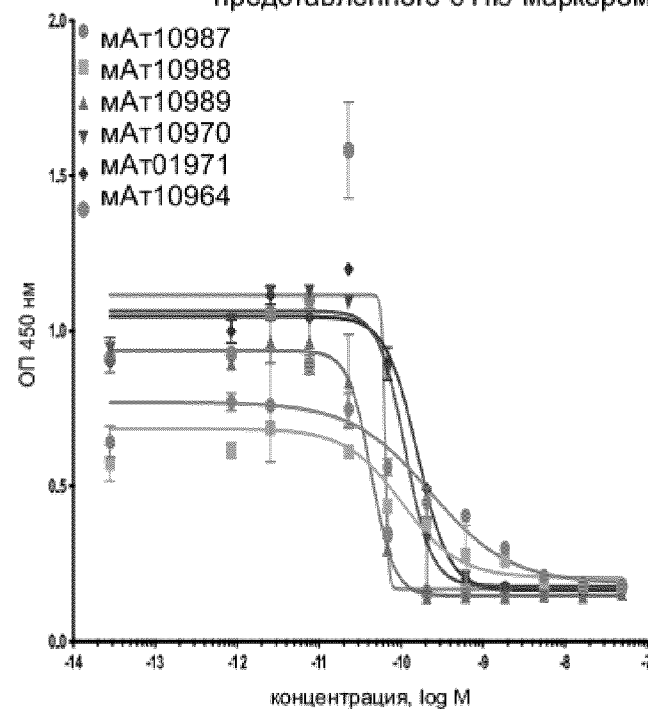
Фигура 2



Очищенные антитела против SARS-CoV-2,
блокирующие связывание 100 пМ RBD.hFc белка
шипов SARS-CoV-2 с 0,2 мкг/мл ACE2,
представленного с His-маркером

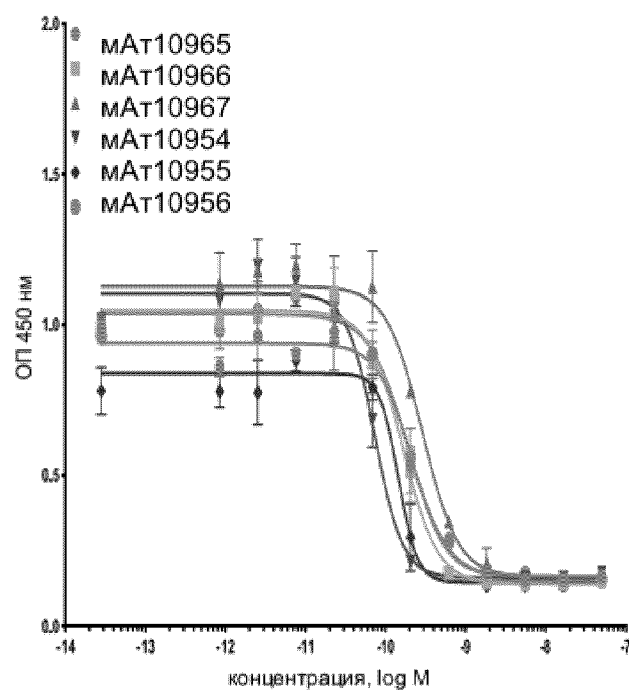


Очищенные антитела против SARS-CoV-2,
блокирующие связывание 100 пМ RBD.hFc белка
шипов SARS-CoV-2 с 0,2 мкг/мл ACE2,
представленного с His-маркером

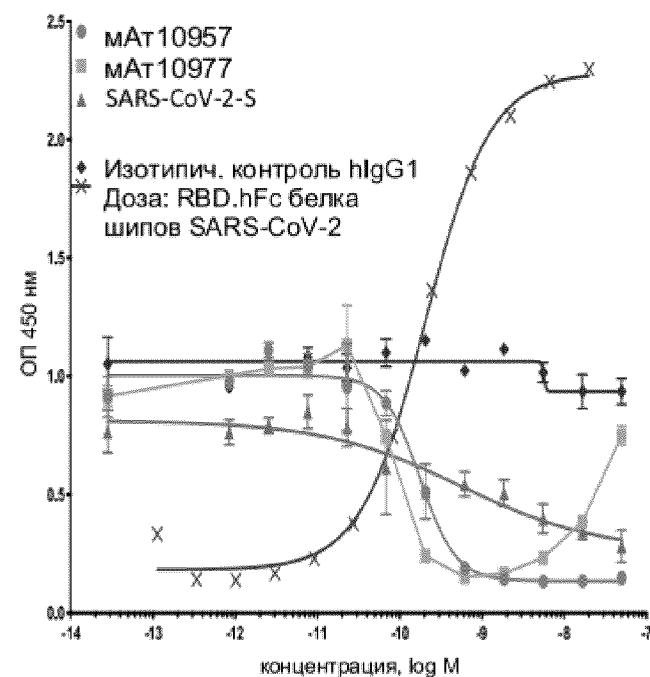


Фигура 3

Очищенные антитела против SARS-CoV-2,
блокирующие связывание 100 пМ RBD.hFc белка
шипов SARS-CoV-2 с 0,2 мкг/мл ACE2,
представленного с His-маркером

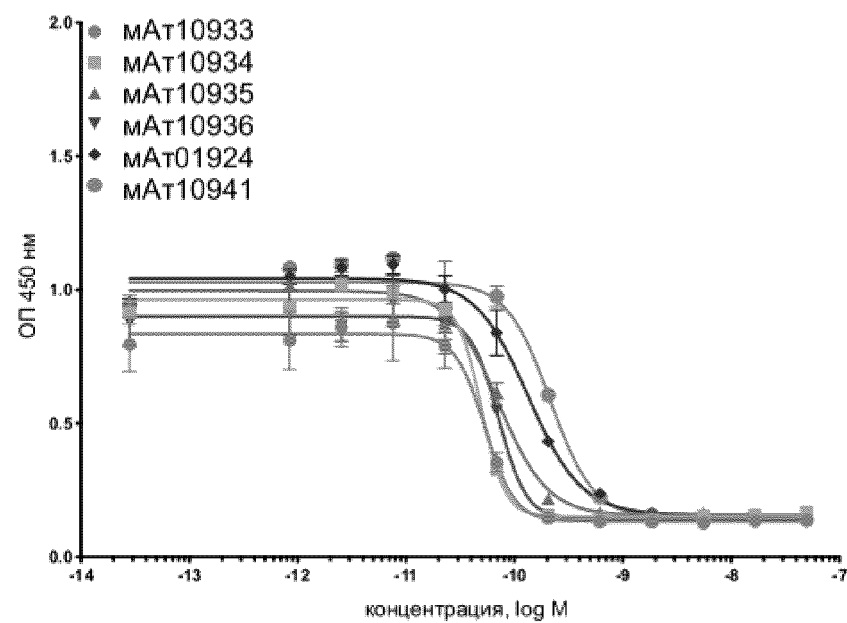


Очищенные антитела против SARS-CoV-2,
блокирующие связывание 100 пМ RBD.hFc белка
шипов SARS-CoV-2 с 0,2 мкг/мл ACE2,
представленного с His-маркером



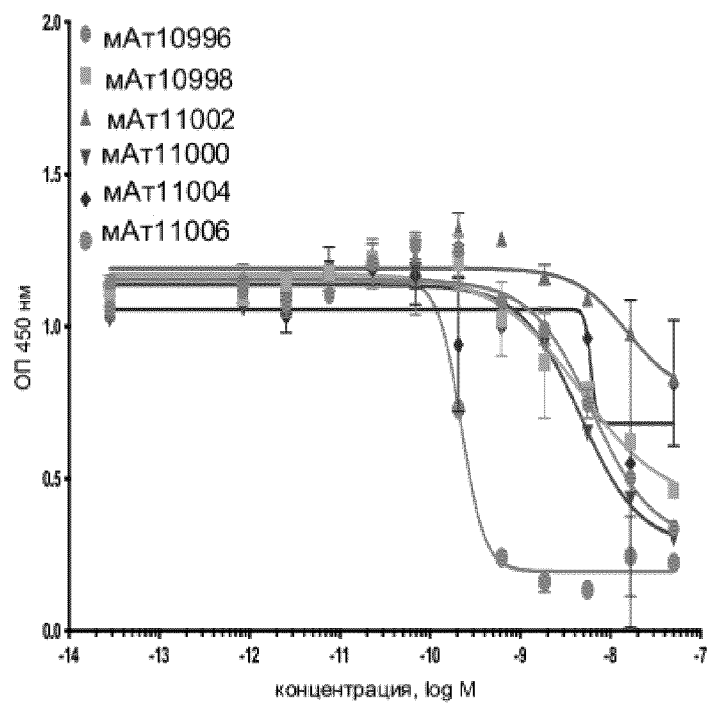
Фигура 4

Очищенные антитела против SARS-CoV-2,
блокирующие связывание 100 пМ RBD.hFc белка
шипов SARS-CoV-2 с 0,2 мкг/мл ACE2,
представленного с His-маркером

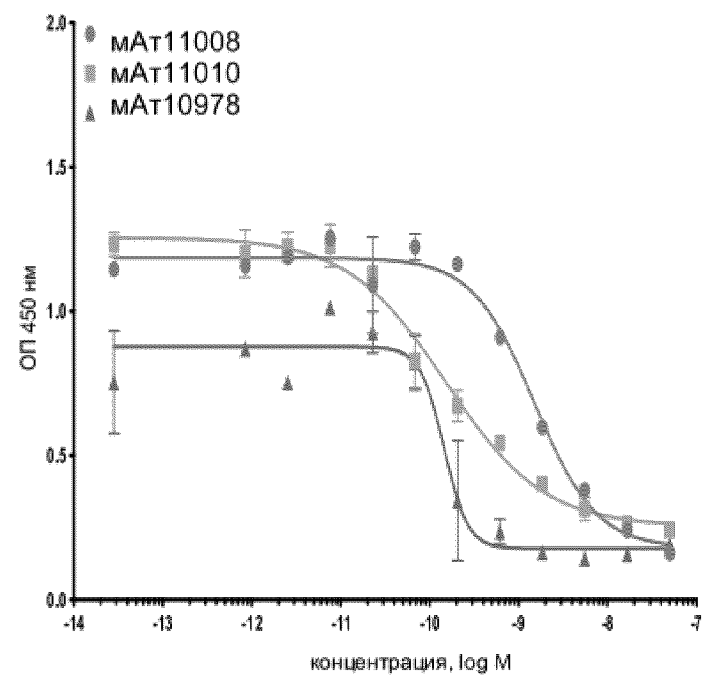


Фигура 5

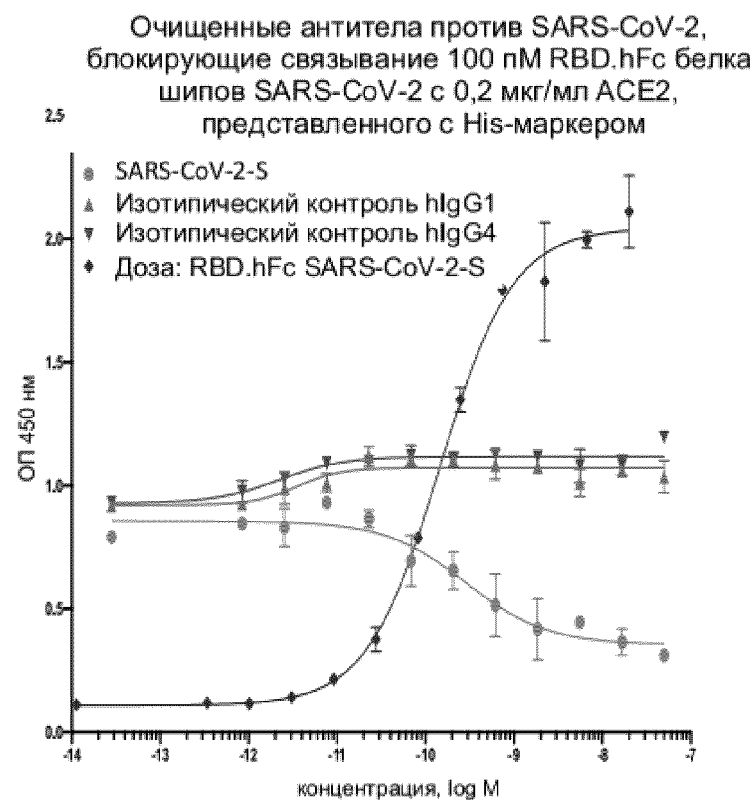
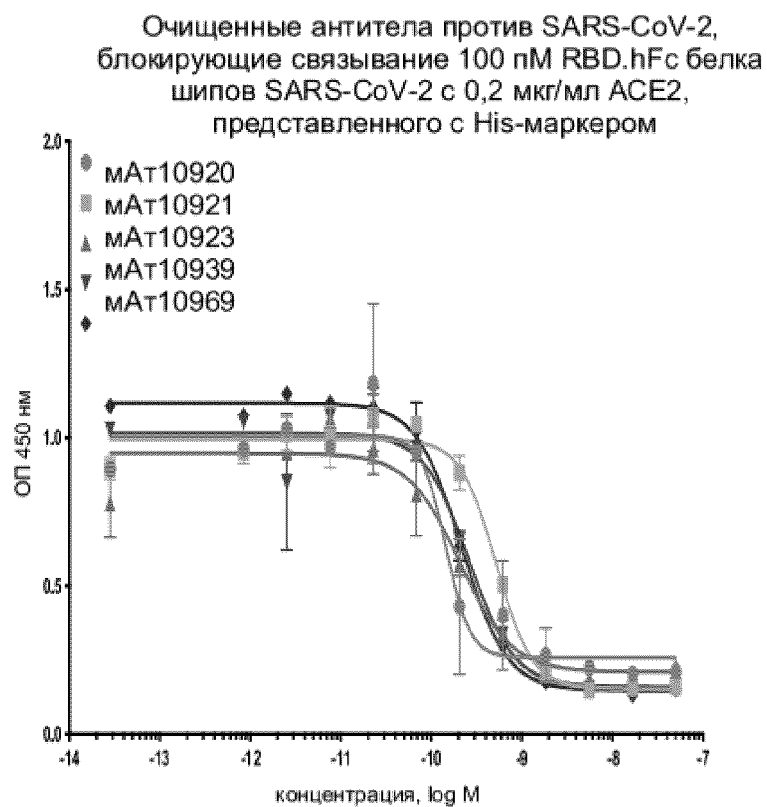
Очищенные антитела против SARS-CoV-2,
блокирующие связывание 100 пМ RBD.hFc белка
шипов SARS-CoV-2 с 0,2 мкг/мл ACE2,
представленного с His-маркером



Очищенные антитела против SARS-CoV-2,
блокирующие связывание 100 пМ RBD.hFc белка
шипов SARS-CoV-2 с 0,2 мкг/мл ACE2,
представленного с His-маркером

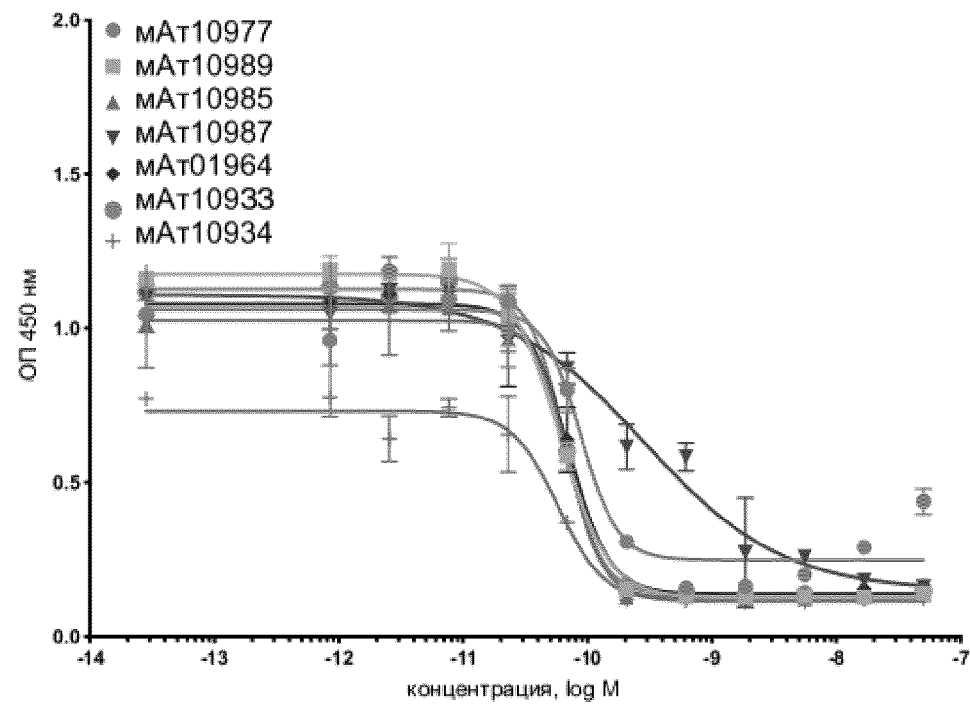


Фигура 6

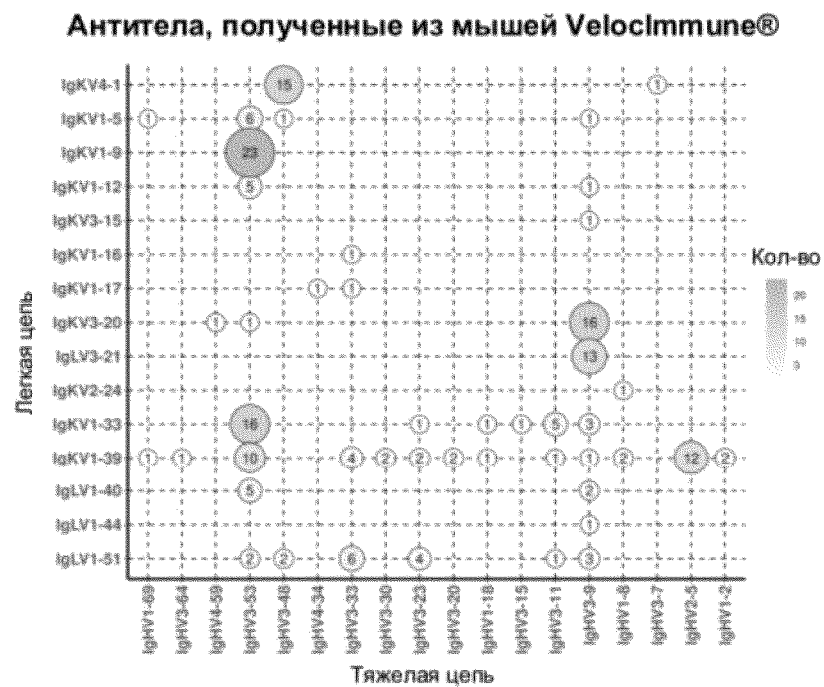


Фигура 7

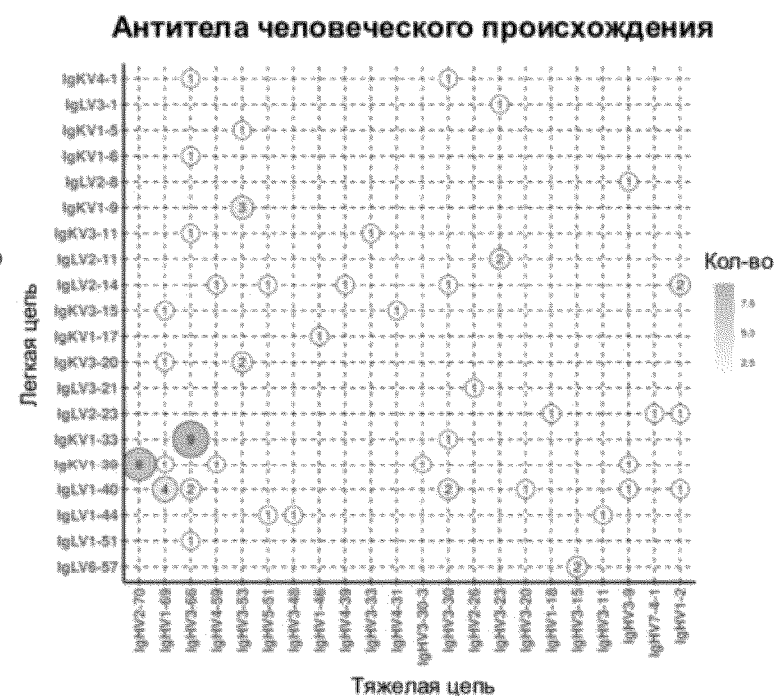
Очищенные антитела против SARS-CoV-2,
блокирующие связывание 100 пМ RBD.hFc белка
шипов SARS-CoV-2 с 0,2 мкг/мл ACE2,
представленного с His-маркером



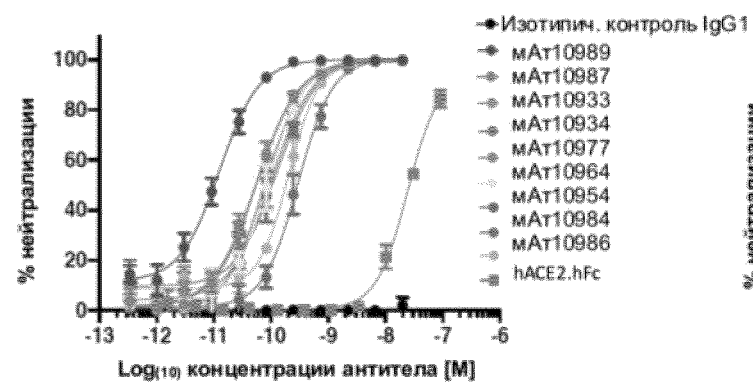
Фигура 8



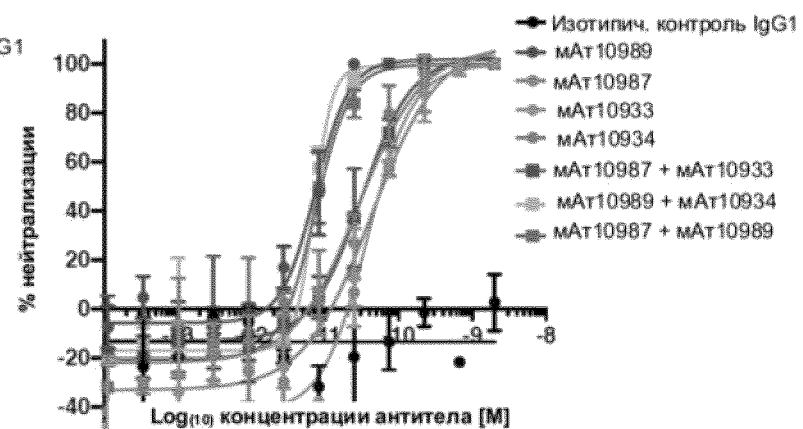
Фигура 9А



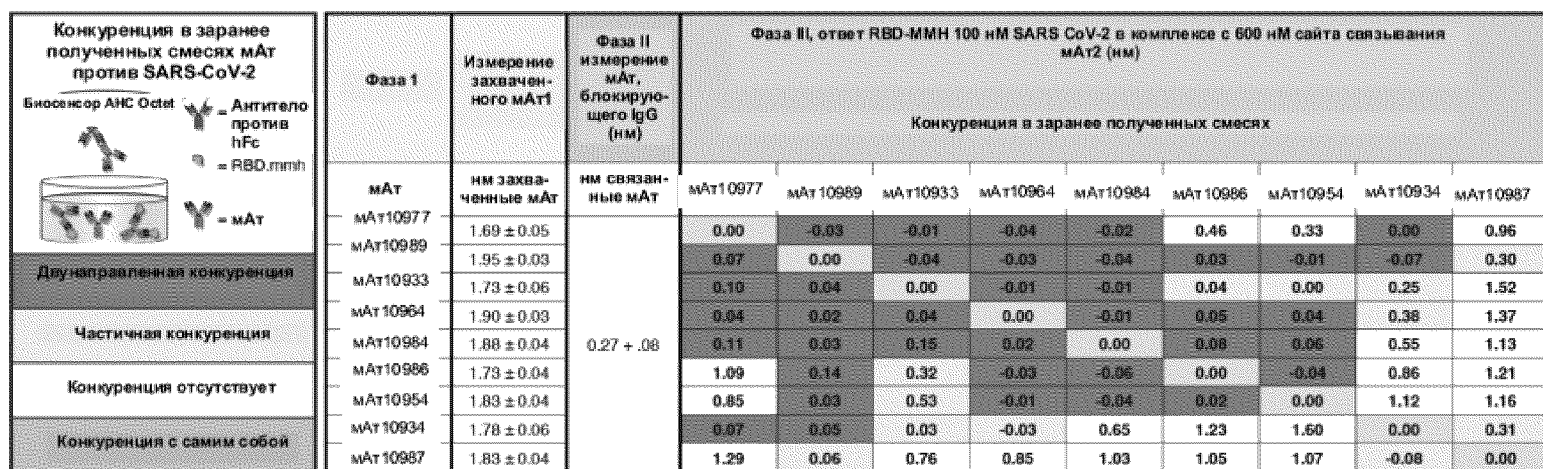
Фигура 9В



Фигура 10А



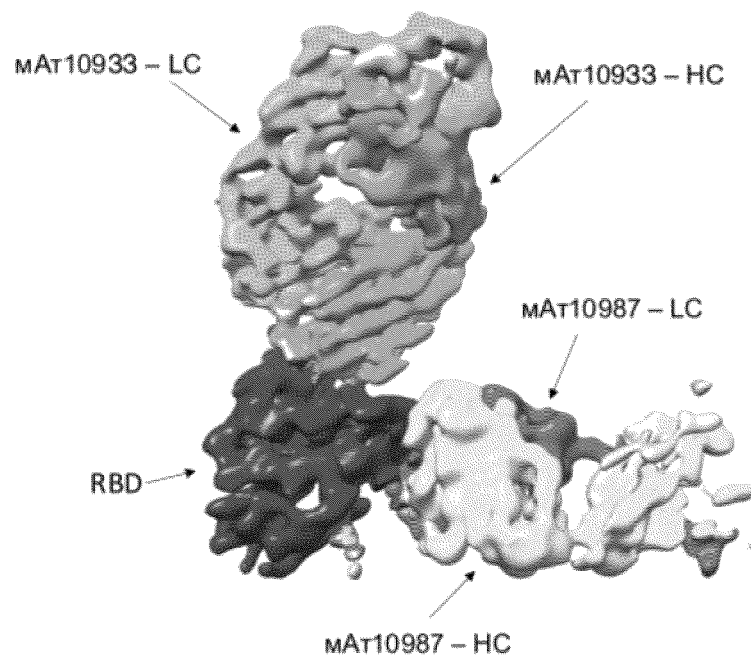
Фигура 10В



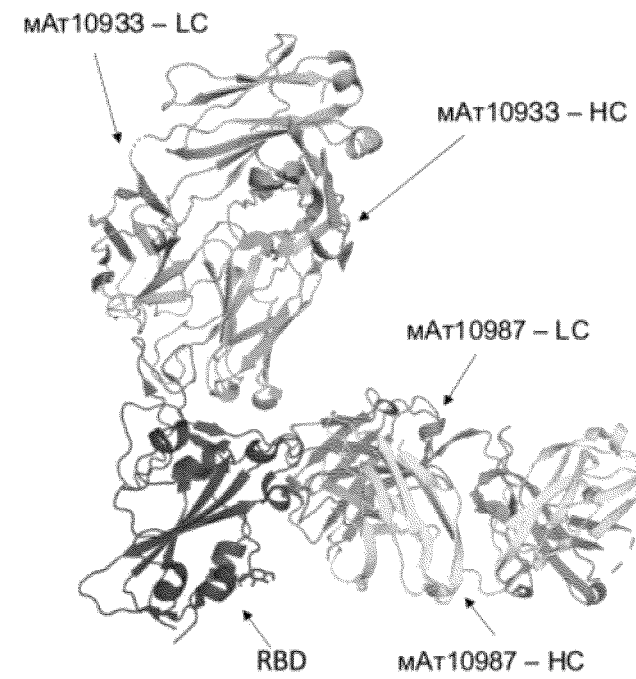
Фигура 11



Фигура 13А



Фигура 13В



Комплекс SARS-CoV-2 RBD : mAt10933 : mAt10987	
Сбор и обработка данных	
Увеличение	105,000
Напряжение (кВ)	300
Облучение электронами (e-/Å ²)	40
Диапазон расфокусировки (пм)	1.6-3.0
Размер пикселя (Å)	0.85
Заданная симметрия	C1
Исходное количество частиц	989,553
Окончательно отобран. частицы	61,707
Разрешение карты (Å)	3.9
Порог FSC	0.143
Уточнение	
Кэф. в увелич. резкости карты (Å ²)	-122
Состав модели (кол-во атомов)	7979
Кэфф. корреляции модели и карты	0.64
Среднеквадр. отклонение	
Длина связей (Å)	0.02
Углы между связями (°)	1.12
Валидация	
Балльный показатель MolProbity	2.7
Ротамерные выпадающие показатели (%)	1.0
Карта Рамачандрана	
Благоприятные (%)	83.0
Допустимые (%)	16.3
Неразрешенные (%)	0.7

Фигура 14

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202391730

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 39/395, C07K 16/10, A61K 49/16, C12N 15/63, C12N 7/01, C12N 15/861, C12N 15/867

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, RUPAT, PATENTSCOPE, PubMed, Google, NCBI Blast, PatSeq Finder

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2411042 C2 (UAJT K HOLDINGZ CORP) 2006-05-10 реферат, формула	1 - 6
A	US 20110159001 A1 (INST RESEARCH IN BIOMEDICINE) 2011-06-03 реферат, формула	1 - 6
A	US 5908635 A (US HEALTH) 1999-06-01 реферат	16, 24
A	MARTINEZ-NAVIO JM, et al. Long-Term Delivery of an Anti-SIV Monoclonal Antibody With AAV. FRONT IMMUNOL. 2020;11:449. Published 2020 Mar 17. doi:10.3389/fimmu.2020.00449 аннотация	14,15,22,23
A	ZHAO A, et al. Isolation and identification of an scFv antibody against nucleocapsid protein of SARS-CoV. MICROBES INFECT. 2007;9(8):1026-1033. doi:10.1016/j.micinf.2007.04.008 весь текст	1-13, 17-21

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

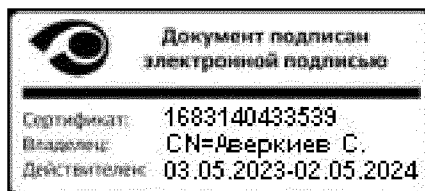
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 27 сентября 2023 (27.09.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202391730

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C07K 16/10 (2005.12)

A61K 39/395 (2005.12)

C12N 15/13 (2005.12)

C12N 15/861 (2005.12)

C12N 15/867 (2005.12)

A61K 49/16 (2005.12)