

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047416**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.18

(21) Номер заявки
202292198

(22) Дата подачи заявки
2021.02.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО К НОВОМУ КОРОНАВИРУСУ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202010114283.8; 202010137486.9;
202110044541.4

(32) 2020.02.24; 2020.03.02; 2021.01.13

(33) CN

(43) 2022.10.27

(86) PCT/CN2021/077392

(87) WO 2021/169932 2021.09.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ИНСТИТУТ ОФ
МАЙКРОБАЙОЛОДЖИ, ЧАЙНИЗ
ЭКЭДИМИ ОФ САЙНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:

**Янь Цзинхуа, Ши Жуй, Ван Цихуэй,
Гао Фу, Ма Суфан (CN)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Прищепный С.В.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)**

(56) Rui Shi et al. "A Human Neutralizing Antibody Targets the Receptor-Binding Site of SARS-CoV-2" Nature, Vol. 584, No. 7819, 26 May 2020 (2020-05-26), the abstract, page 120, right column, last paragraph to page 121, left column, paragraph 1, extended data table 1

WU F. et al. "GenBank Accession No. QHD43416.1" NCBI, 11 February 2020 (2020-02-11), see DEFINITION, FEATURES, ORIGIN

EP-A2-2193802
CN-A-109071654

(57) Согласно настоящему изобретению предложено гуманизованное моноклональное антитело к новому коронавирусу 2019 (SARS-CoV-2) и его применение. Указанное антитело способно специфично связываться с доменом связывания рецептора (RBD) SARS-CoV-2 и блокировать связывание между RBD SARS-CoV-2 и ACE2, а также ингибировать инфекцию, вызванную SARS-CoV-2.

B1

047416

047416

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к области медицинской технологии и в частности относится к человеческому моноклональному антителу к новому коронавирусу (2019-nCoV, также известному как SARS-CoV-2), с высокой нейтрализующей активностью и его применению.

Уровень техники

По состоянию на 22 октября 2020 г. во всем мире число подтвержденных случаев заболеваний, вызванных новым коронавирусом 2019-nCoV (COVID-19), превысило 40 млн., а число смертей превысило 1,1 млн., что представляет серьезную угрозу для жизни и здоровья населения.

Тем не менее, в настоящее время отсутствует специфичное лекарственное средство для лечения этого вируса.

Лекарственные средства на основе терапевтических антител играют важную роль не только при опухолевых и аутоиммунных заболеваниях, но и при лечении инфекционных заболеваний. Доступные в настоящее время на рынке лекарственные средства для лечения и предотвращения вирусных инфекций включают Synagis для предотвращения педиатрической инфекции, вызванной респираторно-синцициального вируса (RSV), Trogarzo (трогарзо) для лечения ВИЧ-инфекции и Rabishield (рабишилд) для постконтактной профилактики вируса бешенства. Существует также ряд моноклональных антител, которые находятся на различных стадиях клинических исследований (<https://clinicaltrials.gov/>).

2019-nCoV относится к коронавирусу. Коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), и коронавирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV), из одного и того же рода коронавирусов также вызывали вспышки в 2002-2003 и 2012 годах, соответственно. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) SARS-CoV вызывает 8000 инфекций и 794 смертельных исхода (<https://www.who.int/>). Число случаев инфекции вируса MERS-CoV продолжает расти с 2012 года, при этом к концу 2019 года во всем мире было 2499 подтвержденных инфекций и 861 смертельный исход. 12 января 2020 года Всемирная организация здравоохранения официально назвала новый коронавирус "новым коронавирусом 2019 (2019-nCoV)", а затем объявила, что новый коронавирус (2019-nCoV) официально классифицирован как коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром 2 (SARS-CoV-2), Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) 11-12 февраля 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила, что заболевание, вызванное этим вирусом, было официально названо "COVID-19" на Глобальном форуме исследований и инноваций, состоявшемся в тот же день в Женеве.

Для инфицирования клетки вирусу сначала необходимо связаться с рецептором хозяина через белок оболочки. Антитела, в частности, нейтрализующие активные антитела, блокируют вирусную инфекцию, связываясь с белками оболочки, что блокирует связывание вируса с клеточными рецепторами. В то же время антитело связывается с белком оболочки, помечая тем самым свободный вирус или инфицированные клетки, и привлекает макрофаги или иммунные клетки, такие как комплемент и иммунные молекулы, посредством области Fc антитела, что приводит к устранению свободного вируса и инфицированных клеток. Таким образом, антитела, нацеленные на домен связывания рецептора (RBD), не только обладают активностью нейтрализации вирусной инфекции, но также действуют посредством Fc-области, способствуя клиренсу вируса и инфицированных клеток.

На основании исследований других коронавирусов, в частности, исследований SARS-CoV и MERS-CoV, важным белком оболочки, который связывается с рецептором, является шиповидный белок (S). S можно далее разделить на две части: S1 и S2. Роль S2 заключается в опосредовании слияния мембран. Как N-конец (NTD), так и С-конец (CTD) S1 могут представлять собой RBD. В ходе исследования 2019-nCoV команда обнаружила, что CTD представляет собой RBD этого коронавируса, связывающийся с рецептором ACE2. Таким образом, антитела, которые нацелены на RBD и блокируют связывание S с ACE2, могут представлять собой нейтрализующие антитела, ингибирующие вирусную инфекцию.

Задачей настоящего изобретения является идентификация специфичных человеческих нейтрализующих антител с защитным действием против 2019-nCoV.

Краткое описание изобретения

Чтобы получить человеческое нейтрализующее антитело с защитным действием, согласно настоящему изобретению сначала отбирают В-клетки памяти, специфично связывающиеся с белком RBD 2019-nCoV, из мононуклеаров периферической крови (МПК) выпитых лиц, излеченных после инфекции 2019-nCoV, путем проточной сортировки с использованием в качестве антигена RBD 2019-nCoV, экспрессируемого клетками насекомых, а затем выполняют ОТ-ПЦР на отобранных одиночных В-клетках с получением последовательности вариативной области и фрагмента антитела и далее вставляют константную область в вектор экспрессии. После экспрессии и очистки выполняли ряд функциональных тестов на клетках млекопитающих, включая способность связывания с белком RBD 2019-nCoV, блокирующий эффект блокирования связывания RBD 2019-nCoV с ACE2 и нейтрализующий эффект ингибирования инфекции 2019-nCoV. Были получены человеческие моноклональные антитела, нейтрализующие инфекцию 2019-nCoV, которые были названы CB6 и GH12, соответственно.

В частности, настоящее изобретение реализуется с помощью следующих аспектов.

(I)

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с доменом связывания рецептора (RBD) 2019-нCoV, содержащий вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит

(I) HCDR 1 (определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи), HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие 1, 2 или 3 различия по аминокислотам с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно; или

(II) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие 1, 2 или 3 различия по аминокислотам с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно; причем указанная вариабельная область легкой цепи содержит

(I) LCDR (определяющий комплементарность участок легкой цепи) 1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие 1, 2 или 3 различия по аминокислотам с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно; или

(II) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие 1, 2 или 3 различия по аминокислотам с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит

(I) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно; или

(II) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно;

причем указанная вариабельная область легкой цепи содержит

(I) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно; или

(II) LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(I) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно; и вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно; или

(II) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно; и вариабельную область легкой цепи, имеющую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи

(I) указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 7; и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 8; или

(II) указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 31, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью,

стью, показанной в SEQ ID NO: 31; и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 32, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 32.

Согласно некоторым вариантам реализации человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(I) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8;

(II) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 32.

Согласно некоторым вариантам реализации предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь:

(I) указанная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 22, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 22; и указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 23, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 23; или

(II) указанная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 33, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 33; и указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 34, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 34.

Согласно некоторым вариантам реализации предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело содержит

(I) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 23; или

(II) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 34.

Согласно некоторым вариантам реализации предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, диатела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 22 или 23.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 32, 33 или 34.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 32, 33 или 34, причем указанный полипептид представляет собой часть человеческого моноклонального антитела, которое специфично связывает RBD 2019-nCoV, и

когда полипептид содержит SEQ ID NO: 31, человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 32;

когда полипептид содержит SEQ ID NO: 32, человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 31;

когда полипептид содержит SEQ ID NO: 33, человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 34; или

когда полипептид содержит SEQ ID NO: 34, человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 33.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, или полипептид, описанный в настоящем документе.

Согласно дополнительно аспекту настоящего изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, описанный в настоящем документе, предпочтительно вектор представляет собой эукариотический вектор экспрессии.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор экспрессии, описанный в настоящем документе, предпочтительно клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, более предпочтительно клетку млекопитающего.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения человеческого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе, причем указанный способ включает экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или полипептида в клетке-хозяине, как описано в настоящем документе, в условиях, подходящих для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, и выделение экспрессированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, или полипептид, полинуклеотид, вектор экспрессии и/или клетку-хозяина и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение человеческого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения инфекции 2019-nCoV.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения и/или предотвращения инфекции 2019-nCoV, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, человеческого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, полинуклеотида, вектора экспрессии, клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, полипептид, полинуклеотид, вектор экспрессии, клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено применение набора в изготовлении лекарственного средства для диагностики инфекции 2019-nCoV.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ детектирования присутствия 2019-nCoV в образце с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе.

(II)

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с RBD 2019-nCoV, определяющий комплементарность участок (CDR) цепи VH указанного антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

CDR1, показанного в SEQ ID NO: 1,

CDR2, показанного в SEQ ID NO: 2, и

CDR3, показанного в SEQ ID NO: 3;

определяющий комплементарность участок (CDR) цепи VL указанного антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

CDR1, показанного в SEQ ID NO: 4,

CDR2, показанного в SEQ ID NO: 5, и

CDR3, показанного в SEQ ID NO: 6,

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с RBD 2019-nCoV, определяющий комплементарность участок (CDR) цепи VH указанного антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

CDR1, показанного в SEQ ID NO: 25,

CDR2, показанного в SEQ ID NO: 26, и

CDR3, показанного в SEQ ID NO: 27;

определяющий комплементарность участок (CDR) цепи VL указанного антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

CDR1, показанного в SEQ ID NO: 28,

CDR2, показанного в SEQ ID NO: 29, и

CDR3, показанного в SEQ ID NO: 30.

Согласно одному варианту реализации человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 7, и

вариабельную область легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 8.

Согласно одному варианту реализации человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

вариабельную область тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 31, и

вариабельную область легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 32.

Согласно одному варианту реализации человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

тяжелую цепь, показанную в SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, показанную в SEQ ID NO: 23.

Согласно одному варианту реализации человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

тяжелую цепь, показанную в SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, показанную в SEQ ID NO: 34.

Согласно одному варианту реализации антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, диатела.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 8, 22 или 23.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 32, 33 или 34, причем указанный полипептид представляет собой часть человеческого моноклонального антитела, которое специфично связывает RBD COVID-19, и

когда полипептид содержит SEQ ID NO: 31, человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 32;

когда полипептид содержит SEQ ID NO: 32, человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 31;

когда полипептид содержит SEQ ID NO: 33, человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 34; или

когда полипептид содержит SEQ ID NO: 34, человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 33.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий любое из указанных выше человеческих моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, или любой из указанных выше полипептидов.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, описанный выше.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии, описанный выше.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая любое из указанных выше человеческих моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение любого из описанных выше человеческих моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов в изготовлении лекарственного средства для лечения инфекции 2019-nCoV.

Человеческие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе, также специфично связываются с коронавирусами, такими как RBD SARS-CoV или RBD MERS-CoV.

Все документы, упомянутые в этом описании, тем самым полностью включены посредством ссылки.

Определения

При реализации настоящего изобретения будут применяться, если не указано иное, обычные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения некоторые научные и технические термины конкретно определены следующим образом. Если в других частях настоящего документа не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, соответствующее обычному пониманию специалиста в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Касательно определений и терминов в данной области техники специалист в данной области техники может конкретно обратиться к Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel). Сокращения для аминокислотных остатков представляют собой стандартные 3-буквенные и/или 1-буквенные коды, используемые в данной области техники для обозначения одной из 20 обычно используемых L-аминокислот. В настоящем документе, включая формулу изобретения, формы единственного числа (соответственно "a", "an" и "the" в исходном тексте на английском языке), включают их эквиваленты во множественном числе, если контекст явно не указывает иное.

Термин "примерно", при использовании в сочетании с числовым значением, предназначен для охвата числовых значений (величин) в пределах диапазона, имеющего нижний предел, который на 5% меньше, чем указанное числовое значение, и верхний предел, который на 5% больше, чем указанное числовое значение, включая, но не ограничиваясь этим, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$ и $\pm 0,1\%$, поскольку такие вариации подходят для выполнения раскрытых способов.

Под термином "и/или" понимают любую из альтернатив или комбинацию любых двух или более

альтернатив.

В настоящем документе термин "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении элементов в перечне "или" или "и/или" следует толковать как включительные, т.е. включающие по меньшей мере одно, но также включающие более одного, из числа или перечня элементов и необязательно дополнительные не перечисленные элементы. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как "только один" или "действительно один", или "состоящий из", используемые в формуле изобретения, будут относиться только к одному числу или одному элементу перечня.

Термин "процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" или просто "идентичность" определяется как процентная доля аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в референсной аминокислотной последовательности после выравнивания с аминокислотными последовательностями (и введения пропусков, если необходимо) для получения максимального процента идентичности последовательности без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание последовательностей можно выполнять с использованием различных способов, известных в данной области техники для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN (DNASTAR). Специалист в данной области техники может определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любой алгоритм, необходимый для получения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Термин "антитело" относится к любой форме антитела, обладающего целевой биологической активностью. Таким образом, он используется в самом широком смысле и конкретно включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела), гуманизированные антитела, цельные человеческие антитела, химерные антитела и верблужьи однодоменные антитела.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции антител, т.е. индивидуальное антитело, составляющее популяцию, является идентичным, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного эпитопа. Напротив, обычные (поликлональные) препараты антител обычно включают большое число антител, направленных против (или специфичных в отношении) различных эпитопов. Определение "моноклональный" указывает на то, что антитело получено из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

"Антигенсвязывающий фрагмент" относится к антигенсвязывающим фрагментам антител и аналогов антител, которые обычно включают по меньшей мере часть антигенсвязывающей области или вариабельной области исходного антитела, например, один или более CDR. Фрагмент антитела сохраняет по меньшей мере часть специфичности связывания исходного антитела. Антигенсвязывающие фрагменты включают фрагменты, выбранные из группы, состоящей из Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, диатела, CDR-содержащих пептидов и т.п.

"Фрагмент Fab" состоит из CH1 и вариабельных областей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи.

Область "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH2 и CH3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобным действием домена CH3.

"Фрагмент Fab'" содержит легкую цепь и часть тяжелой цепи, содержащую части домена VH, домена CH1 и константной области между доменами CH1 и CH2, при этом межцепочечная дисульфидная связь образуется между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' с образованием молекулы F(ab')₂.

"Фрагмент F(ab')₂" содержит две легкие цепи и две части тяжелой цепи, содержащие части домена VH, домена CH1 и константной области между доменами CH1 и CH2, образуя тем самым межцепочечную дисульфидную связь между двумя тяжелыми цепями. Таким образом, фрагмент F(ab')₂ состоит из двух фрагментов Fab', удерживаемых вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

"Область Fv" содержит вариабельные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но не содержит константных областей.

"Одноцепочечное антитело Fv" (антитело scFv) относится к антигенсвязывающему фрагменту, содержащему домены VH и VL антитела, причем эти домены входят в состав одной полипептидной цепи. Обычно полипептиды scFv содержат полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать целевую структуру для связывания антигена.

"Диатело" представляет собой небольшой антигенсвязывающий фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих сайта. Фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL или VL-VH). При использовании короткого линкера, не позволяющего спаривание между двумя доменами одной и той же цепи,

домены спариваются с комплементарными доменами другой цепи и образуют два антигенсвязывающих сайта.

"Специфичное" связывание, когда речь идет о лиганде/рецепторе, антителе/антигене или другой связывающейся паре, относится к определению присутствия или отсутствия реакции связывания белка, такого как моноклональное антитело согласно настоящему изобретению, с белком RBD 2019-nCoV в гетерогенной популяции белков и/или других биологических агентов. Таким образом, в указанных условиях конкретный лиганд/антиген связывается с конкретным рецептором/антителом и не связывается в значительном количестве с другими белками, присутствующими в образце.

"Аффинность" или "аффинность связывания" относится к свойственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие между членами связывающейся пары. Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y обычно может быть представлена равновесной константой диссоциации (KD), которая представляет собой соотношение константы скорости диссоциации и константы скорости связывания (k_{dis} и k_{on} , соответственно). Аффинность можно измерить обычными способами, известными в данной области техники. Одним из конкретных способов измерения аффинности является анализ кинетики связывания ForteBio, описанный в настоящем документе. Термин "не связывается" с белком или клеткой означает отсутствие связывания с белком или клеткой или отсутствие связывания с ними с высокой аффинностью, т.е. K_D связывающего белка или клетки составляет $1,0 \times 10^{-6}$ M или более, более предпочтительно $1,0 \times 10^{-5}$ M или более, более предпочтительно $1,0 \times 10^{-4}$ M или более, $1,0 \times 10^{-3}$ M или более, более предпочтительно $1,0 \times 10^{-2}$ M или более.

Термин "высокая аффинность" для антител IgG означает K_D для антигена $1,0 \times 10^{-6}$ M или менее, предпочтительно $5,0 \times 10^{-8}$ M или менее, более предпочтительно $1,0 \times 10^{-8}$ M или менее, $5,0 \times 10^{-9}$ M или менее, более предпочтительно $1,0 \times 10^{-9}$ M или менее. Для других подтипов антител "высокоаффинное" связывание может варьироваться. Например, "высокоаффинное" связывание подтипа IgM относится к K_D 10^{-6} M или менее, предпочтительно 10^{-7} M или менее, более предпочтительно 10^{-8} M или менее.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) и их полимерам в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Если конкретно не ограничено, термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие аналоги известных природных нуклеотидов, которые обладают сходными связывающими свойствами, что и референсные нуклеиновые кислоты, и метаболизируются способом, сходным с встречающимися в природе нуклеотидами (см. патент США № 8278036 Kariko et al., в котором раскрыты молекулы мРНК, в которых уридин заменен псевдоуридином, способы синтеза молекул мРНК и способы доставки терапевтических белков *in vivo*). Если не указано иное, подразумевается также, что конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает консервативно модифицированные варианты (например, замены выроджденных кодонов), аллели, ортологи, однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) и их комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную явным образом. В частности, замены выроджденных кодонов могут быть достигнуты путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменено смешанными остатками основания и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19: 5081 (1991); ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8: 91-98 (1994)).

"Конструкция" относится к любой рекомбинантной полинуклеотидной молекуле (такой как плазмида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся полинуклеотидная молекула, фаг или линейная или кольцевая одноцепочечная или двухцепочечная полинуклеотидная молекула ДНК или РНК), полученной из любого источника, способной интегрироваться с геномом или автономно реплицирующейся, которая представляет собой полинуклеотидную молекулу, в которой одна или более полинуклеотидных молекул функционально связаны (т.е. операционно связаны). Рекомбинантная конструкция обычно будет содержать полинуклеотид согласно настоящему изобретению, функционально связанный с регуляторными последовательностями инициации транскрипции, которые направляют транскрипцию полинуклеотида в клетке-хозяине. Для направления экспрессии нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению можно использовать как гетерологичный, так и негетерологичный (т.е. эндогенный) промотор.

"Вектор" относится к любой рекомбинантной полинуклеотидной конструкции, которую можно использовать для целей трансформации (т.е. введения гетерологичной ДНК в клетку-хозяина). Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к кольцевой двухцепочечной петлевой ДНК, в которую могут быть включены дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть включены в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и реплицируются таким образом вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию функционально связанного гена. Такие векторы называются в настоящем документе "векторами экспрессии".

В настоящем документе термин "вектор экспрессии" относится к молекуле нуклеиновой кислоты,

способной к репликации и экспрессии гена, представляющего интерес, при трансформации, трансфекции или трансдукции в клетку-хозяина. Векторы экспрессии содержат один или более фенотипических селективных маркеров и точку начала репликации, чтобы гарантировать поддержание вектора и обеспечить амплификацию у хозяина, при необходимости.

Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции, содержащие человеческое моноклональное антитело с высокой нейтрализующей активностью или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывает RBD 2019-nCoV согласно настоящему изобретению. Для получения фармацевтической композиции антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть включен в состав различных целевых лекарственных форм путем смешивания с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. В качестве типов лекарственной формы фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в качестве пероральных агентов могут быть указаны, например, таблетки, порошки, драже, мелкодисперсные порошки, гранулы, мелкие гранулы, мягкие/твердые капсулы, пленочные покрытия, пеллеты, подъязычные таблетки, мази и т.п., и в качестве непероральных агентов могут быть указаны инъекции, суппозитории, трансдермальные агенты, мази, пластыри, наружные жидкие препараты и т.п., и специалисты в данной области техники могут выбрать подходящую лекарственную форму в соответствии с путем введения и субъектом, которому осуществляют введение, и т.п.

Количество активного ингредиента фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, подлежащее введению, изменяется в зависимости от субъекта, которому осуществляют введение, органа субъекта, симптома, способа введения и т.д. и может быть определено в соответствии с суждением врача с учетом типа лекарственной формы, способа введения, возраста и веса пациента, симптома пациента и т.д.

Полезное действие настоящего изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает антитела человеческого происхождения, имеющие высокую нейтрализующую активность: CB6 и GH12. Указанные выше антитела представляют собой человеческие антитела, нейтрализующие инфекцию 2019-nCoV. Константа связывания антитела CB6 с 2019-nCoV составляла $8,15 \times 10^{-10}$ М, и аффинность антитела GH12 в отношении RBD 2019-nCoV составляла $5,87 \times 10^{-9}$ М. Человеческие антитела CB6 и GH12 с высокой нейтрализующей активностью могут эффективно блокировать связывание RBD 2019-nCoV с hACE2 и ингибировать нейтрализующую активность инфекции псевдовируса 2019-nCoV. CB6 и GH12 согласно настоящему изобретению имеют клиническое применение при лечении и предотвращении инфекции 2019-nCoV.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: идентификация RBD 2019-nCoV с помощью гель-фильтрационной хроматографии и электрофореза в ДСН-ПААГ (SDS-PAGE).

Фиг. 2: 2a - идентификация антитела CB6 с помощью хроматографии на молекулярных ситах и SDS-PAGE; 2b - идентификация антитела GH12 с помощью хроматографии на молекулярных ситах и SDS-PAGE.

Фиг. 3: 3a - кинетический профиль связывания антитела CB6 с RBD 2019-nCoV; 3b - кинетический профиль связывания антитела GH12 с RBD 2019-nCoV.

Фиг. 4: 4a - антитело CB6 блокирует связывание RBD 2019-nCoV с HEK293T-hACE2; 4b - антитело GH12 блокирует связывание RBD 2019-nCoV с HEK293T-hACE2.

Фиг. 5: 5a - нейтрализующее действие антитела CB6 на инфекцию VSV-2019-nCoV; 5b - нейтрализующее действие антитела GH12 на инфекцию VSV-2019-nCoV.

Фиг. 6: нейтрализация антителами CB6 живого вируса SARS-CoV-2.

Фиг. 7: изменение температуры и массы тела экспериментальных животных; 7a - изменение температуры экспериментальных животных; 7b - изменения массы тела экспериментальных животных.

Фиг. 8: изменения вирусной нагрузки мазка из горла, мазка из носа и анального мазка экспериментальных животных: 8a - вирусная нагрузка мазка из горла: вирусная нагрузка мазка из горла отражает, что вирус может эффективно амплифицироваться у животных, но после лечения антителами вирусная нагрузка значительно снижается или вообще не детектируется; 8b - вирусная нагрузка мазка из носа: вирусная нагрузка в мазках из носа низкая, во всех случаях около или ниже предела детектирования; 8c - вирусная нагрузка анального мазка: вирусная нагрузка низкая, во всех случаях около или ниже предела детектирования.

ПД (предел детектирования): 200 копий/мл.

Фиг. 9: визуализирующий анализ экспериментальных животных: 9a - рентгенографическое наблюдение за животными в контрольной группе, (вверху): C1, (посередине): C2, (внизу): C3; 9b - визуализирующее наблюдение за животными в группе профилактики (вверху): PA1, (посередине): PA2, (внизу): PA3; 9c: визуализирующие наблюдения за животными в группе лечения (вверху): AC1, (посередине): AC2, (внизу) AC3.

Фиг. 10: анализ трахеальной, бронхиальной и легочной вирусной нагрузки экспериментальных животных: 10a - день 5 после инфекции; 10b - день 6 после инфекции; 10c - день 7 после инфекции.

ПД (предел детектирования): предел детектирования 1000 копий/г.

Подробное описание изобретения

Для лучшего понимания задач, аспектов и преимуществ настоящего изобретения более конкретное описание настоящего изобретения будет подробнее приведено ниже в сочетании с конкретными вариантами реализации и со ссылкой на чертежи.

Пример 1: экспрессия и очистка RBD 2019-nCoV.

К 3'-концу кодирующей области белка RBD 2019-nCoV (аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 9) присоединяли кодирующую последовательность гексагистидинового метки (гекса-His-метка) и кодон терминатора трансляции и встраивали в вектор pFastBac1 (приобретенный у Invitrogen) путем связывания EcoRI и XhoI. Затем продукт связывания трансформировали в компетентные клетки DHIOBac (приобретенные у Tiangen) для бакуловирусной рекомбинации. Рекомбинантный бакуловирус экстрагировали, трансфицировали в клетки sf9 (приобретенные у Invitrogen) для упаковки бакуловируса, амплифицировали, добавляли к клеткам Hi5 (приобретенным у Invitrogen) для экспрессии белка RBD 2019-nCoV.

После очистки с помощью аффинной хроматографии с ионами никеля (HisTrap ТМНР (GE)) и гель-фильтрационной хроматографии (SuperoseTM 6 Increase 10/300 GL (GE)) относительно чистый целевой белок может быть получен из раствора клеточной культуры, содержащего целевой белок. Размер, определенный с помощью SDS-PAGE, составил 30 кДа, и результаты показаны на фиг. 1.

Пример 2: выделение В-клеток памяти, специфичных в отношении белка RBD 2019-nCoV.

С информированного согласия выписанного лица, выздоравливающего после инфекции 2019-nCoV, собирали 15 мл крови и выделяли МКПК. Выделенные МКПК инкубировали при плотности 10^7 /мл с белком RBD 2019-nCoV в конечной концентрации 400 нМ для связывания в течение получаса на льду, затем дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), а затем инкубировали со следующими антителами (все приобретены у BD): антитело к человеческому CD3/PE-Cy5, антитело к человеческому CD16/PE-Cy5, антитело к человеческому CD235a/PE-Cy5, антитело к человеческому CD19/APC-Cy7, антитело к человеческому CD27/Pacific Blue, антитело к человеческому CD38/APC, антитело к человеческому IgG/FITC и антитело к His/PE. Через полчаса инкубации на льду МКПК дважды промывали ФСБ.

МКПК, промытые ФСБ, сортировали с помощью FACS Aria III, и клетки PE-Cy5-APC-APC-Cy7 + Pacific Blue + FITC + PE + (т.е. В-клетки) собирали непосредственно в 96-луночные планшеты, 1 клетка/луночку.

Пример 3: ПЦР одиночных В-клеток, анализ последовательности и дизайн человеческого антитела.

В соответствии с методом, описанным в Qihui Wang et al. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus, science Translational Medicine, vol. 8, No. 369, Dec. 2016, В-клетки, полученные в примере 2, подвергали обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы Superscript III (Invitrogen) с праймерами для обратной транскрипции, показанными в табл. 1, и проводили реакцию при 55°C в течение 60 мин.

Таблица 1

Праймеры для реакции обратной транскрипции		
Праймер	№ последовательности	5'-3' последовательность
IgM-RT	SEQ ID NO: 10	ATG GAG TCG GGA AGG AAG TC
IgD-RT	SEQ ID NO: 11	TCA CGG ACG TTG GGT GGT A
IgE-RT	SEQ ID NO: 12	TCA CGG AGG TGG CAT TGG A
IgA1-RT	SEQ ID NO: 13	CAG GCG ATG ACC ACG TTC C
IgA2-RT	SEQ ID NO: 14	CAT GCG ACG ACC ACG TTC C
IgG-RT	SEQ ID NO: 15	AGG TGT GCA CGC CGC TGG TC
Ск-new RT	SEQ ID NO: 16	GCA GGC ACA CAA CAG AGG CA
Сλ-new-ext	SEQ ID NO: 17	AGG CCA CTG TCA CAG CT

3.1 Человеческое антитело CB6.

Используя указанные выше продукты обратной транскрипции в качестве матриц, последовательности переменных областей антител амплифицировали с помощью ПЦР (ПЦРа) с использованием фермента HotStar Tap Plus (QIAGEN). Конструировали соответствующие праймеры, и условия реакции являются следующими: 95°C в течение 5 мин; 95°C в течение 30 с, 55°C (тяжелая цепь) в течение 30 с, 72°C в течение 90 с, 35 циклов; 72°C в течение 7 мин. Этот продукт использовали в качестве матрицы для другого раунда ПЦР (ПЦР b) в следующих условиях: 95°C в течение 5 мин; 95°C в течение 30 с, 58°C (тяжелая цепь)/60°C (κ-цепь) в течение 30 с, 72°C в течение 90 с, 35 циклов; 72°C в течение 7 мин для получения продуктов ПЦР.

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле. Гели с размерами полос от 400 до 500 п.о. извлекали и отправляли на секвенирование. Результаты секвенирования анализи-

ровали с использованием сетевого программного обеспечения IMGT.

Правильную последовательность варибельной области из анализа связывали с соответствующими константными областями тяжелой/каппа-цепи с помощью мостиковой ПЦР и клонировали в вектор экспрессии pCAGGS (приобретенный у Addgene). Тяжелую цепь связывали с EcoRI и XhoI, и к-цепь связывали с SacI и XhoI. Секвенирование В-клеток и конструкция плазмиды экспрессии приведены далее.

Стратегия конструирования человеческих антител приведена далее:

тяжелая цепь: промотор ЦМВ-EcoR I-лидерная последовательность-варибельная область тяжелой цепи-CH-Xho I;

легкая цепь (κ): промотор ЦМВ-Sac I-лидерная последовательность-варибельная область легкой цепи-CL (κ)-Xho I;

при этом аминокислотная последовательность лидерной последовательности показана в SEQ ID NO: 18, аминокислотная последовательность CH показана в SEQ ID NO: 19, и аминокислотная последовательность CL показана в SEQ ID NO: 20. Путем определения последовательности получили последовательность антитела, названного CB6.

При этом последовательность варибельной области тяжелой цепи CB6 показана в SEQ ID NO: 7, последовательность варибельной области легкой цепи показана в SEQ ID NO: 8, последовательность тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 22, и последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 23.

Варибельная область тяжелой цепи CB6 имеет HCDR1, HCDR2 и HCDR3, показанные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и варибельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, показанную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно.

При этом идентичность последовательности антитела CB6 с геном зародышевой линии сравнивают следующим образом.

Таблица 2

Сравнение тяжелой цепи антитела CB6 и генов зародышевой линии

	аллель V-H	аллель D-H	аллель J-H	Согласованность (V-H)
CB6	IGHV3-66*01	IGHD3-10*02	IGHJ4*02	99,00%

Таблица 3

Сравнение легкой цепи антитела CB6 с генами зародышевой линии

	аллель V-L	аллель J-L	Согласованность (V-L)
CB6	IGKV1-39*01	IGKJ2*01	99,60%

3.2 Человеческое антитело GH12.

Используя указанные выше продукты обратной транскрипции в качестве матриц, последовательности варибельных областей антител амплифицировали с помощью ПЦР (ПЦР а) с использованием фермента HotStar Tap Plus (QIAGEN). Конструировали соответствующие праймеры, и условия реакции являются следующими: 95°C в течение 5 мин, 95°C в течение 30 с, 55°C (тяжелая цепь)/50°C (лямбда-цепь) в течение 30 с, 72°C в течение 90 с, 35 циклов; 72°C в течение 7 мин. Этот продукт использовали в качестве матрицы для другого раунда ПЦР (ПЦР б) в следующих условиях: 95°C в течение 5 мин; 95°C в течение 30 с, 58°C (тяжелая цепь)/64°C (лямбда-цепь) в течение 30 с, 72°C в течение 90 с, 35 циклов; 72°C в течение 7 мин для получения продуктов ПЦР.

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле. Гели с размерами полос от 400 до 500 п.о. извлекали и отправляли на секвенирование. Результаты секвенирования анализировали с использованием сетевого программного обеспечения IMGT.

Правильную последовательность варибельной области из анализа связывали с соответствующими константными областями тяжелой/лямбда-цепи с помощью мостиковой ПЦР и клонировали в вектор экспрессии pCAGGS (приобретенный у Addgene). При этом тяжелая цепь связана с лямбда-цепью с помощью EcoRI и XhoI. Секвенирование В-клеток и конструкция плазмиды экспрессии приведены далее.

Стратегия конструирования человеческих антител приведена далее:

тяжелая цепь: промотор ЦМВ-EcoR I-лидерная последовательность-варибельная область тяжелой цепи-CH-Xho I;

Легкая цепь (λ): промотор ЦМВ-EcoR I-лидерная последовательность-варибельная область легкой цепи-CL(λ)-Xho I;

при этом аминокислотная последовательность лидерной последовательности показана в SEQ ID NO: 18, аминокислотная последовательность CH показана в SEQ ID NO: 19, и аминокислотная последовательность CL показана в SEQ ID NO: 24. Путем определения последовательности получили последовательность антитела, названного GH12.

При этом последовательность варибельной области тяжелой цепи GH12 показана в SEQ ID NO: 31,

последовательность варибельной области легкой цепи показана в SEQ ID NO: 32, последовательность тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 33, и последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 34.

Варибельная область тяжелой цепи GH12 имеет HCDR1, HCDR2 и HCDR3, показанные в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно, и варибельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, показанную в SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно.

При этом идентичность последовательности антитела GH12 с геном зародышевой линии сравнивают следующим образом.

Таблица 4

Сравнение тяжелой цепи антитела GH12 и генов зародышевой линии

	аллель V-H	аллель D-H	аллель J-H	Согласованность (V-H)
GH12	IGHV3-7*01	IGHD3-10*01	IGHJ3*02	99,70%

Таблица 5

Сравнение легкой цепи антитела GH12 с генами зародышевой линии

	аллель V-L	аллель J-L	Согласованность (V-L)
GH12	IGLV6-57*02	IGLJ3*02	100,00%

Пример 4: экспрессия антител.

Клетки 293Т культивировали в DMEM, содержащей 10% ФБС. 293Т котрансфицировали плазмидой, содержащей гены, кодирующие легкую и тяжелую цепи специфичного антитела, полученного в примере 3. Через 4-6 часов после трансфекции среду для культивирования клеток заменяли бессывороточной DMEM, и культивирование продолжали в течение 3 дней. После сбора супернатанта снова добавляли DMEM, культивирование продолжали в течение 4 дней и собирали супернатант.

Собранный супернатант центрифугировали при 5000 об./мин в течение 30 мин, смешивали с равным объемом буфера, содержащего 20 мМ фосфата натрия (рН 8,0), фильтровали через фильтрующую мембрану с размером пор 0,22 мкм и объединяли с колонкой, предварительно заполненной белком А (5 мл, GE Healthcare). Связанные белки элюировали 10 мМ глицином (рН 3,0). Белок собирали, концентрировали и подвергали хроматографии на молекулярных ситах. Пики, представляющие интерес, определяли с помощью SDS-PAGE (восстанавливающий и невосстанавливающий), и результаты показаны на фиг. 2a (антитело CB6) и фиг. 2b (антитело GH12). Получали очищенные антитела CB6 и GH12.

Пример 5: детектирование связывающей способности антитела к RBD 2019-nCoV с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса выполняли с использованием Biacore 8K (Biacore Inc.). Конкретные этапы приведены далее.

Использовали чип с белком А (приобретенный у GE Healthcare), очищенное антитело, полученное в примере 4, иммобилизовали на чипе, используя аффинность белка А в отношении Fc антитела, в количестве примерно 5000 ед. отв. (RU), белок RBD 2019-nCoV разбавляли раствором, содержащим 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, рН 7,4, в двойном растворе и последовательно загружали от низкой концентрации до высокой концентрации. Кинетические профили связывания антител с RBD 2019-nCoV показаны на фиг. 3a (антитело CB6) и фиг. 3b (антитело GH12). Кинетические константы для связывания антител с RBD 2019-nCoV показаны в табл. 6. Кинетические константы связывания рассчитывали с использованием программного обеспечения BIAevaluation 8K (Biacore, inc.). Можно видеть, что антитела CB6 и GH12 способны связываться с RBD 2019-nCoV с более высокой аффинностью.

Таблица 6

Кинетические константы для связывания антител с белком RBD 2019-nCoV

	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
CB6	$8,95 \times 10^5$	$7,29 \times 10^{-4}$	$8,15 \times 10^{-10}$
GH12	$2,95 \times 10^6$	$1,73 \times 10^{-2}$	$5,87 \times 10^{-9}$

Пример 6: детектирование антитела согласно настоящему изобретению, которое блокирует связывание RBD 2019-nCoV с ACE2.

Ген, кодирующий hACE2 (аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 21), вставляли в вектор pEGFP-N1 (приобретенный у Addgene) с помощью XhoI и BamHI и экспрессировали путем слияния с GFP с получением плазмиды pEGFP-hACE2. Плазмиду pEGFP-hACE2 трансфицировали в клетки HEK293Т и экспрессию GFP наблюдали под флуоресцентным микроскопом в течение 24 часов. Клетки HEK293Т-hACE2 собирали по 2×10^5 на реакцию и инкубировали с RBD 2019-nCoV (200 нг/мл) в

течение 30 минут при комнатной температуре. После центрифугирования при 500×g в течение 5 мин супернатант удаляли и дважды промывали ФСБ. После инкубации с антителом к His/APC (анти-His/APC) в течение 30 мин при комнатной температуре и двукратной промывки ФСБ флуоресценцию клеточной поверхности детектировали с помощью BD FACSCanto.

Для изучения блокирующего действия СВ6 и GH12 очищенные антитела, полученные в примере 4 (СВ6 и GH12), инкубировали с 200 нг/мл RBD 2019-nCoV в молярном соотношении 10:1 при комнатной температуре в течение 1 ч, соответственно, а затем инкубировали с клетками НЕК293Т-hACE2. Остальные шаги такие же, как описано выше, с использованием антитела к His/APC для детектирования связывания белка с клетками. Антитело блокирует связывание RBD 2019-nCoV с клетками НЕК293Т-hACE2, как показано на фиг. 4а (антитело СВ6) и фиг. 4б (антитело GH12). Таким образом, оба антитела СВ6 и GH12 блокировали связывание RBD 2019-nCoV с клетками НЕК293Т-hACE2.

Пример 7: детектирование антитела согласно настоящему изобретению, нейтрализующего инфекцию псевдовируса 2019-nCoV.

Очищенные антитела (СВ6 и GH12), полученные в примере 4, разводили в 3 раза, начиная с 50 мкг/мл до 10-го градиента (2,5 нг/мл), соответственно, смешивали с $1,6 \times 10^4$ TCID₅₀ псевдовируса VSV-2019-nCoV, инкубировали в течение 1 ч при 37°C, а затем добавляли в 96-луночные планшеты, предварительно инокулированные клетками Huh7 (приобретенными в Основном медицинском клеточном центре Медицинского колледжа Пекинского союза). После инкубации в течение 4 ч культуральную среду и раствор вируса отбрасывали, добавляли среду DMEM, содержащую 10% ФБС, и инкубацию продолжали в течение 48 часов. Культуральный раствор отбрасывали, один раз промывали ФСБ, добавляли 1× лизирующий раствор (Promega, система анализа люциферазы) для лизиса клеток, отбирали 10 мкл лизированного раствора, добавляли 50 мкл реакционного субстрата и выполняли детектирование с помощью люминометров Promega. Нейтрализующую способность антитела против псевдовируса VSV-2019-nCoV рассчитывали на основе активности люциферазы при различных концентрациях, и результаты показаны на фиг. 5а (антитело СВ6) и фиг. 5б (антитело GH12), и результаты статистически представлены в табл. 7.

Таблица 7
Нейтрализующее действие антитела на вирус из разных источников

МАТ	НД ₅₀ (мкг/мл) ^а
СВ6	0,00027
GH12	3,27

^аПолуингибирующая концентрация

Можно видеть, что антитела СВ6 и GH12 могут нейтрализовать псевдовиром 2019-nCoV с высокой нейтрализующей активностью.

В совокупности антитела СВ6 и GH12 могут служить в качестве человеческого моноклонального антитела с высокой нейтрализующей активностью против нового коронавируса (2019-nCoV).

Пример 8: детектирование антитела согласно настоящему изобретению, нейтрализующего живой вирус 2019-nCoV.

В этом исследовании оценивали нейтрализующее действие антитела СВ6 на живой вирус 2019-nCoV (SARS-CoV-2) с помощью анализа нейтрализации *in vitro*.

8.1 Реагенты.

Название	Источник
COVID-19 SARS-CoV-2: BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-envF13/2020	Национальный институт контроля и профилактики вирусных заболеваний
Клетки Vero E6	Национальный институт контроля и профилактики вирусных заболеваний
ФБС	Gibco
DMEM	Gibco

8.2 Экспериментальный метод.

Клетки Vero E6 инокулировали при плотности 1×10^5 на лунку в 96-луночные культуральные планшеты и использовали через 24 часа при 37°C. В среду DMEM в 96-луночном планшете для тканевых культур добавляли 50 мкл последовательного 2-кратного разведения антитела СВ6 (от 48,8 нг/мл до

100 мкг/мл). Затем добавляли равный объем рабочего исходного раствора SARS-CoV-2, содержащего 200 TCID₅₀ SARS-CoV-2, чтобы получить конечную вирусную нагрузку 100 TCID₅₀. Смесь антитело-вирус инкубировали в течение 1 ч при 37°C, а затем переносили в 96-луночный микропланшет для титрования, содержащий октамерные слитые клетки Vero E6, и инкубировали в течение 3 дней при 37°C в CO₂-инкубаторе. Инфицированные SARS-CoV-2 клетки при 100 TCID₅₀ или клетки, культивированные в контрольной среде (DMEM+10% ФБС), использовали в качестве положительного контроля или отрицательного неинфицированного контроля, соответственно. Цитопатическое действие (ЦПД) наблюдали и регистрировали в каждой лунке до и после инфекции. Выполняли обратное титрование вируса для оценки правильного титрования вируса, использованного в эксперименте. 50% нейтрализующую дозу (НД₅₀) рассчитывали с использованием программного обеспечения Prism. Все эксперименты выполняли в апробированном учреждении с уровнем биобезопасности 3 в соответствии со стандартными операционными процедурами.

8.3 Результаты и выводы.

Нейтрализующую функцию СВ6 оценивали путем совместного культивирования клеток с живым вирусом SARS-CoV-2 в присутствии различных концентраций СВ6. Как показано на фиг. 6, СВ6 снижал цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 на клетки Vero E6 дозозависимым образом. Медианная нейтрализующая доза (НД₅₀) составила 5,56 нМ.

СВ6 нейтрализует живой вирус SARS-CoV-2 и уменьшает патологическое повреждение клеток вирусом.

Пример 9: оценка защитного действия антител согласно настоящему изобретению на животных.

9.1 Экспериментальный дизайн.

1) Экспериментальные животные-приматы, отличные от человека, представляют собой макак-резусов в возрасте приблизительно 7 лет (Hubei Tianqin Biotechnology Co. Ltd.), 3 самки и 6 самцов с массой тела 5,7-10,9 кг и возрастом 2512-2545 дней. Рутинное детектирование патогенов и детектирование виридов коронавируса проводят в соответствии с требованиями контроля качества в отношении экспериментальных животных; экспериментальные животные, отвечающие требованиям, должны адаптивно содержаться в лаборатории в течение 3 суток.

2) Создавали контрольную группу, группу лечения антителом к COVID-19 и группу профилактики, включая трех макак-резусов (C1, C2 и C3) в контрольной группе, трех макак-резусов (PA1, PA2 и PA3) в группе профилактики и трех макак-резусов (AC1, AC2 и AC3) в группе лечения. При этом контрольная группа получила однократную инъекцию ФБС за 24 часа до инфекции, в то время как группа профилактики получила СВ6 в дозе 50 мг/кг за 24 часа до инфекции; группе лечения вводили путем инъекции СВ6 в дозе 50 мг/кг через 24 и 72 ч после инфекции.

3) Животных инфицировали путем эндотрахеальной интубации и инокулировали 1 мл раствора вируса, количество инокулята вируса составило 1×10^5 TCID₅₀.

4) Сбор параметров:

а) ежедневно наблюдали и регистрировали изменение течения заболевания и оценку состояния здоровья экспериментальных животных;

б) после анестезии животных в разные моменты времени измеряли массу тела и температуру тела, а также собирали анальный мазок, мазок из горла, жидкость альвеолярного лаважа и образцы крови;

с) на день 3 и день 6 после инфекции собирали рентгенограммы грудной клетки экспериментальных животных и синхронизировали время с наблюдением и отбором образцов;

д) на день 5, день 6 и день 7 после инфекции случайным образом отбирали одно животное для вскрытия и собирали образцы различных тканей и органов. гистопатологический анализ, анализ вирусной нагрузки и иммуногистохимический анализ выполняли на образцах после инактивации обычными методами в лаборатории.

5) Выполняли анализ вирусной нагрузки, рутинный анализ крови, биохимический анализ крови и анализ титра нейтрализующих антител различных образцов (мазок из носа, мазок из горла, анальный мазок, кровь, ткань и орган), выполняли визуализацию инфицированных животных и патологический анализ тканей основных органов.

6) В соответствии со стандартными операционными процедурами лаборатории и требованиями по контролю биобезопасности все собранные образцы тканей и органов животных должны быть подвергнуты гистопатологическому анализу, анализу вирусной нагрузки и иммуногистохимическому анализу после инактивационной обработки в лаборатории; все отходы, образовавшиеся в ходе эксперимента, утилизировали в соответствии с правилами обращения с отходами лаборатории.

9.2 Экспериментальный метод.

1) Новые штаммы коронавируса.

Новый штамм коронавируса 2019-nCoV-WIV04 (номер доступа GISAID: EPI_ISI_402124) был выделен Уханьским институтом вирусологии Китайской академии наук из образца жидкости бронхоальвеолярного лаважа от пациента с вирусной пневмонией в Ухане в декабре 2019 года. После очистки, культивирования, пролиферации и концентрирования выделенных вирусных штаммов определяют 50% ин-

фицирующую дозу вируса для тканевой культуры (TCID₅₀) и единицей титра вируса является TCID₅₀/мл.

2) Наблюдение за поведением животных.

Во время фазы иммунизации и инфекции вирусом экспериментальных животных ежедневно или в обозначенное время наблюдали за кожей и шерстью, выделениями, дыханием, фекалиями и мочой, потреблением корма и физической активностью, массой тела и температурой, а также оценивали состояние здоровья каждого животного в соответствии с "Критериями клинической оценки макак-резусов после инфекции новым коронавирусом".

3) Определение титра вируса.

Образцы нового коронавируса инокулировали в DMEM, содержащую клетки Vero E6, и после 3 дней культивирования при 37°C и 5% CO₂ культуральный раствор собирали и хранили в DMEM для последующего использования. После очистки, культивирования, пролиферации и концентрирования выделенных вирусных штаммов определяют 50% инфицирующую дозу вируса для тканевой культуры (TCID₅₀). Клетки Vero E6 титровали на присутствие вируса титрованием до конечной точки. Десятикратные разведения разведений вируса инокулировали в клетки и через 1 ч инкубации разведения вируса отсасывали и добавляли 100 мкл DMEM (с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки, 1 mM L-глутамин, пенициллин (100 ME/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл)). Цитопатическую оценку выполняли через 3 дня культивирования и рассчитывали титр вируса (TCID₅₀/мл).

4) Количественная флуоресцентная ПЦР в реальном времени (кОТ-ПЦР) Одноэтапную количественную ОТ-ПЦР в реальном времени использовали для количественного анализа вирусной РНК в образце. Вирусную РНК экстрагировали из мазков и образцов крови с использованием мини набора для выделения вирусной РНК QIAamp (Qiagen) в соответствии с инструкциями поставщика. Образцы гомогенизировали в DMEM (1:10, масс/об.), центрифугировали на низкой скорости при 4500 g в течение 30 мин при 4°C и немедленно выделяли РНК из супернатанта. РНК элюировали в 50 мкл элюата в качестве матрицы для ОТ-ПЦР. На основании результатов предыдущих исследований использовали следующие праймеры для гена S:

RBD-qF1: 5'-CAATGGTTAAGGCAGG-3';

RBD-qR1: 5'-CTCAAGGTCTGGATCACG-3'.

Число копий РНК в образцах определяли с использованием набора для кОТ-ПЦР HiScript® II One Step SYBR® Green (Vazyme Biotech Co., Ltd) в соответствии с инструкцией. 40 циклов при 50°C, 3 мин, 95°C, 30 с, включая терминацию при 95°C, 10 с, 60°C, 30 с выполняли на устройстве ABI 7700 и конвертировали в число копий вируса (копий/мл) в соответствии со стандартной кривой.

5) Анализ нейтрализующих антител.

Титры нейтрализующих антител в образцах сыворотки определяли путем нейтрализации сывороточных антител живым вирусом нового коронавируса. Полученные образцы сыворотки животных инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 мин, разводили до 1:50, 1:150, 1:450, 1:1350, 1:4050 и 1:12150, добавляли равное количество живого вируса, и инкубировали в инкубаторе, содержащем 5% CO₂ при 37°C. После инкубации в течение 1 ч 100 микролитров смеси инокулировали на монослой клеток Vero в 12-луночном планшете и инкубировали в течение 1 ч при встряхивании каждые 15 мин. После удаления оставшегося инокулята добавляли культуральную среду DMEM, содержащую 0,9% метилцеллюлозы и 2% ФБС, и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 3 дней. Через 3 дня клетки фиксировали 4% формальдегидом в течение 30 мин, удаляли фиксирующий раствор, промывали водопроводной водой и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Подсчитывали число бляшек и определяли титр нейтрализующих антител (ЭК₅₀).

6) Процедуры для лабораторных животных.

Все эксперименты по инфицированию выполняли в лаборатории с уровнем биобезопасности IV. Макак-резусов анестезировали и инокулировали 1 мл раствора вируса путем эндотрахеальной интубации. За животными будут ежедневно наблюдать и регистрировать клинические симптомы, включая характер, частоту возникновения, тяжесть и продолжительность любых тяжелых или видимых изменений. Рентгенографию легких выполняли на аппарате HF100Ha (MIKASA, Япония) в разное время для получения изображений легких, а также образцов мазков и образцов крови из ротоглотки, носовых раковин и анальной области. Собранные образцы мазков помещали в 1 мл среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), содержащей пенициллин (100 ME/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Цельную кровь хранили в пробирках K2 с ЭДТА для экстракции вирусной РНК и рутинного анализа крови. Для исследования патогенеза и патологического повреждения дыхательных путей одно животное случайным образом подвергали эвтаназии на день 5, 6 и 7 после инфекции. Трахею, правый бронх, левый бронх, шесть долей легкого и другие ткани и органы собирали для патологического, вирусологического и иммунологического анализа.

7) Анатомический и патологический анализ животных.

Анатомический анализ животных выполняли в соответствии со стандартными процедурами для экспериментальных животных. Собранные органы и образцы тканей фиксировали в 10% нейтральном формалиновом буфере, а затем удаляли из лаборатории для заливки в парафин и изготовления срезов.

Срезы наблюдали под световым микроскопом после окрашивания гематоксилином и эозином. Для детектирования распространения нового коронавируса обезвоженные и залитые парафином срезы ткани помещали в антигенный буфер, блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем блокировали первичным антителом собственного производства (поликлональным кроличьим антителом к белку N RP3-RP3-CoV) при 1:500. После промывки ФСБ срезы слегка подсушивали, разводили в соотношении 1:200 и покрывали конъюгированным с Су3 вторичным козьим антителом к кроличьему IgG (Abcam). Предметные стекла промывали ФСБ и окрашивали DAPI в разведении 1:100. Изображения регистрировали с помощью системы Pannoramic MIDI (3DHISTECH, Будапешт, Венгрия).

Уровень повреждения органов и тканей определяли в соответствии с патологическими изменениями в легких экспериментальных животных, при этом: "+++" обозначает тяжелое поражение; "++" представляет собой умеренное поражение; "+" представляет собой легкое поражение; "-" обозначает отсутствие поражения, а "+/-" обозначает легкое поражение и его отсутствие.

8) Другие операции.

В соответствии с требованиями к документам системы управления лабораторией уровня биобезопасности IV используйте стандартные операционные процедуры лаборатории для заполнения.

9.3 Экспериментальные результаты.

1) Отбор и адаптивное питание экспериментальных животных Экспериментальные животные соответствовали требованиям контроля качества в отношении экспериментального животного в провинции Хубэй. Поведение, состояние здоровья и питание экспериментальных животных не были аномальными после завершения трехдневного адаптивного питания в лаборатории.

2) Наблюдение за клиническими симптомами экспериментальных животных после инокуляции вируса.

Животных в контрольной группе, группе лечения и группе профилактики переводили в лабораторию P4. После 3-х дневного адаптивного питания в лаборатории выполняли следующие операции, соответственно.

Группы контроля и профилактики: ФСБ и моноклональное антитело (до 50 мг/кг) вводили путем внутривенной инъекции в помещении в соответствии с планом. Через 24 часа животных инфицировали путем эндотрахеальной интубации. Рутинное наблюдение, измерение температуры тела и массы тела выполняли в соответствии с экспериментальным планом.

Группа лечения: после 24-часовой инфекции путем эндотрахеальной интубации лекарственное средство вводили в день 1 и день 3 в соответствии с планом, и рутинное наблюдение, измерение температуры тела и массы тела выполняли в соответствии с экспериментальным планом.

Результаты показали, что экспериментальные животные из контрольной группы, группы, получавшей лечение антителом к COVID-19, и группы профилактики не показали существенных различий в поведении на протяжении всего экспериментального периода без существенных изменений температуры тела (см. фиг. 7a) и массы тела (см. фиг. 7b).

3) Изменения вирусной нагрузки мазков из горла, мазков из носа и анальных мазков.

Образцы мазков из горла, мазков из носа и анальных мазков собирали ежедневно для детектирования изменения вирусной нагрузки в разных образцах. Результаты показали, что вирусная нагрузка мазка из горла в контрольной группе менялась со временем инфекции, а вирусная нагрузка экспериментальных животных (C1, C2 и C3) достигла пика на день 2-4 после инокуляции и затем непрерывно снижалась. Ко дню 7 вирусная нагрузка в образцах упала до более низкого уровня. Однако вирусная нагрузка мазков из горла различалась у разных животных, и пик репликации вируса в C1, C2 и C3 был на день 2, 3 и 4 после инфекции, соответственно. Однако в целом изменение вирусной нагрузки в образцах мазка из горла показало процесс пролиферации вируса *in vivo* (см. фиг. 8a). По сравнению с результатами детектирования вирусной нагрузки в мазке из горла контрольных животных на протяжении всего экспериментального периода у животных PA1 и PA2 в группе профилактики низкие уровни вирусной нуклеиновой кислоты можно было детектировать только на день 2 и 3 после инфекции, в то время как другие точки детектирования не поддавались детектированию. На протяжении всего экспериментального периода у животных PA3 не детектировали вирусной нуклеиновой кислоты.

В группе лечения антителом к COVID-19 наблюдали значительные индивидуальные различия; однако во всех случаях пиковое значение вирусной нагрузки было достигнуто на день 2 после инфекции, а затем продолжило снижаться, при этом вирусная нагрузка была значительно ниже, чем в контрольной группе; вирусная нагрузка у особей AC1 на день 3 ниже нижнего предела детектирования; все группы имели более низкую вирусную нагрузку в образцах мазков из носа; низкие уровни числа копий вирусной нуклеиновой кислоты в начале инфекции детектировали только в образцах мазка из носа, а ко дню 7 вирусная нуклеиновая кислота не детектировалась во всех образцах мазка из носа (см. фиг. 8b).

Вирусная нагрузка образцов анальных мазков была ниже во всех группах; низкие уровни числа копий вирусной нуклеиновой кислоты в начале инфекции детектировали только у нескольких животных, и ко дню 7 вирусная нуклеиновая кислота не детектировалась во всех образцах мазков из носа (см. фиг. 8c).

4) Визуальный анализ инфицированных животных.

Рентгенограммы легких 3 животных в контрольной группе в день 0 инфекции были четкими, легочное затемнение не наблюдали. В день инфекции вирусом в легких экспериментальных животных контрольной группы не наблюдали очевидного затемнения; на день 3 инфекции одно животное (С3) имело слегка размытую/нарушенную текстуру легких, двое других животных (С1 и С2) имели значительное затемнение легких, а ко дню 6 значительное затемнение легких не наблюдали (см. фиг. 9а).

Однако рентгенограммы показали отсутствие затемнения легких у всех инфицированных животных, не принимая во внимание 3 животных в группе профилактики или 3 животных в группе лечения на день 3 после инфекции, наблюдали легкую размытость/нарушение легочной текстуры, но очевидное затемнение легких не наблюдали (см. фиг. 9b и 9c).

5) Патологическое изменение у инфицированных животных.

На день 5, 6 и 7 после инфекции по одному животному в контрольной группе, группе профилактики и группе лечения случайным образом отбирали для вскрытия и собирали органы и ткани, такие как легкое, трахея, бронх, сердце, печень, селезенка, почка, желудочно-кишечный тракт, репродуктивные органы и лимфатические узлы. В соответствии с экспериментальными требованиями наблюдали за формой, цветом и местом поражения тканей каждого органа.

На день 5 после инфекции животные в контрольной группе (С2) имели светлую и серо-белую окраску на общей поверхности легких, двусторонние поражения нижних отделов легких умеренной и легкой степени тяжести, эмфизему по краю доли легкого и отсутствие очевидных отклонений в трахее и бронхе. На день 6 и день 7 после инфекции животные в контрольной группе (D6: С3; D7: С1) имели темно-красную общую поверхность легких, двусторонние поражения нижних отделов легких умеренной и легкой степени тяжести, эмфизема по краю доли легкого сочеталась с областью консолидации легких, при этом отсутствовали очевидные отклонения в трахее и бронхе.

На день 5 после инфекции животные в группе профилактики (РА2) и группе лечения (АС2) имели темно-красную общую поверхность легких, двусторонние поражения нижних отделов легких умеренной и легкой степени тяжести, очевидную эмфизему края доли легкого и отсутствие очевидных отклонений в трахее и бронхе. На день 6 и день 7 после инфекции экспериментальные животные (группа профилактики: D6: РА3, D7: РА1; группа лечения: D6: АС3, D7: АС1) имели светлую и серо-белую окраску на общей поверхности легких, очевидные отклонения в легких, трахее и бронхе отсутствовали и были умеренными.

Гистопатологические изменения легких показали, что на день 5 после инфекции в контрольной группе наблюдали изменения легочной диффузной интерстициальной пневмонии, утолщение альвеолярной стенки, пролиферацию фибробластов, фиброз, инфильтрацию моноцитов и лимфоцитов; наблюдали некоторый альвеолярный отек и экссудацию фибрина, образование прозрачной мембраны и легочное кровотечение. В части просвета легочных капилляров образовался прозрачный тромб, а эпителиальные клетки бронхиол были некротизированы и отслоены. На день 6 и 7 после инфекции увеличился отек легких и экссудация фибрина, увеличивалось число альвеолярных макрофагов, альвеолярная стенка и альвеолярный фиброз и организация были очевидными. По сравнению с контрольной группой, будь то в группе лечения или группе профилактики, экспериментальные животные имели меньшее поражение легких, вызванное новым коронавирусом. На день 5 после инфекции альвеолярные структуры двух животных (АС2 и РА2) были в основном интактными, наблюдали очаговый или пятнистый фиброз легких, а также наблюдали инфильтрацию мононуклеарных клеток и лимфоцитов, но их число было значительно снижено по сравнению с контрольной группой, в альвеолярной полости было больше макрофагов, меньший отек, отсутствовало образование прозрачной мембраны, не было тяжелых поражений мелких бронхиол и легочных капилляров. На день 6 и 7 после инфекции патологические изменения легких животных значительно улучшились, практически исчезли экссудативные поражения легочной ткани, можно было наблюдать очаговый или пятнистый фиброз ткани.

6) Вирусная нагрузка в тканях различных органов.

Чтобы лучше понять распределение вируса в различных тканях верхних дыхательных путей и легких, ткани различных частей трахеи, бронхов и легких животных контрольной группы и двух животных группы антител собирали на день 5, 6 и 7 после инфекции, соответственно, и определяли вирусную нагрузку в разных органах и тканях. Результаты показали, что на день 5 после инфекции в трахее и левых бронхах только одного животного в группе профилактики (АС2) детектировали $4-8 \times 10^5$ копий вируса/г, в то время как в образцах других тканей виросомы не детектировали, и вирусную нуклеиновую кислоту не детектировали во всех образцах животных из группы лечения (см. фиг. 10а).

Как показано на фиг. 10b, на день 6 после инфекции в трахее, левом и правом бронхах и верхней доле левого легкого контрольных животных (С3) детектировали $4 \times 10^5-1 \times 10^6$ копий вируса/г, при этом виросомы не детектировали в образцах других тканей. В то же время в ткани трахеи одного животного в группе профилактики (АС3) также детектировали 3×10^5 копий вируса/г, при этом в образцах других тканей виросомы не детектировали. В образцах животных, получивших лечение, вирусная нуклеиновая кислота не детектировалась.

Как показано на фиг. 10c, на день 7 после инфекции в левом бронхе и нижней доле левого легкого

контрольных животных (С1) детектировали 5×10^4 копий вируса/г, при этом в образцах других тканей виросомы не детектировали. В то же время в образцах тканей животных в группе профилактики и группе лечения виросомы не детектировали.

7) Иммуногистохимический анализ.

Результаты иммуногистохимического анализа вируса в ткани легких показали, что вирусный белок может детектироваться в легких из контрольной группы на день 5, 6 и 7. Однако вирусный белок не детектируется в легких из группы лечения антителами и группы профилактики в разное время.

Конкретные варианты реализации, описанные выше, дополнительно иллюстрируют задачи, технические решения и преимущества настоящего изобретения. Следует понимать, что предшествующее описание является только иллюстрацией конкретных вариантов реализации настоящего изобретения и не предназначено для ограничения настоящего изобретения. Предусмотрено, что настоящее изобретение следует рассматривать как включающее все такие модификации и изменения в той мере, в которой они входят в объем прилагаемой формулы изобретения или ее эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с доменом связывания рецептора (RBD) SARS-CoV-2, содержащее

(I) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; или

(II) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27 соответственно; и вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно.

2. Человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(I) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и вариабельную область легкой цепи, имеющую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; или

(II) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27 соответственно; и вариабельную область легкой цепи, имеющую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно.

3. Человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем

(I) указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 7; и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 8; или

(II) указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 31, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 31; и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 32, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 32.

4. Человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, содержащие

(I) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8; или

(II) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 32.

5. Человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем

(I) указанная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 22, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 22; и указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 23, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 23; или

(II) указанная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 33, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 33; и указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 34, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 34.

6. Человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит

(I) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 23; или

(II) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 34.

7. Человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, отличающиеся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, диатела.

8. Полипептид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8 или 23, отличающийся тем, что полипептид является частью человеческого моноклонального антитела, которое специфично связывается с доменом связывания рецептора (RBD) SARS-CoV-2.

9. Полипептид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7 или 22, отличающийся тем, что полипептид является частью человеческого моноклонального антитела, которое специфично связывается с доменом связывания рецептора (RBD) SARS-CoV-2.

10. Полипептид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31 или 33, причем указанный полипептид является частью человеческого моноклонального антитела, которое специфично связывается с доменом связывания рецептора (RBD) SARS-CoV-2, и

если указанный полипептид содержит SEQ ID NO: 31, указанное человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 32; или

если указанный полипептид содержит SEQ ID NO: 33, указанное человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 34.

11. Полипептид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32 или 34, причем указанный полипептид является частью человеческого моноклонального антитела, которое специфично связывается с доменом связывания рецептора (RBD) SARS-CoV-2, и

если указанный полипептид содержит SEQ ID NO: 32, указанное человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 31; или

если указанный полипептид содержит SEQ ID NO: 34, указанное человеческое моноклональное антитело дополнительно содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO: 33.

12. Полинуклеотид, кодирующий человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5.

13. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.12, причем указанный вектор представляет собой эукариотический вектор экспрессии.

14. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.12 или вектор экспрессии по п.13, причем указанная клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

15. Способ получения человеческого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7, включающий экспрессию указанного антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида в клетке-хозяине по п.14 в условиях, подходящих для экспрессии указанного антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, и выделение экспрессированного антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида из указанной клетки-хозяина.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, полинуклеотид по п.12 или вектор экспрессии по п.13 и фармацевтически приемлемый носитель.

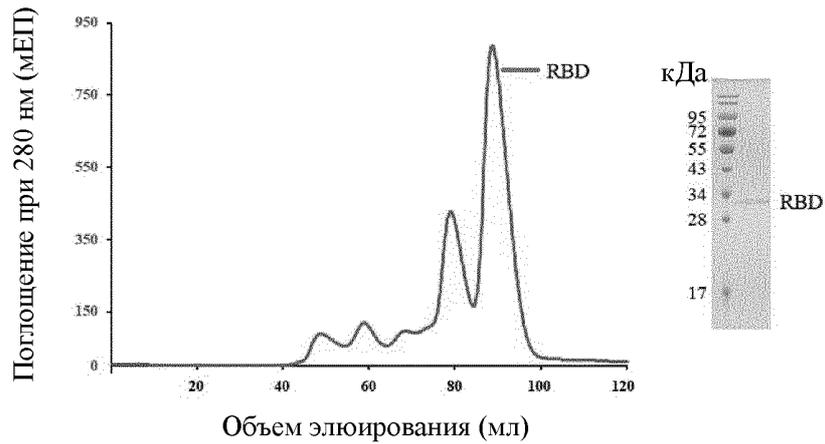
17. Применение человеческого моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7, полипептида по любому из пп.8-11, полинуклеотида по п.12, вектора экспрессии по п.13, клетки-хозяина по п.14 или фармацевтической композиции по п.16 для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения инфекции SARS-CoV-2.

18. Набор для получения лекарственного средства для диагностики инфекции SARS-CoV-2, причем набор содержит человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, полипептид по любому из пп.8-11, полинуклеотид по п.12, вектор экспрессии по п.13, клетку-хозяина по п.14 и фармацевтическую композицию по п.16.

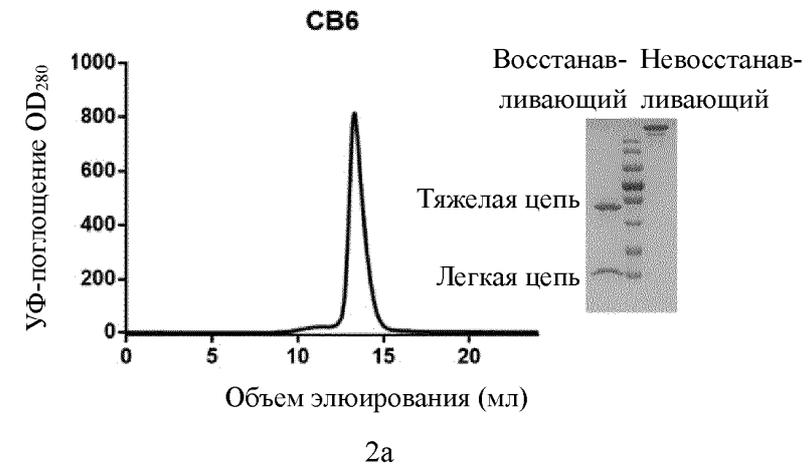
19. Применение набора по п.18 для получения лекарственного средства для диагностики инфекции SARS-CoV-2.

20. Способ детектирования присутствия SARS-CoV-2 в образце, включающий приведение образца в контакт с человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-7 или с полипептидом по любому из пп.8-11.

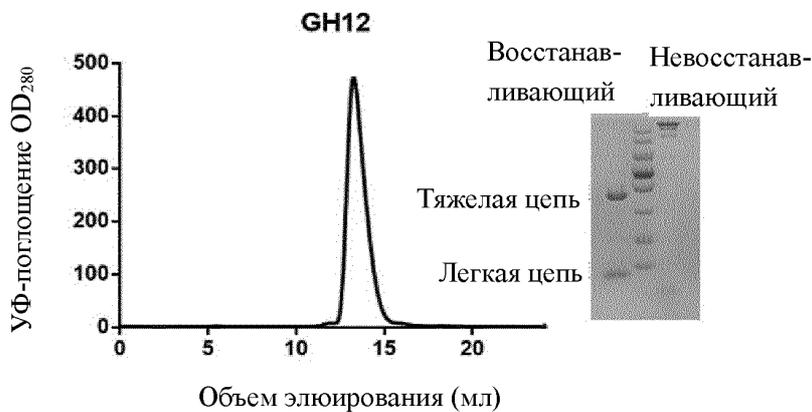
21. Способ лечения и предотвращения инфекции SARS-CoV-2, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, человеческого моноклонального антитела по п.1.



Фиг. 1



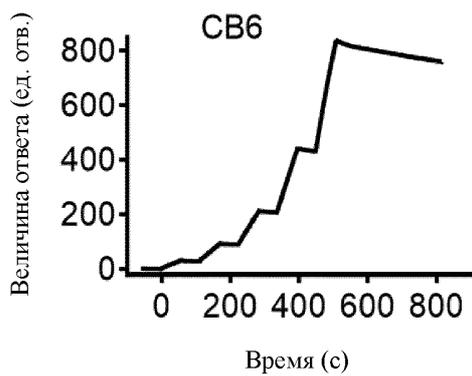
2a



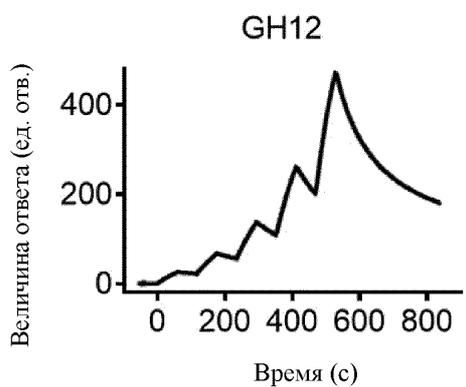
2b

Фиг. 2

047416

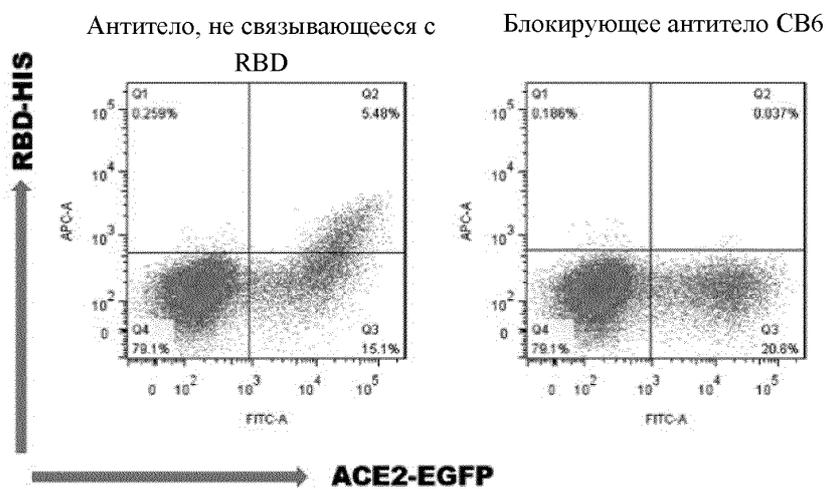


3a

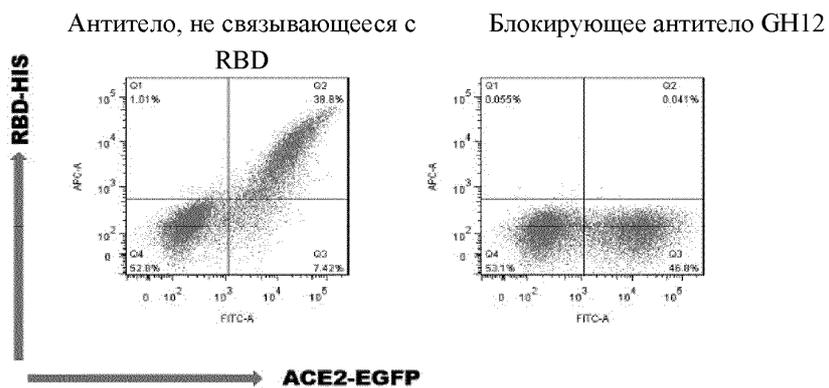


3b

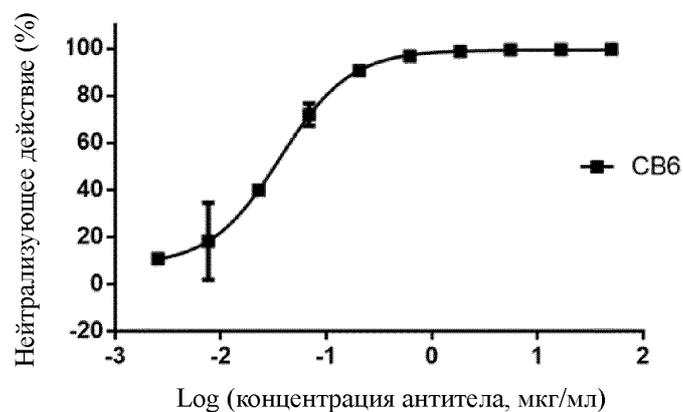
Фиг. 3



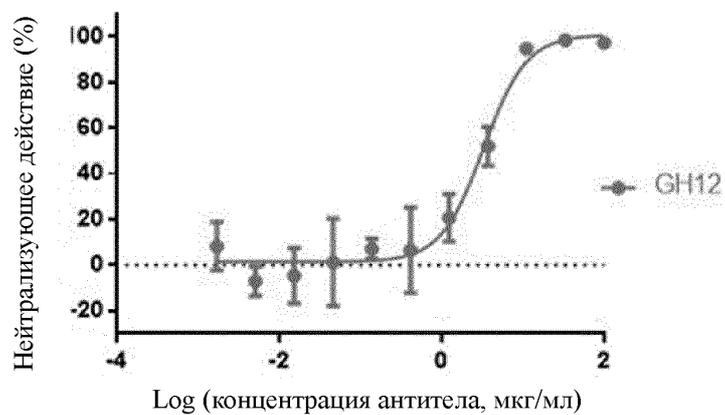
4a



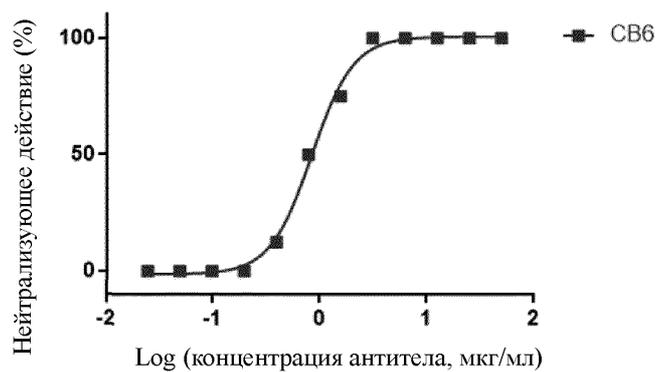
4b
Фиг. 4



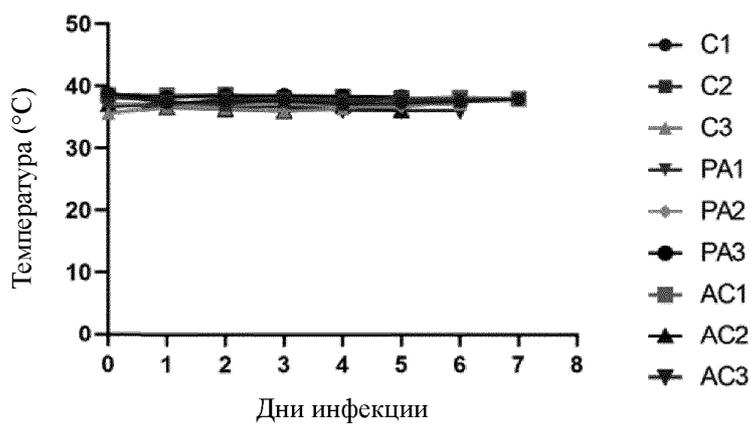
5a



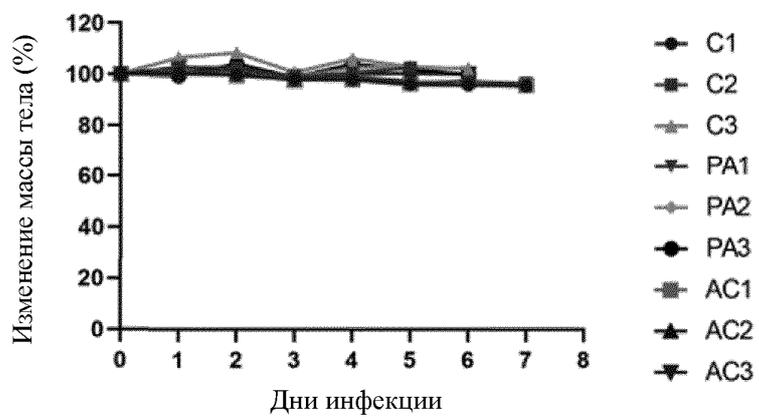
5b
Фиг. 5



Фиг. 6

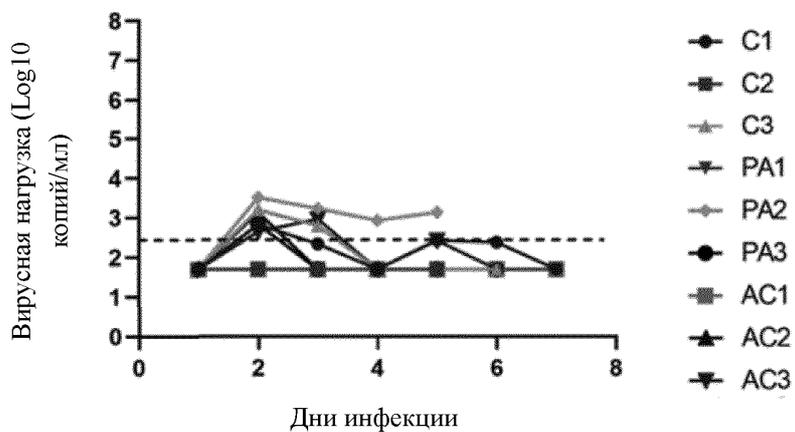
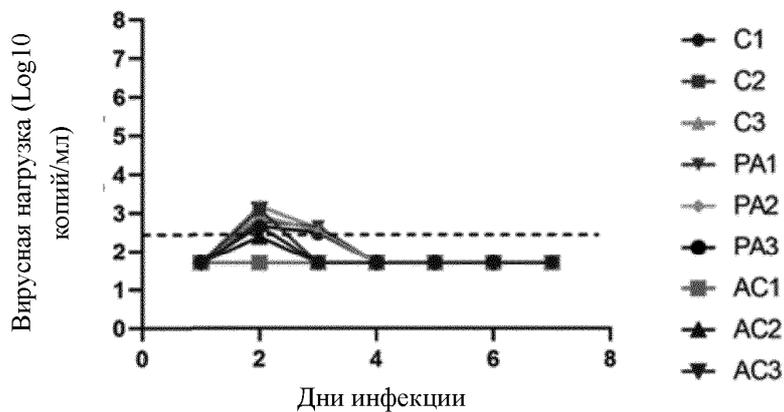
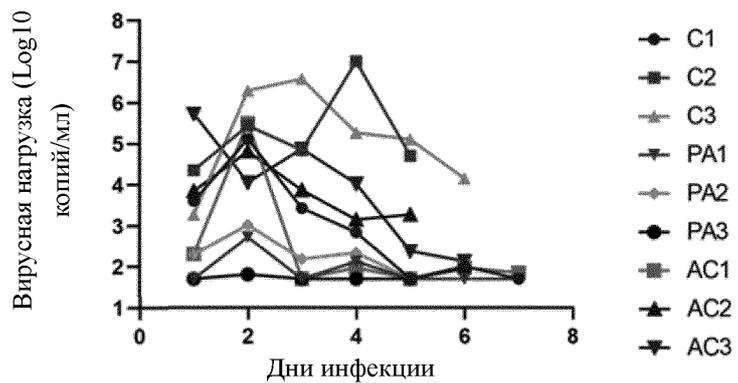


7а



7б

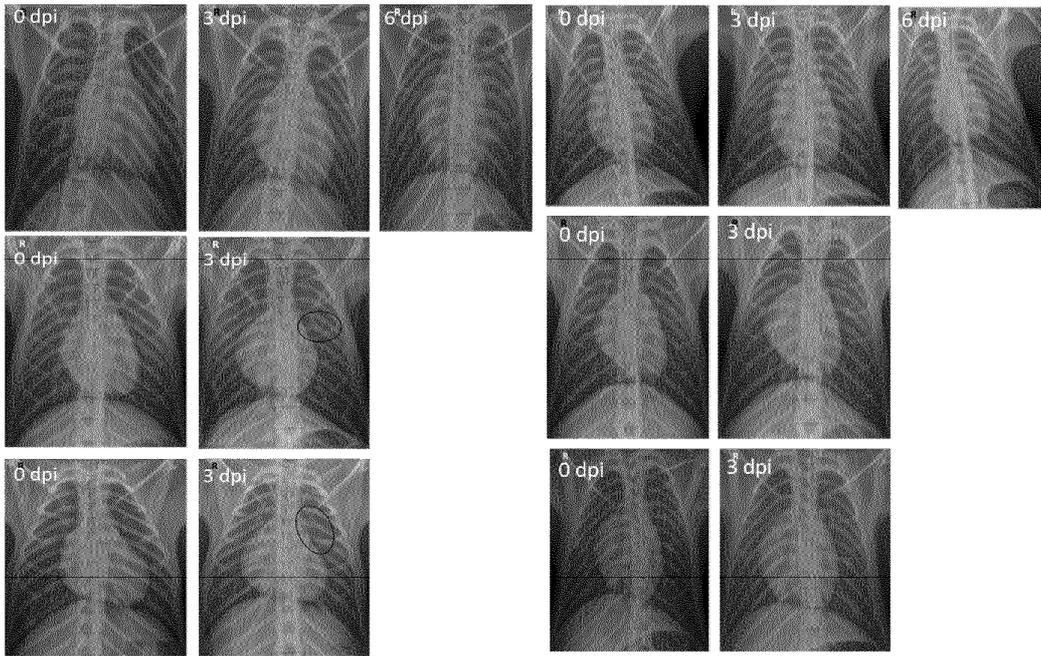
Фиг. 7



8с
Фиг. 8

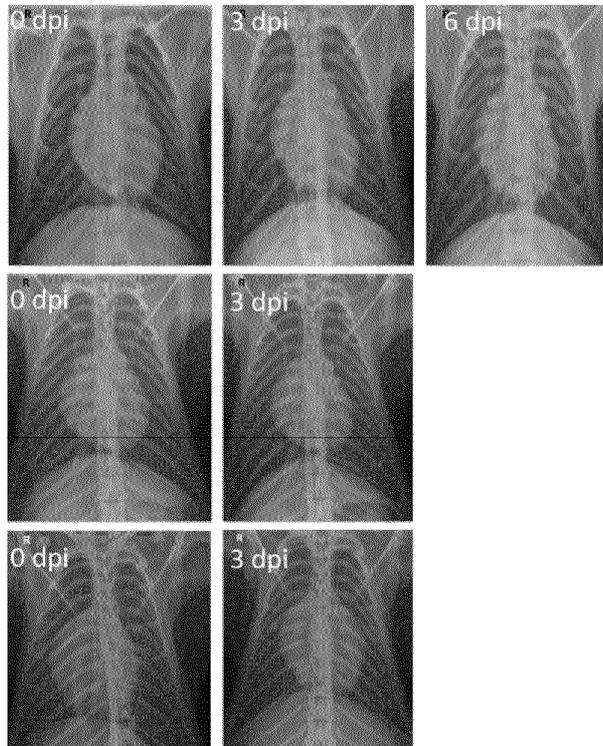
9a

9b

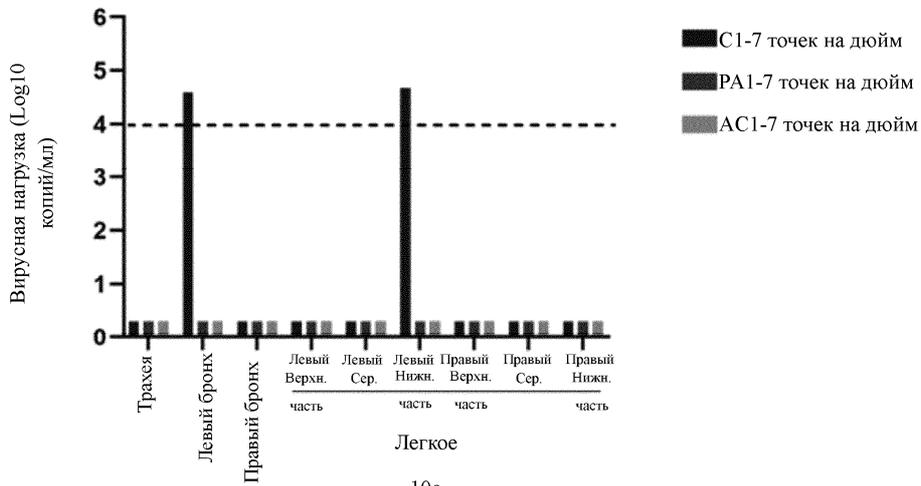
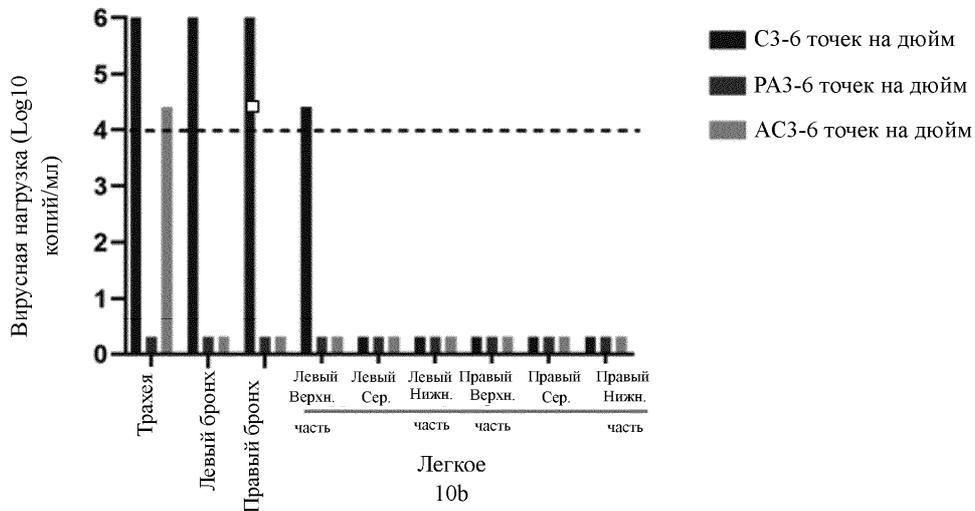
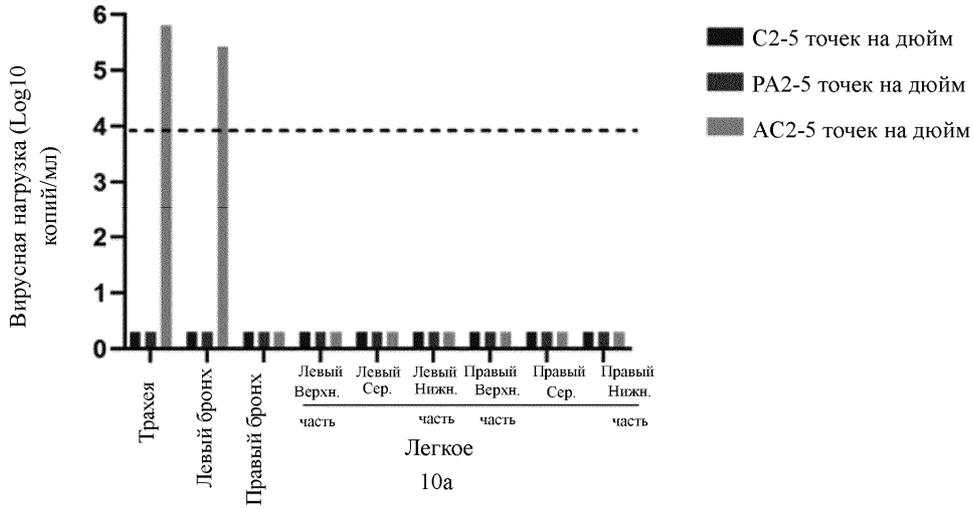


dpi= точек на дюйм

9c



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2