



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116096745 A

(43) 申请公布日 2023.05.09

(21) 申请号 202180037834.8

(22) 申请日 2021.05.26

(30) 优先权数据

63/030,260 2020.05.26 US

63/033,198 2020.06.01 US

63/093,888 2020.10.20 US

63/112,143 2020.11.10 US

63/141,956 2021.01.26 US

63/142,472 2021.01.27 US

63/145,389 2021.02.03 US

63/159,437 2021.03.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/034187 2021.05.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/242815 EN 2021.12.02

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 A·鲍姆 B·富尔顿

C·基拉特索斯

G·D·扬科普洛斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

权利要求书8页 说明书112页

序列表(电子公布) 附图55页

(54) 发明名称

抗SARS-COV-2纤突糖蛋白抗体和抗原结合片段

(57) 摘要

本公开提供了与冠状病毒纤突蛋白特异性结合的抗体和其抗原结合片段以及使用此类抗体和片段治疗或预防病毒感染(例如,冠状病毒感染)的方法。

| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 | P10 | P11 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| REGN10933 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| REGN10985 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| REGN10987 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| REGN10987+REGN10933 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| REGN10987+REGN10933+REGN10985 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| CB6 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| COV555 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| COV2-2130 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| COV2-2196 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| COV2-2130+COV2-2196* | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |
| VR-7831 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 | 完全递送 |

1. 一种选择用于治疗病毒感染的多种抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括:

- a) 确定由单独的第一抗体或其抗原结合片段产生的逃逸突变体的第一频率;
- b) 确定由单独的第二抗体或其抗原结合片段产生的逃逸突变体的第二频率;
- c) 确定由所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段的组合产生的逃逸突变体的第三频率;以及

d) 如果所述第三频率低于所述第一频率和所述第二频率,则选择所述组合用于治疗所述病毒感染;

其中所述第一抗体或其抗原结合片段结合病毒表面蛋白的第一表位,并且所述第二抗体或其抗原结合片段结合病毒表面蛋白的第二表位,并且进一步地,其中所述第一表位和所述第二表位是非重叠的。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病毒感染是冠状病毒感染。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述冠状病毒是SARS-CoV-2。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述逃逸突变体是SARS-CoV-2表面蛋白中的突变体。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述表面蛋白是纤突蛋白。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率通过以下步骤测量:

a) 使细胞群与所述第一抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率;

b) 使可比较的细胞群与所述第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率;

c) 使可比较的细胞群与所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第三频率;以及

d) 比较所述第一频率、所述第二频率和所述第三频率。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述第一表位和所述第二表位选自以下项组成的组:

a) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;

b) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及

c) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下组中的两个:

a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;

b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;

c) mAb10920;

- d) mAb10954、mAb10986和mAb10964；以及
- e) mAb10984。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法，其中所述第一抗体和所述第二抗体选自自由以下项组成的组：mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

11. 一种治疗受试者的病毒感染的方法，所述方法包括向所述受试者施用第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段，其中：

a) 所述第一抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第一表位，并且所述第二抗体或其抗原结合片段结合所述SARS-CoV-2纤突蛋白的第二表位；

b) 所述第一表位和所述第二表位不同；并且

c) 与施用单独的所述第一抗体或其抗原结合片段或单独的所述第二抗体或其抗原结合片段相比，施用所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段使得SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率降低。

12. 根据权利要求11所述的方法，其中SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的所述频率通过以下步骤测量：

a) 使细胞群与所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段接触，并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触，对来自所述细胞群的核酸进行测序，并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率；

b) 使可比较的细胞群与单独的所述第一抗体或其抗原结合片段或单独的所述第二抗体或其抗原结合片段接触，并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触，对来自所述细胞群的核酸进行测序，并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率；以及

c) 比较所述第一频率和所述第二频率。

13. 根据权利要求11或12所述的方法，其中所述第一表位和所述第二表位是非重叠的。

14. 根据权利要求11-13中任一项所述的方法，其中所述第一表位和所述第二表位选自自由以下项组成的组：

a) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452；

b) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486；以及

c) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

15. 根据权利要求11-14中任一项所述的方法，其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。

16. 根据权利要求11-15中任一项所述的方法，其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下组中的两个：

a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934；

b) mAb10989、mAb10977和mAb10933；

c) mAb10920；

d) mAb10954、mAb10986和mAb10964；以及

e) mAb10984。

17. 根据权利要求11-16中任一项所述的方法，其中所述第一抗体和所述第二抗体选自自由以下项组成的组：mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

18. 根据权利要求11-17中任一项所述的方法，其中所述第一抗体或其抗原结合片段和

所述第二抗体或其抗原结合片段同时施用。

19. 根据权利要求11-17中任一项所述的方法,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段顺序施用。

20. 根据权利要求11-19中任一项所述的方法,其中所述受试者感染SARS-CoV-2。

21. 根据权利要求11-20中任一项所述的方法,其中所述受试者患有COVID-19。

22. 一种治疗受试者的病毒感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段,其中:

a) 所述第一抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第一表位,并且所述第二抗体或其抗原结合片段结合所述SARS-CoV-2纤突蛋白的第二表位;

b) 所述第一表位和所述第二表位是非重叠的;并且

c) 与施用结合所述SARS-CoV-2纤突蛋白的重叠表位的抗体的组合相比,施用所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段使得SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率降低。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的所述频率通过以下步骤测量:

a) 使细胞群与所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率;

b) 使可比较的细胞群与结合所述SARS-CoV-2纤突蛋白的重叠表位的抗体的所述组合接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率;以及

c) 比较所述第一频率和所述第二频率。

24. 根据权利要求22-23中任一项所述的方法,其中所述第一表位和所述第二表位选自以下项组成的组:

a) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;

b) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及

c) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

25. 根据权利要求22-24中任一项所述的方法,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。

26. 根据权利要求22-25中任一项所述的方法,其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下组中的两个:

a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;

b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;

c) mAb10920;

d) mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及

e) mAb10984。

27. 根据权利要求22-26中任一项所述的方法,其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下项组成的组:mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

28. 根据权利要求22-27中任一项所述的方法,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和

所述第二抗体或其抗原结合片段同时施用。

29. 根据权利要求22-27中任一项所述的方法,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段顺序施用。

30. 根据权利要求22-29中任一项所述的方法,其中所述受试者感染SARS-CoV-2。

31. 根据权利要求22-30中任一项所述的方法,其中所述受试者患有COVID-19。

32. 一种控制病毒逃逸突变体增殖的方法,所述方法包括向受试者施用第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段均结合病毒表面蛋白,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段彼此不竞争与所述病毒表面蛋白的结合,并且进一步地,其中所述受试者被表达所述病毒表面蛋白的病毒感染。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述病毒是冠状病毒。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述冠状病毒是SARS-CoV-2,并且所述病毒表面蛋白是纤突蛋白。

35. 根据权利要求32-34中任一项所述的方法,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。

36. 根据权利要求32-35中任一项所述的方法,其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下组中的两个:

a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;

b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;

c) mAb10920;

d) mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及

e) mAb10984。

37. 根据权利要求32-36中任一项所述的方法,其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下项组成的组:mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

38. 一种包含第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其中:

a) 所述第一抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第一表位,并且所述第二抗体或其抗原结合片段结合所述SARS-CoV-2纤突蛋白的第二表位;

b) 所述第一表位和所述第二表位不同;并且

c) 与单独的所述第一抗体或其抗原结合片段或单独的所述第二抗体或其抗原结合片段相比,所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段使得SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率降低。

39. 根据权利要求38所述的药物组合物,其中SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的所述频率通过以下步骤测量:

a) 使细胞群与所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率;

b) 使可比较的细胞群与单独的所述第一抗体或其抗原结合片段或单独的所述第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细

胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率;以及

c)比较所述第一频率和所述第二频率。

40.根据权利要求38或39所述的药物组合物,其中所述第一表位和所述第二表位是非重叠的。

41.根据权利要求38-40中任一项所述的药物组合物,其中所述第一表位和所述第二表位选自自由以下项组成的组:

a)SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;

b)SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及

c)SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

42.根据权利要求38-41中任一项所述的药物组合物,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。

43.根据权利要求38-42中任一项所述的药物组合物,其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下组中的两个:

a)mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;

b)mAb10989、mAb10977和mAb10933;

c)mAb10920;

d)mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及

e)mAb10984。

44.根据权利要求38-43中任一项所述的药物组合物,其中所述第一抗体和所述第二抗体选自自由以下项组成的组:mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

45.根据权利要求38-44中任一项所述的药物组合物,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段同时施用于受试者。

46.根据权利要求38-44中任一项所述的药物组合物,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段顺序施用于受试者。

47.根据权利要求38-46中任一项所述的药物组合物,还包含药学上可接受的载体。

48.一种组合物,所述组合物包含:

a)结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第一抗体或其抗原结合片段,所述SARS-CoV-2纤突蛋白包含SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ IDNO:202中所示的氨基酸序列的重链可变区(A-HCVR)内所含的三个重链互补决定区(CDR)(A-HCDR1、A-HCDR2和A-HCDR3)和包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列的轻链可变区(A-LCVR)内所含的三个轻链CDR(A-LCDR1、A-LCDR2和A-LCDR3);

b)结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第二抗体或其抗原结合片段,所述SARS-CoV-2纤突蛋白包含SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ IDNO:640中所示的氨基酸序列的重链可变区(B-HCVR)内所含的三个重链CDR(B-HCDR1、B-HCDR2和B-HCDR3)和包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列的轻链可变区(B-LCVR)内所含的三个轻链CDR(B-LCDR1、B-LCDR2和B-LCDR3);以及

c)结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第三抗体或其抗原结合片段,所述SARS-CoV-2纤突蛋白包含SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ IDNO:608中所示的氨基酸序列的重链可变区(C-HCVR)内所含的三个重链CDR(C-

HCDR1、C-HCDR2和C-HCDR3)和包含SEQ ID NO:614中所示的氨基酸序列的轻链可变区(C-LCVR)内所含的三个轻链CDR(C-LCDR1、C-LCDR2和C-LCDR3)。

49. 根据权利要求48所述的组合物,其中A-HCDR1包含SEQ ID NO:204中所示的氨基酸序列,A-HCDR2包含SEQ ID NO:206中所示的氨基酸序列,A-HCDR3包含SEQ ID NO:208中所示的氨基酸序列,A-LCDR1包含SEQ ID NO:212中所示的氨基酸序列,A-LCDR2包含SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列,并且A-LCDR3包含SEQ ID NO:214中所示的氨基酸序列。

50. 根据权利要求49所述的组合物,其中A-HCVR包含SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列。

51. 根据权利要求49所述的组合物,其中A-LCVR包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列。

52. 根据权利要求49所述的组合物,其中A-HCVR包含SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列,并且A-LCVR包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列。

53. 根据权利要求48-52中任一项所述的组合物,其中B-HCDR1包含SEQ ID NO:642中所示的氨基酸序列,B-HCDR2包含SEQ ID NO:499中所示的氨基酸序列,B-HCDR3包含SEQ ID NO:644中所示的氨基酸序列,B-LCDR1包含SEQ ID NO:648中所示的氨基酸序列,B-LCDR2包含SEQ ID NO:650中所示的氨基酸序列,并且B-LCDR3包含SEQ ID NO:652中所示的氨基酸序列。

54. 根据权利要求53所述的组合物,其中B-HCVR包含SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列。

55. 根据权利要求53所述的组合物,其中B-LCVR包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列。

56. 根据权利要求53所述的组合物,其中B-HCVR包含SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列,并且B-LCVR包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列。

57. 根据权利要求48-56中任一项所述的组合物,其中C-HCDR1包含SEQ ID NO:169中所示的氨基酸序列,C-HCDR2包含SEQ ID NO:610中所示的氨基酸序列,C-HCDR3包含SEQ ID NO:612中所示的氨基酸序列,C-LCDR1包含SEQ ID NO:616中所示的氨基酸序列,C-LCDR2包含SEQ ID NO:584中所示的氨基酸序列,并且C-LCDR3包含SEQ ID NO:618中所示的氨基酸序列。

58. 根据权利要求57所述的组合物,其中C-HCVR包含SEQ ID NO:608中所示的氨基酸序列。

59. 根据权利要求57所述的组合物,其中C-LCVR包含SEQ ID NO:614中所示的氨基酸序列。

60. 根据权利要求57所述的组合物,其中C-HCVR包含SEQ ID NO:608中所示的氨基酸序列,并且C-LCVR包含SEQ ID NO:614中所示的氨基酸序列。

61. 一种用于治疗病毒感染的包含多种抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段通过以下步骤选择:

- a) 确定由单独的第一抗体或其抗原结合片段产生的逃逸突变体的第一频率;
- b) 确定由单独的第二抗体或其抗原结合片段产生的逃逸突变体的第二频率;
- c) 确定由所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段的组合

产生的逃逸突变体的第三频率;以及

d) 如果所述第三频率低于所述第一频率和所述第二频率,则选择所述组合用于治疗所述病毒感染;

其中所述第一抗体或其抗原结合片段结合病毒表面蛋白的第一表位,并且所述第二抗体或其抗原结合片段结合病毒表面蛋白的第二表位,并且进一步地,其中所述第一表位和所述第二表位选自由以下项组成的组:

a) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;

b) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及

c) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述病毒感染是冠状病毒感染。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述冠状病毒是SARS-CoV-2。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述逃逸突变体是SARS-CoV-2表面蛋白中的突变体。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述表面蛋白是纤突蛋白。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率通过以下步骤测量:

a) 使细胞群与所述第一抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率;

b) 使可比较的细胞群与所述第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率;

c) 使可比较的细胞群与所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达所述SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自所述细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第三频率;以及

d) 比较所述第一频率、所述第二频率和所述第三频率。

67. 根据权利要求61-66中任一项所述的方法,其中所述第一表位和所述第二表位选自由以下项组成的组:

a) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;

b) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及

c) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

68. 根据权利要求61-67中任一项所述的方法,其中所述第一抗体或其抗原结合片段和所述第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。

69. 根据权利要求61-68中任一项所述的方法,其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下组中的两个:

a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;

b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;

c) mAb10920;

d) mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及

e) mAb10984。

70. 根据权利要求61-69中任一项所述的方法, 其中所述第一抗体和所述第二抗体选自以下项组成的组: mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

抗SARS-CoV-2纤突糖蛋白抗体和抗原结合片段

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35USC§119(e)要求以下美国临时申请号的优先权:2020年5月26日提交的63/030,260;2020年6月1日提交的63/033,198;2020年10月20日提交的63/093,888;2020年11月10日提交的63/112,143;2021年1月26日提交的63/141,956;2021年1月27日提交的63/142,472;2021年2月3日提交的63/145,389;以及2021年3月10日提交的63/159,437,这些临时申请均全文通过引用并入本文以用于所有目的。

[0003] 联邦资助的研究或开发

[0004] 本发明根据美国卫生与公众服务部授予的HHS0100201700020C协议在政府支持下完成。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请通过引用并入于2021年5月24日创建并含有922,784个字节的以计算机可读形式作为文件10810W001-Sequence.txt提交的序列表。

技术领域

[0007] 本发明涉及与冠状病毒纤突蛋白特异性结合的抗体和抗原结合片段以及用于用所述抗体和片段治疗或预防冠状病毒感染的方法。

背景技术

[0008] 新鉴定的病毒(如冠状病毒)因其没有被充分表征而可能难以治疗。这些新鉴定的病毒的出现突出了对开发新型抗病毒策略的需要。严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)是引起严重急性呼吸疾病COVID-19的新出现的冠状病毒。截止2020年3月20日,世界卫生组织(World Health Organization)已经报告在168个国家、地区或区域中有209,839例确诊病例,导致8,778例死亡。COVID-19的临床特征包含发烧、干咳和疲劳,并且疾病可能会导致呼吸衰竭,从而导致死亡。

[0009] 迄今为止,还没有用于预防或治疗SARS-CoV-2感染的疫苗或治疗剂。鉴于对人类健康的持续威胁,迫切需要用于SARS-CoV-2控制的预防性和治疗性抗病毒疗法。因为这种病毒使用其纤突糖蛋白与细胞受体ACE2和丝氨酸蛋白酶TMPRSS2相互作用以进入靶细胞中,所以这种纤突蛋白表示抗体治疗的有吸引力的靶标。具体地,以高亲和力与SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)特异性结合并抑制病毒感染性的完全人抗体在预防和治疗COVID-19中可能是重要的。

发明内容

[0010] 需要中和治疗性抗SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)抗体和其用于治疗或预防病毒感染的用途。本公开部分地通过提供人抗SARS-CoV-2-S抗体(如表1的抗体)和其组合(包含例如与其他治疗剂(例如,抗炎剂、抗疟疾剂、抗病毒剂或其他抗体或抗原结合片段)的组合)和使用其以治疗病毒感染的方法来解决这个需要。

[0011] 本公开提供了与SARS-CoV-2-S特异性结合的中和性人抗原结合蛋白,例如抗体或其抗原结合片段。

[0012] 在一个方面,本公开提供了一种选择用于治疗病毒感染的多种抗体或其抗原结合片段的方法,包括:a) 确定由单独的第一抗体或其抗原结合片段产生的逃逸突变体的第一频率;b) 确定由单独的第二抗体或其抗原结合片段产生的逃逸突变体的第二频率;c) 确定由第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段的组合产生的逃逸突变体的第三频率;以及d) 如果第三频率低于第一频率和第二频率,则选择该组合用于治疗病毒感染;其中第一抗体或其抗原结合片段结合病毒表面蛋白的第一表位,并且第二抗体或其抗原结合片段结合病毒表面蛋白的第二表位,并且进一步地,其中第一表位和第二表位是非重叠的。

[0013] 在一些情况下,病毒感染是冠状病毒感染。在一些实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2。在一些情况下,逃逸突变体是SARS-CoV-2表面蛋白中的突变体。在一些实施方案中,表面蛋白是纤突蛋白。

[0014] 在该方法的一些实施方案中,SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率通过以下步骤测量:a) 使细胞群与第一抗体或其抗原结合片段接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率;b) 使可比较的细胞群与第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率;c) 使可比较的细胞群与第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第三频率;以及d) 比较第一频率、第二频率和第三频率。

[0015] 在一些情况下,第一表位和第二表位选自由以下项组成的组:a) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;b) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及c) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

[0016] 在各种实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。在一些情况下,第一抗体和第二抗体选自以下组中的两个:a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;c) mAb10920;d) mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及e) mAb10984。在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体选自由以下项组成的组:mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

[0017] 在一个方面,本公开提供了一种治疗受试者的病毒感染的方法,包括向受试者施用第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段,其中:a) 第一抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第一表位,并且第二抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第二表位;b) 第一表位和第二表位不同;并且c) 与施用单独的第一抗体或其抗原结合片段或单独的第二抗体或其抗原结合片段相比,施用第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段使得SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率降低。

[0018] 在该方法的一些实施方案中,SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率通过以下步骤测量:a) 使细胞群与第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率;b) 使可比较的细胞群与单独的第一抗体或其抗原结合片段或

单独的第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率;以及c)比较第一频率和第二频率。

[0019] 在一些情况下,第一表位和第二表位是非重叠的。在一些实施方案中,第一表位和第二表位选自由以下项组成的组:a)SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;b)SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及c)SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

[0020] 在各种实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。在一些情况下,第一抗体和第二抗体选自以下组中的两个:a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;c) mAb10920;d) mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及e) mAb10984。在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体选自由以下项组成的组:mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

[0021] 在各种实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段同时施用。在各种实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段顺序施用。

[0022] 在一些情况下,受试者感染SARS-CoV-2。在一些实施方案中,受试者患有COVID-19。

[0023] 在一个方面,本公开提供了一种治疗受试者的病毒感染的方法,包括向受试者施用第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段,其中:a) 第一抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第一表位,并且第二抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第二表位;b) 第一表位和第二表位是非重叠的;并且c) 与施用结合SARS-CoV-2纤突蛋白的重叠表位的抗体的组合相比,施用第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段使得SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率降低。

[0024] 在该方法的一些实施方案中,SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率通过以下步骤测量:a) 使细胞群与第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率;b) 使可比较的细胞群与结合SARS-CoV-2纤突蛋白的重叠表位的抗体的组合接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率;以及c) 比较第一频率和第二频率。

[0025] 在一些情况下,第一表位和第二表位选自由以下项组成的组:a)SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;b)SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及c)SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

[0026] 在各种实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。在一些情况下,第一抗体和第二抗体选自以下组中的两个:a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;c) mAb10920;d) mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及e) mAb10984。在一些情况下,第一抗体和第二抗体选自由以下项组成的组:mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。在一些情况下,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段同时施用。在一些情况下,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段顺序施用。

[0027] 在一些实施方案中,受试者感染SARS-CoV-2。在一些实施方案中,受试者患有

COVID-19。

[0028] 在一个方面,本公开提供了一种控制病毒逃逸突变体增殖的方法,该方法包括向受试者施用第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段,其中第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段均结合病毒表面蛋白,其中第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段彼此不竞争与病毒表面蛋白的结合,并且进一步地,其中受试者被表达病毒表面蛋白的病毒感染。

[0029] 在一些实施方案中,病毒是冠状病毒。在一些情况下,冠状病毒是SARS-CoV-2,并且病毒表面蛋白是纤突蛋白。

[0030] 在各种实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。在一些情况下,第一抗体和第二抗体选自以下组中的两个:a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;c) mAb10920;d) mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及e) mAb10984。在一些情况下,第一抗体和第二抗体选自由以下项组成的组:mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

[0031] 在一个方面,本公开提供了一种包含第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其中:a) 第一抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第一表位,并且第二抗体或其抗原结合片段结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第二表位;b) 第一表位和第二表位不同;并且c) 与单独的第一抗体或其抗原结合片段或单独的第二抗体或其抗原结合片段相比,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段使得SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率降低。

[0032] 在一些实施方案中,SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率通过以下步骤测量:a) 使细胞群与第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率;b) 使可比较的细胞群与单独的第一抗体或其抗原结合片段或单独的第二抗体或其抗原结合片段接触,并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触,对来自细胞群的核酸进行测序,并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率;以及c) 比较第一频率和第二频率。

[0033] 在一些情况下,第一表位和第二表位是非重叠的。在一些实施方案中,第一表位和第二表位选自由以下项组成的组:a) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452;b) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486;以及c) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

[0034] 在各种实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。在一些情况下,第一抗体和第二抗体选自以下组中的两个:a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;b) mAb10989、mAb10977和mAb10933;c) mAb10920;d) mAb10954、mAb10986和mAb10964;以及e) mAb10984。在一些实施方案中,第一抗体和第二抗体选自由以下项组成的组:mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

[0035] 在一些情况下,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段同时施用于受试者。在一些情况下,第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段顺序施用于受试者。在一些实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0036] 在一个方面,本公开提供了一种组合物,包含:a) 结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第一抗体或其抗原结合片段,该SARS-CoV-2纤突蛋白包含SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列,

其中该分离的抗体或抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列的重链可变区(A-HCVR)内所含的三个重链互补决定区(CDR)(A-HCDR1、A-HCDR2和A-HCDR3)和包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列的轻链可变区(A-LCVR)内所含的三个轻链CDR(A-LCDR1、A-LCDR2和A-LCDR3);b)结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第二抗体或其抗原结合片段,该SARS-CoV-2纤突蛋白包含SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列,其中该分离的抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列的重链可变区(B-HCVR)内所含的三个重链CDR(B-HCDR1、B-HCDR2和B-HCDR3)和包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列的轻链可变区(B-LCVR)内所含的三个轻链CDR(B-LCDR1、B-LCDR2和B-LCDR3);以及c)结合SARS-CoV-2纤突蛋白的第三抗体或其抗原结合片段,该SARS-CoV-2纤突蛋白包含SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列,其中该分离的抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:608中所示的氨基酸序列的重链可变区(C-HCVR)内所含的三个重链CDR(C-HCDR1、C-HCDR2和C-HCDR3)和包含SEQ ID NO:614中所示的氨基酸序列的轻链可变区(C-LCVR)内所含的三个轻链CDR(C-LCDR1、C-LCDR2和C-LCDR3)。

[0037] 在一些实施方案中,A-HCDR1包含SEQ ID NO:204中所示的氨基酸序列,A-HCDR2包含SEQ ID NO:206中所示的氨基酸序列,A-HCDR3包含SEQ ID NO:208中所示的氨基酸序列,A-LCDR1包含SEQ ID NO:212中所示的氨基酸序列,A-LCDR2包含SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列,并且A-LCDR3包含SEQ ID NO:214中所示的氨基酸序列。

[0038] 在一些实施方案中,A-HCVR包含SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列。

[0039] 在一些实施方案中,A-LCVR包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列。

[0040] 在一些实施方案中,A-HCVR包含SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列,并且A-LCVR包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列。

[0041] 在一些实施方案中,B-HCDR1包含SEQ ID NO:642中所示的氨基酸序列,B-HCDR2包含SEQ ID NO:499中所示的氨基酸序列,B-HCDR3包含SEQ ID NO:644中所示的氨基酸序列,B-LCDR1包含SEQ ID NO:648中所示的氨基酸序列,B-LCDR2包含SEQ ID NO:650中所示的氨基酸序列,并且B-LCDR3包含SEQ ID NO:652中所示的氨基酸序列。

[0042] 在一些实施方案中,B-HCVR包含SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列。

[0043] 在一些实施方案中,B-LCVR包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列。

[0044] 在一些实施方案中,B-HCVR包含SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列,并且B-LCVR包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列。

[0045] 在一些实施方案中,C-HCDR1包含SEQ ID NO:169中所示的氨基酸序列,C-HCDR2包含SEQ ID NO:610中所示的氨基酸序列,C-HCDR3包含SEQ ID NO:612中所示的氨基酸序列,C-LCDR1包含SEQ ID NO:616中所示的氨基酸序列,C-LCDR2包含SEQ ID NO:584中所示的氨基酸序列,并且C-LCDR3包含SEQ ID NO:618中所示的氨基酸序列。

[0046] 在一些实施方案中,C-HCVR包含SEQ ID NO:608中所示的氨基酸序列。

[0047] 在一些实施方案中,C-LCVR包含SEQ ID NO:614中所示的氨基酸序列。

[0048] 在一些实施方案中,C-HCVR包含SEQ ID NO:608中所示的氨基酸序列,并且C-LCVR包含SEQ ID NO:614中所示的氨基酸序列。

[0049] 在一个方面,本公开提供了一种用于治疗病毒感染的包含多种抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段通过以下步骤选择:a)确定由单独的

第一抗体或其抗原结合片段产生的逃逸突变体的第一频率; b) 确定由单独的第二抗体或其抗原结合片段产生的逃逸突变体的第二频率; c) 确定由第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段的组合产生的逃逸突变体的第三频率; 以及d) 如果第三频率低于第一频率和第二频率, 则选择该组合用于治疗病毒感染; 其中第一抗体或其抗原结合片段结合病毒表面蛋白的第一表位, 并且第二抗体或其抗原结合片段结合病毒表面蛋白的第二表位, 并且进一步地, 其中第一表位和第二表位选自由以下项组成的组: i) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452; ii) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486; 以及iii) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

[0050] 在一些情况下, 病毒感染是冠状病毒感染。在一些情况下, 冠状病毒是SARS-CoV-2。

[0051] 在一些实施方案中, 逃逸突变体是SARS-CoV-2表面蛋白中的突变体。在一些情况下, 表面蛋白是纤突蛋白。

[0052] 在一些实施方案中, SARS-CoV-2纤突蛋白逃逸突变体的频率通过以下步骤测量: a) 使细胞群与第一抗体或其抗原结合片段接触, 并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触, 对来自细胞群的核酸进行测序, 并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第一频率; b) 使可比较的细胞群与第二抗体或其抗原结合片段接触, 并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触, 对来自细胞群的核酸进行测序, 并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第二频率; c) 使可比较的细胞群与第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段接触, 并与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒接触, 对来自细胞群的核酸进行测序, 并确定SARS-CoV-2纤突蛋白突变的第三频率; 以及d) 比较第一频率、第二频率和第三频率。

[0053] 在一些实施方案中, 第一表位和第二表位选自由以下项组成的组: a) SEQ ID NO:832的氨基酸432-452; b) SEQ ID NO:832的氨基酸471-486; 以及c) SEQ ID NO:832的氨基酸491-515。

[0054] 在各种实施方案中, 第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段选自表1的抗体或抗原结合片段。在一些情况下, 第一抗体和第二抗体选自以下组中的两个: a) mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934; b) mAb10989、mAb10977和mAb10933; c) mAb10920; d) mAb10954、mAb10986和mAb10964; 以及e) mAb10984。在一些情况下, 第一抗体和第二抗体选自由以下项组成的组: mAb10987、mAb10934、mAb10989和mAb10933。

[0055] 在各个实施方案中, 上文或本文所讨论的实施方案的特征或组分中的任何特征或组分可以组合, 并且此类组合涵盖在本公开的范围。上文或本文所讨论的任何特定值可以与上文或本文所讨论的另一个相关值组合以列举具有表示范围的上端和下端的值的范围, 并且此类范围涵盖在本公开的范围。

附图说明

[0056] 图1示出了与单独的抗SARS-CoV-2纤突蛋白抗体或抗SARS-CoV-2纤突蛋白抗体的组合温育后病毒RNA中的突变氨基酸。显示了来自在第1次传代时具有最高抗体浓度和可检测的细胞病变效应(CPE)的孔的病毒RNA相对于输入病毒的变化。在所述条件下以高于10%的频率存在的所有突变氨基酸残基以阴影框显示。位置444、445、450、453、484和486处的纤突蛋白残基位于受体结合结构域内。同种型对照和仅病毒条件下的突变氨基酸可能代表病

毒的组织培养适应。

[0057] 图2示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0058] 图3示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0059] 图4示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0060] 图5示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0061] 图6示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0062] 图7示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0063] 图8示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0064] 图9示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0065] 图10A和图10B显示了 **VelocImmune**[®] 小鼠 (图10A; N=185) 和恢复期人供体 (图10B; N=68) 的针对SARS-CoV-2的分离的中和抗体的成对的重链(X轴) 和轻链(Y轴) 的V基因频率。圆圈的颜色和大小对应于分离的中和抗体的受体中存在的重链和轻链对的数量。在VSV假颗粒中和测定中, 中和被定义为在抗体的稀释度为1:4 (~2 μ g/ml) 的情况下 >70%。

[0066] 图11A、图11B、图11C和图11D显示了抗SARS-CoV-2纤突mAb的中和效力。图11A显示了抗SARS-CoV-2纤突mAb的中和效力。将抗纤突mAb、IgG1同种型对照和重组二聚ACE2 (hACE2.hFc) 的连续稀释液与pVSV-SARS-CoV-2-S-mNeon一起添加到Vero细胞, 并在感染后24小时以病毒感染性的读数对mNeon表达进行测量。将数据绘制为仅相对于病毒感染对照中和的百分比。图11B显示了抗纤突mAb、重组二聚体ACE2和IgG1同种型对照针对Calu3细胞中的非复制型pVSV-SARS-CoV-2-S-mNeon的中和效力。图11C显示了单独的抗纤突mAb和mAb的组合针对Vero细胞中的复制型VSV-SARS-CoV-2-S病毒的中和效力。细胞用MOI 1的病毒感染并在感染后24小时对病毒蛋白进行染色以测量感染性。图11D显示了单独的抗纤突mAb和针对VeroE6细胞中的SARS-CoV-2-S病毒的mAb的组合的中和效力。

[0067] 图12A、图12B和图12C显示了切割位点突变对中和和感染性的影响。图12A, S1/S2多元切割位点的WT氨基酸序列加下划线。掺入到SARS-CoV-2S FurMut和FurKO突变体中的替代物用红色标记。图12B, Vero细胞中的先导抗体的四点中和曲线 (Log M: -7.48、-8.48、-9.48和-10.48)。图12C, WT和切割突变体在Vero和Calu-3细胞中分别在24和48小时的感染性。将突变体的感染性归一化为每种细胞类型中WT病毒的感染性。

[0068] 图13显示了抗原结合片段 (Fab) 和全长抗体对Vero细胞中的VSV-纤突假颗粒的中和效力。

[0069] 图14显示了根据针对不同的抗SARS-CoV-2mAb的预混合结合测定的矩阵进行的表位箱 (bin) 分析。针对如所描述的九个抗SARS-CoV-2mAb进行表位分箱 (binning)。每个图有

三个时期(I、II和III)。在I期中,将抗SARS-CoV-2mAb(20ug/ml)装载到抗人Fc探针。在II期中,人IgG1阻断mAb溶液(100ug/ml)。在III期中,每个600nM抗SARS-CoV-2mAb结合位点的100nM SARS CoV-2RBD-MMH预混合复合物的溶液流动经过mAb捕获探针。

[0070] 图15显示了纤突蛋白RBD结构域的结构3D表面模型,其示出了ACE2界面和HDX-MS表位映射结果。与ACE2接触的RBD残基以黄色表示(上图)。用表示如通过HDX-MS实验测定的保护程度的颜色来指示受抗SARS-CoV2纤突抗体保护的RBD残基。根据PDB 6M17重现RBD结构。

[0071] 图16A和图16B显示了mAb10933和mAb10987与SARS-CoV-2RBD的复合物。图16A显示了mAb10933+RBD+mAb10987复合物的3.9Å cryoEM图,根据图16B的细化模型中的链着色。RBD为深蓝色,mAb10933重链和轻链分别为绿色和青色,mAb10987重链和轻链分别为黄色和红色。

[0072] 图17显示了cryoEM数据统计。报告了针对图16A和图16B中所示出的mAb10987+mAb10933+SARS-CoV-2RBD复合物结构的数据收集和细化统计。

[0073] 图18A、图18B和图18C:图18A显示了编码纤突蛋白而不是VSV糖蛋白的残基1-1255的VSV-SARS-CoV-2-S病毒基因组的示意图。N,核蛋白,P,磷蛋白,M,基质,以及L,大聚合酶。图18B显示在抗体稀释液的存在下,总共 1.5×10^6 pfu的亲本VSV-SARS-CoV-2-S病毒在Vero E6细胞上传代4天。通过监测病毒诱导的细胞病变效应(CPE)筛选细胞的病毒复制。从具有可检测的病毒复制的最高浓度抗体选择下的孔中收集上清液和细胞RNA(圆形孔; $\geq 20\%$ CPE)。对于第二轮选择,将100 μ L P1上清液在新鲜Vero E6细胞中在增加的抗体选择下扩增4天。从具有可检测病毒复制的最高抗体浓度的孔中收集RNA。对两次传代的RNA进行深度测序以鉴定逃逸突变体。图18C显示了逃逸研究的传代结果,包括在每个稀释度中观察到的CPE的百分比(红色 $\geq 20\%$ CPE并且蓝色 $< 20\%$ CPE)。黑框表示传代并在P1中测序或在P2中测序的稀释度。对每个传代的无抗体对照进行测序以监测组织培养适应。

[0074] 图19显示了传代病毒的深度测序鉴定出逃逸突变体。VSV-SARS-CoV-2-S病毒与单独的或组合的抗纤突mAb混合。分离来自在第1次传代或第2次传代时具有最高mAb浓度和可检测的细胞病变效应(CPE)的孔的病毒RNA(感染后4天收集),并进行RNAseq分析以鉴定纤突蛋白序列相对于输入病毒的变化。显示了纤突蛋白内的所有突变氨基酸残基。选择用于测序的孔的具体条件(浓度,单位为 μ g/ml)显示在左侧栏中(有关测定设计的略图,参见图18B)。红色框突出显示在左侧栏中指定的每种条件下相对于输入病毒发生突变的残基。每个框中的百分比标识了含有相应突变体序列的测序读数的%。映射到RBD结构域的残基以蓝色突出显示。由于在仅含病毒的对照孔中无法检测到CPE,因此未对第2次传代样品10989/87进行测序。

[0075] 图20显示了单独的抗纤突抗体和抗体组合针对编码单独的逃逸突变体的假颗粒的中和效力。将通过RNAseq分析鉴定的RBD结构域内的逃逸突变被克隆并在假颗粒上表达以评估它们对mAb中和效力的影响。以蓝色着色的框突出显示导致IC50相对于野生型假颗粒至少降低1.5log的条件。在其中一种mAb没有效力(例如:K444Q和mAb10933/mAb10987)的mAb组合条件下,可以看到IC50降低小于1log。NC=由于中和能力差而无法计算IC50。

[0076] 图21示出mAb10933和mAb10987的组合足以中和表达SARS-CoV-2UK B.1.1.7变体纤突蛋白的VSV。

[0077] 图22显示了抗体组合相对于单独的抗体降低逃逸频率的能力,以及某些组合即使相对于其他组合也可以降低逃逸频率。mAb10933在2次传代后观察到完全逃逸,mAb10987在3次传代后观察到完全逃逸,并且mAb10985在1次传代后观察到完全逃逸。然而,mAb10933+mAb10987将完全逃逸推至7次传代,而mAb10933+mAb10987+mAb10985即使在11次传代后也没有观察到逃逸。P1=第1次传代,P2=第2次传代,依此类推。

[0078] 图23A和图23B:图23A显示了中和曲线,并且图23B显示了相对于亲本D614G变体的中和倍数降低。评估了全UK B.1.1.7 (H69del、V70del、Y145del、N501Y、A570D、D614G、P681H、T716I、S982A、D1118H) 和南非B.1.351 (D80Y、D215Y、L241del、L242del、A243del、L242del、K417N、E484K、N501Y、D614G、A701V) 变体。评估了来自加利福尼亚B.1.429 (L452R) 和巴西P.1 (E484K/K417T) 变体的关键RBD残基。E484K变体已在许多全球谱系中发现,包括纽约B.1.526谱系。

[0079] 图24A、图24B、图24C和图24D显示了单独抗体和抗体组合的体外逃逸。VSV纤突重组病毒在单独抗体或抗体组合的压力下传代。图24A:如细胞病变效应(CPE)所证明的病毒完全逃逸抗体中和活性的传代次数显示为抗体浓度为10 μ g/ml或更高的孔的“完全逃逸”或抗体浓度为1 μ g/ml-10 μ g/ml的孔的“部分逃逸”。图24B:通过RNAseq分析来自在每种抗体条件下选择的具有完全逃逸的孔的上清液鉴定的纤突蛋白中的突变列于表中。在该氨基酸位置处来自总病毒读数的每个突变的频率列在表中。只有那些以高于15%的频率存在的突变被显示为更小的变体不太可能有助于完全逃逸。*COV2-2130+COV2-2196组合仅传代了三次,并通过传代三次保持其中和效力。图24C:两种mAb REGN10987+REGN10933组合和三种mAb REGN10987+REGN10933+REGN10985组合与单独mAb的中和效力。图24D:RBD-REGN10933-REGN10987-REGN10985模型的两个视图。RBD被着色成白色;REGN10933显示为蓝色,REGN10987显示为红色,并且REGN10985显示为绿色。RBD的表面表示为白色,每种抗体有接触斑块,颜色如组A所示。

[0080] 图25A、图25B和图25C显示了在来自用REGN10987或REGN10933作为单一疗法或用REGEN-COV组合在预防和治疗环境中治疗的仓鼠肺的病毒中鉴定的SARS-CoV-2纤突变体的频率。图25A:研究设计。图25B和图25C:图显示了在来自(图25B)预防组或(图25C)治疗组的样品中鉴定的纤突蛋白序列的氨基酸变体的分布和频率。突变位点用灰线表示,点表示每只动物中变体的频率。纤突蛋白结构域如图所示进行颜色编码,并且标记RBD中的所有氨基酸变化。

[0081] 图26A和图26B显示了来自住院患者的SARS-CoV-2阳性样品中病毒序列的变体分析。图显示了在来自安慰剂、REGEN-COV低剂量和REGEN-COV高剂量治疗患者的样品中鉴定的纤突蛋白序列的氨基酸变体的分布。突变位点用箭头表示,箭头长度表示具有1个或多个含有变体的样品的患者数量。纤突蛋白结构域如图所示进行颜色编码,并且标记RBD中的所有氨基酸变化。图26A:箭头突出显示来自至少一名患者的1个或多个样品中鉴定的变体。图26B:箭头突出显示来自至少一名患者的2个或多个样品中鉴定的变体。

[0082] 图27A和图27B显示了来自住院患者的REGEN-COV2治疗的SARS-CoV-2阳性样品中变体的病毒载量和纵向频率。通过定量RT-PCR确定病毒载量。图27A:N501T和图27B:K537R变体频率由黑线表示为具有nSNP的读数相对于覆盖读数总数的百分比。直方图显示了在变体位置的总(蓝色)和突变(品红色)读数覆盖率。

[0083] 图28A和图28B:来自非住院患者的SARS-CoV-2阳性样品中病毒序列的变体分析。图显示了在来自安慰剂、REGENCOV低剂量和REGEN-COV高剂量治疗患者的样品中鉴定的纤突蛋白序列的氨基酸变体的分布。突变位点用箭头表示,箭头长度表示具有1个或多个含有变体的样品的患者数量。纤突蛋白结构域如图所示进行颜色编码,并且标记RBD中的所有氨基酸变化。图28A:箭头突出显示来自至少一名患者的1个或多个样品中鉴定的变体。图28B:箭头突出显示来自至少一名患者的2个或多个样品中鉴定的变体。

[0084] 图29A、图29B-1和图29B-2:来自非住院患者SARS-CoV-2阳性样品中变体的病毒载量和纵向频率。通过定量RT-PCR确定病毒载量。图29A:S494P和图29B:G446V和变体频率由黑线表示为具有nSNP的读数相对于覆盖读数总数的百分比。直方图显示了在变体位置的总(蓝色)和突变(品红色)读数覆盖率。

[0085] 图30显示了来自两个临床研究(研究2066和研究2067)的每个临床组的测序数据的统计值。图中所示的表格包括每个研究的患者、样品和氨基酸变化计数。

[0086] 图31A和图31B示出了来自住院患者的SARS-CoV-2阳性样品中S477N的病毒载量和纵向频率。通过定量RT-PCR确定病毒载量。变体频率由黑线表示为具有nSNP的读数相对于覆盖读数总数的百分比。直方图显示了在变体位置的总(蓝色)和突变(品红色)读数覆盖率。

[0087] 图32A和图32B示出了来自非住院患者的SARS-CoV-2阳性样品中S477N的病毒载量和纵向频率。通过定量RT-PCR确定病毒载量。变体频率由黑线表示为具有nSNP的读数相对于覆盖读数总数的百分比。直方图显示了在变体位置的总(蓝色)和突变(品红色)读数覆盖率。

[0088] 图33A和图33B显示了相对于亲本D614G变体的中和曲线和中和倍数降低。评估了G446V、S477N、N501Y、S494P和K537R变体。N501Y变体用于替代N501T。

[0089] 图34示出了REGEN-COV组合和单个抗体针对仓鼠肺中鉴定的纤突蛋白变体的相对中和效力。对于通过仓鼠肺RNA的RNAseq分析鉴定的每个变体,示出了相对于亲本病毒的中和效力降低。如果在感染仓鼠中鉴定出的确切变体无法获得中和效力(N/A),则示出相同位置的替代变体的数据。

具体实施方式

[0090] 在描述本发明方法之前,应当理解本发明不限于所描述的具体方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应理解,本文所使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,而不旨在是限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求书限制。

[0091] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管在本发明的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本文所提到的所有出版物均通过全文引用的方式并入本文中。

[0092] 术语“冠状病毒”或“CoV”是指冠状病毒家族的任何病毒,包括但不限于SARS-CoV-2、MERS-CoV和SARS-CoV。SARS-CoV-2是新出现的冠状病毒。SARS-CoV-2也被称为2019-nCoV。其通过病毒纤突蛋白与人宿主细胞受体血管紧张素转换酶2(ACE2)结合。纤突蛋白还与活化纤突蛋白以对病毒进行膜融合的TMPRSS2结合并由其切割。

[0093] 术语“CoV-S”（也被称为“S”或“S蛋白”）是指冠状病毒的纤突蛋白，并且可以是指特异性S蛋白，如SARS-CoV-2-S、MERS-CoV S和SARS-CoV S。SARS-CoV-2纤突蛋白是组装成构成包膜冠状病毒颗粒的表面的纤突或膜粒的三聚体的1273氨基酸类型I膜糖蛋白。蛋白质具有归因于S蛋白的N端(S1)部分和C端(S2)部分的两个重要功能：宿主受体结合和膜融合。CoV-S通过S1亚基中存在的受体结合结构域(RBD)与其同源受体结合。全长SARS-CoV-2纤突蛋白的氨基酸序列通过SEQ IDNO:832中提供的氨基酸序列来例示。术语“CoV-S”包含从不同的CoV分离物分离的CoV纤突蛋白的蛋白质变体以及重组CoV纤突蛋白或其片段。所述术语还涵盖与例如组氨酸标签、小鼠或人Fc或单个序列(ROR1)偶联的CoV纤突蛋白或其片段。

[0094] 如本文所使用的，术语“冠状病毒感染”或“CoV感染”是指感染冠状病毒，如SARS-CoV-2、MERS-CoV或SARS-CoV。所述术语包含通常在下呼吸道中的冠状病毒呼吸道感染。症状可以包含高烧、干咳、呼吸短促、肺炎、胃肠道症状(如腹泻)、器官衰竭(肾衰竭和肾功能障碍)、脓毒性休克和严重病例的死亡。

[0095] 病毒

[0096] 本发明包含用于治疗或预防受试者的病毒感染的方法。术语“病毒”包含其在受试者体内的感染可通过施用抗CoV-S抗体或其抗原结合片段来治疗或预防的任何病毒(例如，其中病毒的感染性至少部分地依赖于CoV-S)。在本发明的实施方案中，“病毒”是表达纤突蛋白(例如，CoV-S)的任何病毒。术语“病毒”还包含CoV-S依赖性呼吸道病毒，其是使受试者的呼吸组织(例如，上和/或下呼吸道、气管、细支气管、肺)感染并且可通过施用抗CoV-S抗体或其抗原结合片段治疗或预防的病毒。例如，在本发明的实施方案中，病毒包含冠状病毒、SARS-CoV-2(严重急性呼吸综合征冠状病毒2)、SARS-CoV(严重急性呼吸综合征冠状病毒)和MERS-CoV(中东呼吸综合征(MERS)冠状病毒)。冠状病毒可以包含 α 冠状病毒、 β 冠状病毒、 γ 冠状病毒和 δ 冠状病毒的属。在一些实施方案中，本文所提供的抗体或抗原结合片段可以与 α 冠状病毒、 β 冠状病毒、 γ 冠状病毒和/或 δ 冠状病毒结合和/或中和所述 α 冠状病毒、所述 β 冠状病毒、所述 γ 冠状病毒和/或所述 δ 冠状病毒。在某些实施方案中，这种结合和/或中和可以对特定冠状病毒属或对属的特定亚群具有特异性。“病毒感染”是指病毒在受试者体内的侵袭和繁殖。

[0097] 冠状病毒是球形的，其直径为大约125nm。冠状病毒最显著的特征是从病毒体的表面产生的棒状纤突突出。这些纤突是病毒体的定义性特征并且给予其日冕的外观，这促使其具有冠状病毒这一名称。在病毒体的包膜内的是核衣壳。冠状病毒具有螺旋对称的核衣壳，这在正义RNA病毒之间是不常见的，但对于负义RNA病毒而言是更加常见的。SARS-CoV-2、MERS-CoV和SARS-CoV属于冠状病毒家族。病毒体到宿主细胞的初始附着是通过S蛋白与其受体之间的相互作用而引发的。受体结合结构域(RBD)在冠状病毒S蛋白的S1区内的位点取决于病毒而变化，其中一些病毒的RBD在S1的C端处。S蛋白/受体相互作用是冠状病毒使宿主物种感染的主要决定因素并且还控制病毒的组织向性。许多冠状病毒将肽酶用作其细胞受体。受体结合后，病毒接下来必须获得进入宿主细胞细胞质的途径。这通常通过组织蛋白酶、TMPRSS2或另一种蛋白酶对S蛋白进行酸依赖性蛋白切割、然后将病毒和细胞膜融合来完成。

[0098] 抗CoV-S抗体和抗原结合片段

[0099] 本发明提供了与CoV纤突蛋白或其抗原片段特异性结合的抗原结合蛋白,如抗体和其抗原结合片段。

[0100] 如本文所使用的,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,其包括四个多肽链、通过二硫键(即,“全抗体分子”)互连的两个重链(HC)和两个轻链(LC)及其多聚体(例如,IgM)。示例性抗体包含例如表1中所列的抗体。每个重链包括重链可变区(“HCVR”或“V_H”)和重链恒定区(包含结构域C_H1、C_H2和C_H3)。每个轻链包含轻链可变区(“LCVR”或“V_L”)和轻链恒定区(C_L)。V_H区和V_L区可以被进一步细分成被称作互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着更保守的被称作构架区(FR)的区。每个V_H和V_L包括从氨基端到羧基端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链CDR也可以被称作HCDR或CDR-H,并且如上文所描述的进行编号(例如,HCDR1、HCDR2和HCDR3或CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)。同样,轻链CDR可以被称作LCDR或CDR-L,并编号LCDR1、LCDR2和LCDR3或CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在本发明的某些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)的FR与人种系序列相同,或者是天然或人工修饰的。示例性人种系序列包含但不限于VH3-66和Vk1-33。因此,本公开提供了抗CoV-S抗体或其抗原结合片段(例如,抗SARS-CoV-2-S抗体或其抗原结合片段),其包括VH3-66或Vk1-33可变重链区内的表1的HCDR和LCDR序列。本文的单克隆抗体可以用“mAb”后接数字(例如,mAb10933)或“REGN”后接数字(例如,REGN10933)来命名。应当理解,“mAb”和“REGN”可以互换使用(例如,mAb10933是与REGN10933相同的抗体)。

[0101] 通常,重免疫球蛋白链和轻免疫球蛋白链两者的可变结构域包括三个高变区(也称为互补决定区(CDR)),其位于相对保守的构架区(FR)内。通常,从N端到C端,轻链可变结构域和重链可变结构域两者包括FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。在本发明的一个实施方案中,对每个结构域的氨基酸分配是根据以下的定义:具有免疫学意义的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),Kabat等人;国立卫生研究院,Bethesda,Md.;第5版;NIH公布号91-3242(1991);Kabat(1978)高级蛋白质化学(Adv.Prot.Chem.)32:1-75;Kabat等人,(1977)生物化学杂志(J.Biol.Chem.)252:6609-6616;Chothia等人,(1987)分子生物学杂志(J Mol.Biol.)196:901-917或Chothia等人,(1989)自然(Nature)342:878-883。

[0102] 本发明包含单克隆抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)以及包括多个分离的单克隆抗原结合蛋白的单克隆组合物。如本文所使用的,术语“单克隆抗体”是指基本上同质的抗体的群,即,除可以少量存在的可能的天然存在的突变之外,包括所述群的抗体分子的氨基酸序列相同。此类单克隆抗体和片段在组合物中的“多个”是指相同(即,如上文所讨论的,除可以少量存在的可能的天然存在的突变之外,氨基酸序列相同)的抗体和片段的浓度,所述浓度高于自然界中正常存在(例如,在如小鼠或人的宿主生物体的血液中)的浓度。

[0103] 在本发明的实施方案中,抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)包括例如IgA型(例如,IgA1或IgA2)、IgD型、IgE型、IgG型(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)或IgM型的重链恒定结构域。在本发明的实施方案中,抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)包括例如κ型或λ型的轻链恒定结构域。

[0104] 如本文所使用的,术语“人”抗原结合蛋白(如抗体)包含具有衍生自人细胞中或移植到非人细胞(例如,小鼠细胞)中的人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。参

见例如,US8502018、US6596541或US5789215。本发明的人mAb可以包含并非由例如CDR(并且具体地,CDR3)中的人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”不旨在包含其中衍生自另一种哺乳动物物种(例如,小鼠)的种系的CDR序列已经移植到人FR序列上的mAb。所述术语包含在非人哺乳动物或非人哺乳动物细胞中重组产生的抗体。所述术语不旨在包含从人类受试者中分离或产生的抗体。参见下文。

[0105] 本发明包含抗CoV-S嵌合抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)和其使用方法。如本文所使用的,“嵌合抗体”是具有来自第一抗体的可变结构域和来自第二抗体的恒定结构域的抗体,其中第一抗体和第二抗体来自不同物种。(US4816567;以及Morrison等人,(1984)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)81:6851-6855)。

[0106] 术语“重组”抗原结合蛋白(如抗体或其抗原结合片段)是指通过本领域已知为重组DNA技术(其包含例如DNA剪接和转基因表达)的技术或方法而产生、表达、分离或获得的此类分子。所述术语包含在非人类哺乳动物(包含转基因非人类哺乳动物,例如,转基因小鼠)或细胞(例如,CHO细胞)表达系统中表达或从重组组合人抗体文库分离的抗体。在一些实施方案中,重组抗体与从生物体(例如,小鼠或人)分离但已经通过重组DNA技术表达的抗体共享序列。此类抗体的翻译后修饰(例如,糖基化)可能与如从生物体分离的抗体不同。

[0107] 在一些实施方案中,本文公开的抗体在其恒定区糖基化中缺乏岩藻糖。本领域已经描述了测量抗体组合物中岩藻糖的方法,例如美国专利号8,409,838(Regeneron Pharmaceuticals),该专利通过引用并入本文。在一些实施方案中,岩藻糖在包含抗体分子群的组合物中是不可检测的。在一些实施方案中,缺乏岩藻糖的抗体具有增强的ADCC活性。

[0108] 在一些实施方案中,缺乏岩藻糖的抗体可以使用缺乏岩藻糖基化蛋白能力(即,岩藻糖基化蛋白质的能力降低或消除)的细胞系产生。聚糖的岩藻糖基化需要通过从头途径或补救途径合成GDP-岩藻糖,这两种途径都涉及几种酶的顺序功能,导致将岩藻糖分子添加到聚糖还原端的第一个N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)部分。负责产生GDP-岩藻糖的从头途径的两种关键酶是GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶(GMD)和GDP-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-差向异构酶,4-还原酶(FX)。在没有岩藻糖的情况下,这两种从头途径酶(GMD和FX)将甘露糖和/或葡萄糖转化为GDP-岩藻糖,然后将其转运到高尔基复合体中,其中九种岩藻糖基转移酶(FUT1-9)协同作用以将聚糖的第一个GlcNAc分子岩藻糖基化。然而,在存在岩藻糖的情况下,补救途径酶岩藻糖激酶和GDP-岩藻糖焦磷酸化酶将岩藻糖转化为GDP-岩藻糖。

[0109] 本领域已经描述了缺乏岩藻糖基化蛋白能力的细胞系。在一些实施方案中,缺乏岩藻糖基化蛋白能力的细胞系是哺乳动物细胞系(例如,CHO细胞系,诸如CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO),其在一个或多个内源性FUT1至9基因中包含突变或遗传修饰,从而导致缺乏一种或多种功能性岩藻糖基转移酶。在一些实施方案中,哺乳动物细胞系包含在内源性FUT8基因中的突变,例如FUT8基因已被破坏的FUT8敲除细胞系,从而导致细胞系中缺乏功能性 α 1,6-岩藻糖基转移酶,如美国专利号7,214,775(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd.)和美国专利7,737,725(Kyowa Hakko Kirin Co.,Ltd)中所描述的,这两个专利通过引用并入本文。在一些实施方案中,哺乳动物细胞系在内源性GMD基因中包含突变或遗传修饰,从而导致细胞系中缺乏功能性GMD,例如GMD基因已被破坏的GMD敲除细胞系,如例如美国专利7,737,725(Kyowa Hakko Kirin Co.,Ltd)中所描述的,该专利通过引用并入本文。在一些

实施方案中,哺乳动物细胞系在内源性F_x基因中包含突变或遗传修饰,从而导致缺乏功能性F_x蛋白。在一些实施方案中,哺乳动物细胞系是内源性F_x基因已被破坏的F_x敲除细胞系(参见例如美国专利7,737,725 (Kyowa Hakko Kirin Co.,Ltd),该专利通过引用并入本文)。在一些实施方案中,哺乳动物细胞系在赋予温度敏感性表型的内源F_x突变中包含突变(如例如美国专利号8,409,838 (Regeneron Pharmaceuticals)中所描述的,该专利通过引用并入本文)。在一些实施方案中,缺乏岩藻糖基化蛋白能力的哺乳动物细胞系是基于对某些凝集素(例如兵豆(Lens culinaris)凝集素)的抗性而选择的细胞系。参见例如美国专利号8,409,838 (Regeneron Pharmaceuticals),该专利通过引用并入本文。

[0110] 本文所公开的重组抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和抗原结合片段)也可以在大肠杆菌(E.coli)/T7表达系统中产生。在这个实施方案中,对本发明的抗CoV-S抗体免疫球蛋白分子(例如,如在表1中发现的)进行编码的核酸可以插入基于pET的质粒中并在大肠杆菌/T7系统中表达。例如,本发明包含用于在在细胞中包括表达T7 RNA聚合酶的宿主细胞(例如,细菌宿主细胞,如大肠杆菌,如BL21或BL21DE3)中表达抗体或其抗原结合片段或其免疫球蛋白链的方法,所述宿主细胞还包含对可操作地连接到T7启动子的免疫球蛋白链进行编码的多核苷酸。例如,在本发明的实施方案中,细菌宿主细胞(如大肠杆菌)包含对可操作地连接到lac启动子的T7 RNA聚合酶基因进行编码的多核苷酸,并且聚合酶和链的表达是通过将宿主细胞与IPTG(异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷)一起温育而诱导的。参见US4952496和US5693489或Studier和Moffatt,“使用噬菌体T7 RNA聚合酶指导克隆基因的选择性高水平表达(Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes)”,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),1986年5月5日;189(1):113-30。

[0111] 本领域具有几种已知的产生重组抗体的方法。在US4816567中公开了用于重组产生抗体的方法的一个示例。

[0112] 转化可以通过用于将多核苷酸(例如,DNA或RNA,包含mRNA)引入宿主细胞中的任何已知方法。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域众所周知的,并且包含葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、多烯介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将一种或多种多核苷酸包封在脂质体中、脂质纳米颗粒技术、生物弹射以及直接将DNA微量注射到细胞核中。另外,核酸分子可以通过病毒载体(如慢病毒或腺相关病毒)引入哺乳动物细胞中。转化细胞的方法是本领域公知的。参见例如,美国专利第4,399,216号;第4,912,040号;第4,740,461号和第4,959,455号。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段可以以核酸形式(例如,DNA或RNA,包含mRNA)引入到受试者,使得受试者的自身细胞产生抗体。本公开进一步提供对本文所描述的抗CoV-S抗体进行编码的核苷酸序列的修饰,所述修饰使得抗体表达增加、抗体稳定性增加、核酸(例如,mRNA)稳定性增加或抗体对CoV纤突蛋白的亲合力或特异性提高。

[0113] 因此,本发明包括制备抗CoV-S抗原结合蛋白诸如本发明的抗体或其抗原结合片段或其免疫球蛋白链的重组方法,包括(i)引入编码例如表1的抗原结合蛋白的轻和/或重免疫球蛋白链或CDR的一种或多种多核苷酸(例如,包括表2的任何一种或多种序列的核苷酸序列),例如,其中多核苷酸在载体中;和/或整合到宿主细胞染色体中和/或可操作地连接到启动子;(ii)在有利于多核苷酸表达的条件下培养宿主细胞(例如,CHO或毕赤酵母属

(*Pichia*)或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)),以及(iii)任选地,从宿主细胞和/或宿主细胞生长的培养基中分离抗原结合蛋白(例如抗体或片段)或链。例如,多核苷酸可以例如在使用基因编辑系统(例如,CRISPR(例如,CRISPR-Cas9)、TALEN、megaTAL、锌指或阿尔戈诺特(Argonaute))对染色体进行切割之后通过用载体(如腺相关病毒(AAV))进行的靶向插入整合到宿主细胞染色体中。靶向插入可以例如在宿主细胞基因座(白蛋白或免疫球蛋白基因组基因座)处发生。可替代地,插入可以例如使用载体(如慢病毒)位于随机基因座处。当制备包括多于一个免疫球蛋白链的抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段),例如包括两个重免疫球蛋白链和两个轻免疫球蛋白链的抗体时,如果此类链被分泌,则在单个宿主细胞中的共表达所述链会导致链例如在细胞中、在细胞表面或在细胞外缔合,以便形成抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)。所述方法包含其中表达仅重免疫球蛋白链或仅轻免疫球蛋白链(例如,本文所讨论的任何重免疫球蛋白链或轻免疫球蛋白链,包含其成熟片段和/或可变结构域)的方法。例如,在表达包含此类链的抗体或抗原结合片段时,此类链可用作中间体。例如,本发明还包含包括由包括表2中所示的核苷酸序列的多核苷酸编码的重链免疫球蛋白(或其可变结构域或包括其CDR)和由表2中所示的核苷酸序列编码的轻链免疫球蛋白(或其可变结构域或包括其CDR)的抗CoV-S抗原结合蛋白(如抗体和其抗原结合片段),其是此类产生方法以及任选地本文所示的纯化方法的产物。例如,在一些实施方案中,所述方法的产物是抗CoV-S抗原结合蛋白,其是包括含有表1中所示的氨基酸序列的HCVR和含有表1中所示的氨基酸序列的LCVR的抗体或片段,其中HCVR和LCVR序列选自表1中所列的抗体。在一些实施方案中,所述方法的产物是抗CoV-S抗原结合蛋白,其是包括含有表1中所示的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3和含有表1中所示的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗体或片段,其中六个CDR序列选自表1中所列的抗体。在一些实施方案中,所述方法的产物是抗CoV-S抗原结合蛋白,其是包括含有表1中所示的HC氨基酸序列的重链和含有表1中所示的LC氨基酸序列的轻链的抗体或片段。

[0114] 真核和原核宿主细胞(包含哺乳动物细胞)可以用作用于表达抗CoV-S抗原结合蛋白的宿主。此类宿主细胞是本领域中众所周知的,并且许多可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)获得。这些宿主细胞尤其包含中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0、SP2细胞、海拉细胞(HeLa cell)、小仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如, Hep G2)、A549细胞、3T3细胞、HEK-293细胞和许多其他细胞系。哺乳动物宿主细胞包含人、小鼠、大鼠、狗、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞。可以使用的其他细胞系是昆虫细胞系(例如,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*))、两栖动物细胞、细菌细胞、植物细胞和真菌细胞。真菌细胞包含酵母和丝状真菌细胞,所述丝状真菌细胞包含例如,毕赤酵母、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、喜海藻糖毕赤酵母(*Pichia trehalophila*)、科克拉马毕赤酵母(*Pichia koclamae*)、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、微小毕赤酵母(*Pichia minuta*) (甲醇诱导型酵母(*Ogataea minuta*))、林氏毕赤酵母(*Pichia lindneri*)、仙人掌毕赤酵母(*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母(*Pichia salictaria*)、松栎毕赤酵母(*Pichia guercuum*)、皮杰普毕赤酵母(*Pichia pijperi*)、树干毕赤酵母(*Pichia stiptis*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、毕赤酵母菌(*Pichia sp.*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母菌(*Saccharomyces sp.*)、多形汉逊酵母(*Hansenula*

polymorpha)、克鲁维酵母菌(Kluyveromyces sp.)、乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)、白色念珠菌(Candida albicans)、构巢曲霉(Aspergillus nidulans)、黑曲霉(Aspergillus niger)、米曲霉(Aspergillus oryzae)、里氏木霉(trichoderma reesei)、卢克诺文思金孢子菌(Chrysosporium lucknowense)、镰刀菌(Fusarium sp.)、禾谷镰刀菌(Fusarium gramineum)、镰孢霉(Fusarium venenatum)、小立碗藓(Physcomitrella patens)以及粗糙脉孢菌(Neurospora crassa)。本发明包含分离的宿主细胞(例如,CHO细胞),其包括抗原结合蛋白,如表1的抗原结合蛋白;或对其多肽进行编码的多核苷酸。

[0115] 术语“特异性结合”是指与抗原(诸如CoV-S蛋白(例如,SARS-CoV-2-S))具有结合亲和力的那些抗原结合蛋白(例如,mAb),所述结合亲和力表示为如例如通过在25°C或37°C进行的实时无标记生物层干涉测定(例如,Octet[®] HTX生物传感器)或通过表面等离子体共振(例如,BIACORE[™])或通过溶液-亲和力ELISA测量为至少约 10^{-8} M的 K_D 。本发明包含与CoV-S蛋白特异性结合的抗原结合蛋白。

[0116] 如本文所使用的,术语抗体或抗原结合蛋白的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”等包含任何与抗原特异性结合以形成复合物的天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白。抗原结合片段的非限制性示例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;以及(vii) 最小识别单元,其由模拟抗体的高变区(例如,分离的互补决定区(CDR)诸如CDR3肽)或受限的FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成。其他工程化分子如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如,如W008/020079或W009/138519中定义的)(例如,单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也涵盖在如本文所使用的表述“抗原结合片段”内。在本发明的实施方案中,抗原结合片段包括表1的抗体的三个或更多个CDR(例如,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;或CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)。

[0117] 在本发明的实施方案中,抗体的抗原结合片段将包括至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成,并且通常包括至少一个与一个或多个构架序列相邻或在所述构架内的CDR。在具有与V_L结构域相关联的V_H结构域的抗原结合片段中,V_H结构域和V_L结构域可以以任何合适的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体并且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体V_H或V_L结构域。

[0118] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以含有共价连接到至少一个恒定结构域的至少一个可变结构域。可在本发明抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括:(i) V_H-C_H1;(ii) V_H-C_H2;(iii) V_H-C_H3;(iv) V_H-C_H1-C_H2;(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3;(vi) V_H-C_H2-C_H3;(vii) V_H-C_L;(viii) V_L-C_H1;(ix) V_L-C_H2;(x) V_L-C_H3;(xi) V_L-C_H1-C_H2;(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3;(xiii) V_L-C_H2-C_H3;以及(xiv) V_L-C_L。在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包含上文所列的任何示例性构型)中,可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分铰链或接头区连接。铰链区可以由至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成,所述氨基酸导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,本发明的抗体的抗原结合片段可以包括上文所列出的任何可变结构域和恒定结构域构型的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体),其彼此非共价缔合和/或与一个或多个单体V_H或V_L结构域共价缔合(例如,通过一

个或多个二硫键)。

[0119] 抗原结合蛋白(例如,抗体和抗原结合片段)可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。多特异性抗原结合蛋白将在本文中进一步进行讨论。

[0120] 在具体实施方案中,本发明的抗体或抗体片段可以与部分(如配体)或治疗性部分(“免疫缀合物”) (如抗病毒药、第二抗流感抗体或可用于治疗病毒感染(例如,流感病毒感染)的任何其他治疗性部分)缀合。参见下文。

[0121] 本发明还提供了一种复合物,所述复合物包括本文讨论的与抗CoV-S抗体或片段特异性结合的CoV-S多肽或其抗原片段和/或第二抗体或抗原结合片段(例如,可检测地标记的第二抗体)复合的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)。在本发明的实施方案中,抗体或片段处于体外(例如,固定到固体基质)或处于受试者体内。在本发明的实施方案中,CoV-S处于体外(例如,固定到固体基质)或处于病毒的表面上或处于受试者体内。共价连接到不溶性基质材料(例如,玻璃或多糖(如琼脂糖或琼脂糖凝胶),例如,其珠粒或其他颗粒)的固定化抗CoV-S抗体和其抗原结合片段也是本发明的一部分;任选地,其中固定化抗体与CoV-S或其抗原片段或第二抗体或其片段复合。

[0122] “分离的”抗原结合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多肽、多核苷酸和载体至少部分不含来自产生其的细胞或细胞培养物中的其他生物分子。此类生物分子包含核酸、蛋白质、其他抗体或抗原结合片段、脂质、碳水化合物或其他物质,如细胞碎片和生长培养基。分离的抗体的抗原结合片段可以进一步至少部分地不含表达系统组分(如来自宿主细胞或其生长培养基的生物分子)。通常,术语“分离的”并不旨在是指完全不存在此类生物分子,也不是指不存在水、缓冲液或盐或指包含抗体或片段的药物调配物的组分。

[0123] 术语“表位”是指与抗原结合蛋白的特定抗原结合位点(例如,称为互补位的抗体分子的可变区)相互作用的抗原决定簇(例如,CoV-S多肽)。单一抗原可以具有多于一个表位。因此,不同的抗体可以与抗原上的不同区域结合,并且可以具有不同的生物学效应。术语“表位”还可以指B和/或T细胞对其应答的抗原上的位点。其还指抗体结合的抗原的区。表位可以定义为结构性或功能性的。功能性表位通常是结构性表位的子集,并且具有直接有助于相互作用的亲和力的那些残基。表位可以是线性或构象的(即,由非线性氨基酸构成)。在某些实施方案中,表位可以包含决定簇,所述决定簇是分子的化学活性表面基团(如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基),并且在某些实施方案中,可以具有特定的三维结构特性和/或特定的电荷特性。

[0124] 用于确定抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)的表位的方法包含丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke, (2004), 分子生物学方法(Methods Mol. Biol.), 248:443-63)、肽切割分析、晶体学研究和NMR分析。另外,可以采用如抗原的表位切除、表位提取及化学修饰等方法(Tomer, (2000), 蛋白质科学(Prot. Sci.) 9:487-496)。可以用于鉴定与抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测氢/氘交换。一般而言,氢/氘交换方法涉及对所关注蛋白质进行氘标记,然后将抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)与经氘标记的蛋白质结合。接下来,CoV-S蛋白/抗原结合蛋白复合物转移到水中,并且受抗体复合物保护的氨基酸内的可交换质子以比并非界面的一部分的氨基酸内的可交换质子慢的速率经历氢-氘反交换。因此,形成蛋白质/抗原结合蛋白界面的一部分的氨基酸可以保留氘,并且因此表现出与并未包含在界面中的氨基

酸相比相对较高的质量。在解离抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)后,靶蛋白经历蛋白酶切割和质谱法分析,由此揭示与抗原结合蛋白与之相互作用的特定氨基酸相对应的经氘标记的残基。参见例如,Ehring(1999)分析生物化学(*Analytical Biochemistry*) 267: 252-259;Engen和Smith(2001)分析化学(*Anal.Chem.*) 73:256A-265A)。

[0125] 如本文所使用的,术语“竞争物”是指与抗原(例如,CoV-S)结合并且抑制或阻断另一种抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)与抗原的结合的抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)。所述术语还包含两个方向上的两个抗原结合蛋白(例如,抗体)之间的竞争,即,结合并且阻断第二抗体结合的第一抗体,反之亦然。在某些实施方案中,第一抗原结合蛋白(例如,抗体)和第二抗原结合蛋白(例如,抗体)可以与相同的表位结合。可替代地,第一抗原结合蛋白和第二抗原结合蛋白(例如,抗体)可以与不同但例如重叠的表位结合,其中一个的结合例如通过空间位阻抑制或阻断第二抗体的结合。抗原结合蛋白(例如,抗体)之间的竞争可以通过本领域已知的方法来测量,例如,通过实时无标记生物层干涉测定。表位作图(例如,通过丙氨酸扫描或氢-氘交换(HDX))可以用于测定两个或更多个抗体是否是非竞争的(例如,纤突蛋白受体结合结构域(RBD)单体)、竞争同一表位或者竞争但是与不同的微表位竞争(例如,通过HDX鉴定的)。在本发明的实施方案中,第一抗CoV-S抗原结合蛋白与第二抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)之间的竞争是通过以下测定的:测量固定化第一抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)(最初未与CoV-S蛋白复合)与与第二抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)复合的可溶CoV-S蛋白结合的能力。第一抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)与复合的CoV-S蛋白结合的能力相对于未复合的CoV-S蛋白有所降低指示第一抗CoV-S抗原结合蛋白和第二抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)竞争。竞争程度可以表示为结合的降低的百分比。此类竞争可以使用实时无标记生物层干涉测定(例如,在Octet RED384生物传感器(颇尔富迪生物公司(Pall ForteBio Corp.)上)、ELISA(酶联免疫吸附测定)或通过SPR(表面等离子共振)进行测量。

[0126] 抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,单克隆抗体(mAb))之间的结合竞争可以在Octet RED384生物传感器(颇尔富迪生物公司)上使用实时无标记生物层干涉测定来测定。例如,为了测定两种抗CoV-S单克隆抗体之间的竞争,可以首先通过将尖端浸入抗CoV-S mAb的溶液中来将抗CoV-S mAb(后续称为“mAb1”)捕获到抗hFc抗体涂覆的Octet生物传感器尖端上(颇尔富迪生物公司,#18-5060)。作为阻断的阳性对照,然后可以用已知的阻断同种型对照mAb(后续称为“阻断mAb”)使捕获抗体的生物传感器尖端通过浸入阻断mAb的溶液中而饱和。为了测定mAb2是否与mAb1竞争,可以随后将生物传感器尖端浸入已经预温育一段时间的CoV-S多肽和第二抗CoV-S mAb(随后称为“mAb2”)的共复合溶液中,并且可以测定mAb1与CoV-S多肽的结合。在实验的每个步骤之间,可以将生物传感器尖端在缓冲液中洗涤。可以在实验过程期间监测实时结合应答,并且可以记录每个步骤结束时的结合应答。

[0127] 例如,在本发明的实施方案中,竞争测定在25°C和约7(例如,7.4)的pH下、例如在存在缓冲液、盐、表面活性剂和非特异性蛋白质(例如,牛血清白蛋白)的情况下进行。

[0128] 通常,以某种方式修饰的本发明的抗体或抗原结合片段保留与CoV-S特异性结合的能力,例如,当以摩尔为基础表达其CoV-S结合活性时,保留所述活性的至少10%(在与亲本抗体相比时)。优选地,本发明的抗体或抗原结合片段与亲本抗体相比保留CoV-S结合亲和力的至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更多。本发明的抗体或抗原结合片

段还旨在可以包含基本上不改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代(称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”)。

[0129] 多肽(如免疫球蛋白链(例如,mAb8021 V_H 、 V_L 、HC或LC、mAb8028 V_H 、 V_L 、HC或LC或mAb8029 V_H 、 V_L 、HC或LC))的“变体”是指包含与本文所示的参考氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:2、10、18、20、22、30、38、40、42、50、58或60)至少约70%-99.9%(例如,70%、72%、74%、75%、76%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%)相同或类似的氨基酸序列的多肽;当通过BLAST算法进行比较时,其中算法的参数被选择成给出在相应参考序列的整个长度内的相应序列之间的最大匹配(例如,预期阈值:10;字号:3;查询范围内的最大匹配数:0;BLOSUM 62矩阵;空位罚分:存在11,扩展1;条件组成得分矩阵调整)。

[0130] 多核苷酸的“变体”是指包含与本文所示的参考核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:1、9、17、19、21、29、37、39、41、49、57或59)至少约70%-99.9%(例如,至少约70%、72%、74%、75%、76%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%)相同的核苷酸序列的多核苷酸;当通过BLAST算法进行比较时,其中算法的参数被选择成给出在相应参考序列的整个长度内的相应序列之间的最大匹配(例如,预期阈值:10;字号:28;查询范围内的最大匹配数:0;匹配/不匹配得分:1、-2;空位罚分:线性)。

[0131] 在本发明的实施方案中,本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)包含与表1中所示的HCVR氨基酸序列具有至少70%(例如,80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)氨基酸序列同一性的重链免疫球蛋白可变区;和/或与表1中所示的LCVR氨基酸序列具有至少70%(例如,80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)氨基酸序列同一性的轻链免疫球蛋白可变区。

[0132] 另外,变体抗CoV-S抗原结合蛋白可以包含包括本文所示的氨基酸序列(除一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个)突变(例如,错义突变(例如,保守取代)、无义突变、缺失或插入)之外)的多肽。例如,本发明包含抗原结合蛋白,其包括包括表1中所示的LCVR氨基酸序列但具有此类突变中的一个或多个突变的免疫球蛋白轻链变体和/或包括表1中所示的HCVR氨基酸序列但具此类突变中的一个或多个突变的免疫球蛋白重链变体。在本发明的实施方案中,变体抗CoV-S抗原结合蛋白包含:包括CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的免疫球蛋白轻链变体,其中此类CDR中的一个或多个(例如,1个或2个或3个)具有此类突变(例如,保守取代)中的一个或多个突变;和/或包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的免疫球蛋白重链变体,其中此类CDR中的一个或多个(例如,1个或2个或3个)具有此类突变(例如,保守取代)中的一个或多个突变。取代可以位于CDR、构架或恒定区中。

[0133] 本发明进一步提供了变体抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段),其包括本文所示的与例如表1的重链和轻链CDR具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%序列同一性或类似性的一个或多个变体CDR(例如,CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3中的任何一个或多个)。

[0134] 本发明的实施方案还包含变体抗原结合蛋白(例如,抗CoV-S抗体和其抗原结合片

段),其包括免疫球蛋白V_H和V_L;或HC和LC,其包括与本文具体所示的对应的V_H、V_L、HC或LC的氨基酸序列具有70%或更高(例如80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)整体氨基酸序列同一性或类似性的氨基酸序列,但其中此类免疫球蛋白的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3不是变体并且包括表1中所所示的CDR氨基酸序列。因此,在此类实施方案中,变体抗原结合蛋白内的CDR本身不是变体。

[0135] 保守修饰变体抗CoV-S抗体和其抗原结合片段也是本发明的一部分。“保守修饰的变体”或“保守取代”是指其中多肽中的氨基酸被具有类似特性(例如,电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其他氨基酸取代一次或多次的变体。在不显著破坏抗体或片段的生物活性的情况下可以经常进行此类改变。本领域技术人员认识到,通常,多肽的非必需区中的单个氨基酸取代基本上不会改变生物活性(参见,例如,Watson等人,(1987),基因的分子生物学(Molecular Biology of the Gene),本杰明/卡明斯出版公司(Benjamin/Cummings Pub.Co.),第224页(第4版))。另外,结构或功能上类似的氨基酸的取代不太可能显著破坏生物活性。

[0136] 具有类似化学性质的侧链的氨基酸基团的示例包括1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是在Gonnet等人,(1992),科学(Science),256:1443-45中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。

[0137] 抗CoV-S抗体和其抗原结合片段的功能保守变体也是本发明的一部分。抗CoV-S抗体和其抗原结合片段(如本文所讨论的)的变体中的任何变体可以是“功能保守变体”。在一些情况下,此类功能保守变体也可以被表征为保守修饰的变体。如本文所使用的,“功能保守变体”是指其中一个或多个氨基酸残基在没有显著改变抗体或片段的一个或多个功能性质的情况下已经变化的抗CoV-S抗体或其抗原结合片段的变体。在本发明的实施方案中,本发明的功能保守变体抗CoV-S抗体或其抗原结合片段包括变体氨基酸序列,并且表现出以下功能性质中的一个或多个功能性质:

[0138] • • 抑制冠状病毒(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV和/或MERS-

[0139] CoV)在表达ACE2和/或TMPRSS2的细胞(例如,Calu-3细胞)

[0140] 中的生长;

[0141] • 不会与没有表达ACE2和/或TMPRSS2的MDCK/Tet-on细胞显著结合;

[0142] • 显示细胞(例如,Calu-3,)的冠状病毒感染(例如,通过SARS-

[0143] CoV-2、SARS-CoV和/或MERS-CoV)的体外传播;和/或

[0144] • 任选地,当与第二治疗剂组合时,保护被工程化成表达人TMPRSS2和/或ACE2蛋白的小鼠免于冠状病毒感染(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS-CoV)所引起的死亡,例如其中小鼠感染以其他方式致死的剂量的病毒。

[0145] • • 任选地,当与第二治疗剂组合时,保护被工程化成表达人TMPRSS2和/或ACE2蛋白的小鼠免于冠状病毒感染(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS-CoV)所引起的体重减轻,例如其中小鼠感染以其他方式引起体重减轻的剂量的病毒。

[0146] “中和”或“拮抗剂”抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)是指以任何可检测的程度抑制CoV-S的活性(例如,抑制CoV-S与要被蛋白酶(如TMPRSS2)切割的受体(如ACE2)结合或介导病毒进入宿主细胞中或病毒在宿主细胞中繁殖的活性)的分子。

[0147] 表1是指包括如下文所示的重链或 V_H (或其变体)和轻链或 V_L (或其变体)的抗原结合蛋白(如抗体和其抗原结合片段);或者所述抗原结合蛋白包括: V_H ,其包括其CDR(CDR-H1(或其变体)、CDR-H2(或其变体)和CDR-H3(或其变体));和 V_L ,其包括其CDR(CDR-L1(或其变体)、CDR-L2(或其变体)和CDR-L3(或其变体)),例如,其中免疫球蛋白链、可变区和/或CDR包括如下所描述的特定氨基酸序列。

[0148] 本文所描述的抗体还包含其中 V_H 与野生型IgG4(例如,其中残基108为S)或与IgG4变体(例如,其中残基108为P)融合的实施方案。

[0149] 本发明的抗体和抗原结合片段包括包含本文所示的氨基酸序列的免疫球蛋白链以及对抗体的细胞和体外翻译后修饰。例如,本发明包含与CoV-S特异性结合的抗体和其抗原结合片段,其包括本文所示的重和/或轻链氨基酸序列(例如,CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和/或CDR-L3)以及其中一个或多个氨基酸残基被糖基化、一个或多个Asn残基被脱去酰胺基、一个或多个残基(例如,Met、Trp和/或His)被氧化、N端Gln是焦谷氨酸(pyroE)和/或C端赖氨酸缺失的抗体和片段。

[0150] 示例性抗SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)抗体的氨基酸序列和核苷酸序列在下文中示出:

[0151]

| 抗体名称 | 组成部分 | 序列 | SEQ ID NO |
|----------|-------|---|-----------|
| mAb10933 | 氨基酸 | | |
| | HCVR | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSW IRQAPGKGLEWVSYITYSGSTIYYADSVKGRFTISRDN NAKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRTTMVFPD YWGQGTLVTVSS | 202 |
| | HCDR1 | GFTFSDYY | 204 |
| | HCDR2 | ITYSGSTI | 206 |
| | HCDR3 | ARDRGTTMVPFDY | 208 |
| | LCVR | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTI SGLQPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGKVEIK | 210 |
| | LCDR1 | QDITNY | 212 |
| | LCDR2 | AAS | 55 |
| | LCDR3 | QYDNLPLT | 214 |
| | HC | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSW IRQAPGKGLEWVSYITYSGSTIYYADSVKGRFTISRDN NAKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRTTMVFPD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKGV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK | 216 |
| | LC | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTI SGLQPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGKVEIKRTVA | 218 |

[0152]

| | | |
|-------|--|-----|
| | APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| | 核酸 | |
| HCVR | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTACTTATAGTGGTAGTACCATA TACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAGCTCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCGGTACAACATATGGTCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCCTCA | 201 |
| HCDR1 | GGATTCACCTTCAGTGACTACTAC | 203 |
| HCDR2 | ATTACTTATAGTGGTAGTACCATA | 205 |
| HCDR3 | GCGAGAGATCGCGGTACAACATATGGTCCCCTTTGACTAC | 207 |
| LCVR | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTACCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCTGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTACCATCAGCGGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATCTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAA | 209 |
| LCDR1 | CAGGACATTACCAACTAT | 211 |
| LCDR2 | GCTGCATCC | 54 |
| LCDR3 | CAACAGTATGATAATCTCCCTCTCACT | 213 |
| HC | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTACTTATAGTGGTAGTACCATA TACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAGCTCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCGGTACAACATATGGTCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA | 215 |

[0153]

| | | | |
|----------|-------|--|-----|
| | | CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA | |
| | LC | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC AGGCGAGTCAGGACATTACCAACTATTTAAATTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT GATCTACGCTGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCC CATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGGACAGAT TTTACTTTCAACATCAGCGGCCTGCAGCCTGAAGA TATTGCAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATC TCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG ATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTTAG | 217 |
| | 氨基酸 | | |
| mAb10934 | HCVR | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGITFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRISKTDGGTTDYAAPVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTARWDWYF DLWGRGTLVTVSS | 220 |
| | HCDR1 | GITFSNAW | 222 |
| | HCDR2 | IKSKTDGGTT | 224 |
| | HCDR3 | TTARWDWYFDL | 226 |

[0154]

| | | |
|-------|---|-----|
| LCVR | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDIWNYINWYQ QKPGKAPKLLIYDASNLKTGVPSRFSGSGSGTDFFTI SSLQPEDIATYYCQQHDDLPTFGQGTKVEIK | 228 |
| LCDR1 | QDIWNY | 230 |
| LCDR2 | DAS | 194 |
| LCDR3 | QQHDDLPT | 232 |
| HC | EVQLVESGGGLVKGSSLRSLCAASGITFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTARWDWYF DLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK | 234 |
| LC | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDIWNYINWYQ QKPGKAPKLLIYDASNLKTGVPSRFSGSGSGTDFFTI SSLQPEDIATYYCQQHDDLPTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 236 |
| 核酸 | | |
| HCVR | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGAATCACTTTCAGTAACGCCTGGATGAG TTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGGTTGGCCGTATTAAGCAAACTGATGGTGG GACAACAGACTACGCCGACCCGTGAAAGGCAGA TTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCT GTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC ACAGCCGTGTATTACTGTACCACAGCGAGGTGGGA CTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGG TCACTGTCTCCTCA | 219 |
| HCDR1 | GGAATCACTTTCAGTAACGCCTGG | 221 |
| HCDR2 | ATTAAGCAAACTGATGGTGGGACAACA | 223 |
| HCDR3 | ACCACAGCGAGGTGGGACTGGTACTTCGATCTC | 225 |
| LCVR | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC AGGCGAGTCAGGACATTTGGAATTATATAAATTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTAAGCTCCT GATCTACGATGCATCCAATTTGAAAACAGGGGTCC CATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGGACAGAT TTTACTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGA TATTGCAACATATTACTGTCAACAGCATGATGATC TCCCTCCGACCTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA | 227 |

[0155]

| | | |
|-------|--|-----|
| | ATCAAA | |
| LCDR1 | CAGGACATTTGGAATTAT | 229 |
| LCDR2 | GATGCATCC | 193 |
| LCDR3 | CAACAGCATGATGATCTCCCTCCGACC | 231 |
| HC | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGAATCACTTTCAGTAACGCCTGGATGAG TTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGGTTGGCCGTATTAAGCAAACTGATGGTGG GACAACAGACTACGCCGCACCCGTGAAAGGCAGA TTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCT GTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC ACAGCCGTGTATTACTGTACCACAGCGAGGTGGGA CTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGG TCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA | 233 |
| LC | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC AGGCGAGTCAGGACATTTGGAATTATATAAATTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTAAGCTCCT GATCTACGATGCATCCAATTTGAAAACAGGGGTCC CATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGGACAGAT | 235 |

[0156]

| | | | |
|----------|------------------------------------|--|-----|
| | | TTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGA TATTGCAACATATTACTGTCAACAGCATGATGATC TCCCTCCGACCTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTTAG | |
| | 氨基酸 | | |
| mAb10987 | HCVR | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMY WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYCASGSDYGDY LLVYWGQGLTVTVSS | 640 |
| | HCDR1 | GFTFSNYA | 642 |
| | HCDR2 | ISYDGSNK | 499 |
| | HCDR3 | ASGSDYGDYLLVY | 644 |
| | LCVR | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW YQQHPGKAPKLMYDVS KRPSGVS NRFSGSKSGNTA SLTISGLQSEDEADYYCNSLTSISTWVFGGGTKLTVL | 646 |
| | LCDR1 | SSDVGGYNY | 648 |
| | LCDR2 | DVS | 650 |
| | LCDR3 | NSLTSISTWV | 652 |
| | HC | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMY WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYCASGSDYGDY LLVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK | 654 |
| | LC | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW YQQHPGKAPKLMYDVS KRPSGVS NRFSGSKSGNTA SLTISGLQSEDEADYYCNSLTSISTWVFGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS | 656 |
| | 核酸 | | |
| HCVR | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGG | 639 | |

[0157]

| | | |
|-------|---|-----|
| | TCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGT GGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCAT CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC AAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGAGTGGCTCCGACTACGGTGACT ACTTATTGGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA | |
| HCDR1 | GGATTCACCTTCAGTAACTATGCT | 641 |
| HCDR2 | ATATCATATGATGGAAGTAATAAA | 498 |
| HCDR3 | GCGAGTGGCTCCGACTACGGTGACTACTTATTGGT TTAC | 643 |
| LCVR | CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGG GTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTG GAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTC TCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAA ACTCATGATTTATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAG GGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA ACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGTCT GAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAACTCTTTGAC AAGCATCAGCACTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACC AAGCTGACCGTCCTA | 645 |
| LCDR1 | AGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTAT | 647 |
| LCDR2 | GATGTCACT | 649 |
| LCDR3 | AACTCTTTGACAAGCATCAGCACTTGGGTG | 651 |
| HC | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGG TCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGT GGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCAT CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC AAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCTGT GTATTACTGTGCGAGTGGCTCCGACTACGGTGACT ACTTATTGGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG GCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGA | 653 |

[0158]

| | | | |
|----------|-------|--|-----|
| | | TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA | |
| | LC | CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGG GTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTG GAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTC TCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAA ACTCATGATTTATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAG GGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA ACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGTCT GAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAACTCTTTGAC AAGCATCAGCACTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACC AAGCTGACCGTCCTAGGCCAGCCCAAGGCCGCCCC CTCCGTGACCCTGTTCCCCCCTCCTCCGAGGAGCT GCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCT CCGACTTCTACCCCGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGACTCCTCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGA GACCACCACCCCTCCAAGCAGTCCAACAACAAGT ACGCCGCCTCCTCCTACCTGTCCCTGACCCCCGAG CAGTGGAAAGTCCCACCGGTCCTACTCCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCTCCACCGTGGAGAAGACCGTG GCCCCACCGAGTGCTCCTGA | 655 |
| | 氨基酸 | | |
| mAb10989 | HCVR | QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSKASGYIFTGYMH WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGANYAQKFQGRVT LTRDTSITTVYMELSRLLRFDDTAVYYCARGSRDWN QNNWFDWPWGQGLTVTVSS | 678 |
| | HCDR1 | GYIFTGYY | 680 |
| | HCDR2 | INPNSGGA | 682 |
| | HCDR3 | ARGSRDWNQNNWFDP | 684 |
| | LCVR | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYNYVSW YQHPGKAPKLMIFDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTA SLTISGLQAEDEADYYCSSFTTSSTVVFGGGTKLTVL | 686 |
| | LCDR1 | SSDVGTYNY | 688 |
| | LCDR2 | DVS | 650 |

[0159]

| | | |
|-------|--|-----|
| LCDR3 | SSFTTSSTVV | 690 |
| HC | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYMH WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGANYAQKFQGRVT LTRDTSITTVYMELSRFRFDDTAVYYCARGSRDWN QNNWFDPWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK | 692 |
| LC | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYNVSW YQQHPGKAPKLMIFDVSNRPSGVSDRFGSKSGNTA SLTISGLQAEDEADYYCSSFTTSSTVVFGGGKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS | 694 |
| 核酸 | | |
| HCVR | CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCTTCTGGATACATCTTCACCGGCTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCGC AAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCC TGACCAGGGACACGTCCATCACCACAGTCTACATG GAACTGAGCAGGCTGAGATTTGACGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGAGGATCCCGGTATGACTGG AACCAGAACAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA | 677 |
| HCDR1 | GGATACATCTTCACCGGCTACTAT | 679 |
| HCDR2 | ATCAACCCTAACAGTGGTGGCGCA | 681 |
| HCDR3 | GCGAGAGGATCCCGGTATGACTGGAACCAGAACA ACTGGTTCGACCCC | 683 |
| LCVR | CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGG GTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTG GAACCAGCAGTGACGTTGGTACTTATAACTATGTC TCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAA ACTCATGATTTTTGATGTCAGTAATCGGCCCTCAG GGGTTTCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA ACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCT GAGGACGAGGCTGATTACTGACGCTCATTAC AACCAGCAGCACTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCA AGCTGACCGTCCTA | 685 |
| LCDR1 | AGCAGTGACGTTGGTACTTATAACTAT | 687 |
| LCDR2 | GATGTCAGT | 649 |
| LCDR3 | AGCTCATTTACAACCAGCAGCACTGTGGTT | 689 |

[0160]

| | | |
|----|---|-----|
| HC | <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCTTCTGGATACATCTTCACCGGCTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCGC AAACCTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCC TGACCAGGGACACGTCCATCACCACAGTCTACATG GAACTGAGCAGGCTGAGATTTGACGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGAGGATCCCGGTATGACTGG AACCAGAACAAGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATGA</p> | 691 |
| LC | <p>CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGG GTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTG GAACCAGCAGTGACGTTGGTACTTATAACTATGTC TCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAA ACTCATGATTTTTGATGTCAGTAATCGGCCCTCAG GGGTTTCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA ACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCT GAGGACGAGGCTGATTACTGAGCTCATTTAC AACCAGCAGCACTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCA</p> | 693 |

| | |
|--------|--|
| [0161] | AGCTGACCGTCCTAGGCCAGCCCAAGGCCGCCCCC TCCGTGACCCTGTTCCCCCCTCCTCCGAGGAGCT GCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCT CCGACTTCTACCCCGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGACTCCTCCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGA GACCACCACCCCTCCAAGCAGTCCAACAACAAGT ACGCCGCTCCTCCTACCTGTCCCTGACCCCCGAG CAGTGGAAGTCCCACCGGTCTACTCCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCTCCACCGTGGAGAAGACCGTG GCCCCACCGAGTGCTCCTGA |
|--------|--|

[0162] 抗体的施用

[0163] 本发明提供了用于施用本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,表1的那些)的方法,所述方法包括将抗原结合蛋白引入受试者(例如,人)体内。例如,所述方法包括用注射器的针刺穿受试者的身体,并且将抗原结合蛋白注射到受试者的体内,例如,注射到受试者的静脉、动脉、肿瘤、肌肉组织或皮下组织。

[0164] 本发明提供了包括本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,表1的那些)的器皿(例如,塑料或玻璃小瓶,例如具有盖或色谱柱、空心孔针或注射器筒)。

[0165] 本发明还提供了包括与CoV-S特异性结合的一个或多个抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)(例如,表1的那些)或其药物组合物的注射装置。注射装置可以包装成试剂盒。注射装置是通过肠胃外途径(例如,肌内、皮下或静脉内)将物质引入受试者体内的装置。例如,注射装置可以是注射器(例如,预先填充有药物组合物,如自动注射器),所述注射器例如包含用于保持要注射的流体(例如,包括抗体或其片段或药物组合物)的圆筒或针筒、用于将皮肤和/或血管穿刺以注射液体的针头;以及用于将流体推出圆筒并通过针孔的柱塞。在本发明的实施方案中,包括来自本发明的组合的抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)或其药物组合物的注射装置是静脉内(IV)注射装置。此类装置可以在可以附接到管的套管或套管针/针中包含抗原结合蛋白或其药物组合物,所述管可以附接到用于保持通过套管或套管针/针引入受试者体内的流体(例如,生理盐水)的袋或储器。在本发明的实施方案中,一旦套管针和套管插入受试者的静脉中,就可以将抗体或片段或其药物组合物引入装置中并将套管针从插入的套管去除。IV装置可以例如插入到外周静脉(例如,在手或臂中)、上腔静脉或下腔静脉中或心脏的右心房(例如,中央IV)内,或插入到锁骨下静脉、颈内静脉或股静脉中,并例如朝向心脏推进直到它到达上腔静脉或右心房(例如,中央静脉线)。在本发明的实施方案中,注射装置是自动注射器、喷射注射器或外部输注泵。喷射注射器使用穿透表皮以将抗体或片段或其药物组合物引入受试者体内的高压窄射流。外部输注泵是以控制量将抗体或片段或其药物组合物递送到受试者体内的医疗装置。外部输注泵可以电力地或机械地供以动力。不同的泵以不同的方式进行操作,例如,注射泵将流体保持在注射器的储器中,并且可移动活塞控制流体递送;弹性泵将流体保持在可伸缩球囊储器中,并且来自球囊的弹性壁的压力驱动流体递送。在蠕动泵中,一组辊向下压紧在一段柔性管上,从而推动流体前进。在多通道泵中,流体可以以多种速率从多个储器递送。

[0166] 人抗体的制备

[0167] 用于在转基因小鼠中产生人抗体的方法是本领域已知的。在本发明的上下文中可以使用任何这样的已知方法来制备特异性结合CoV-S的人抗体。包含以下任一种的免疫原

可用于产生抗CoV-S的抗体。在本发明的某些实施方案中,本发明的抗体获自用全长天然CoV-S、或用减毒或灭活的活病毒、或用编码蛋白质或其片段的DNA免疫的小鼠。可替代地,可以使用标准的生物化学技术产生CoV-S蛋白或其片段,并且对其进行修饰并且用作免疫原。在本发明的一个实施方案中,免疫原是重组产生的CoV-S蛋白或其片段。在本发明的某些实施方案中,免疫原可以是CoV-S多肽疫苗。在某些实施方案中,可以施用一种或多种加强注射。在某些实施方案中,免疫原可以是在大肠杆菌或在任何其他真核或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)中表达的重组CoV-S多肽。

[0168] 使用 VELOCIMMUNE[®] 技术(参见例如,US 6,596,541,再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals), VELOCIMMUNE[®]) 或用于产生单克隆抗体的任何其他已知方法,可以初步分离具有人可变区和小鼠恒定区的针对CoV-S的高亲和力嵌合抗体。VELOCIMMUNE[®] 技术涉及具有基因组的转基因小鼠的产生,所述基因组包括可操作地连接到内源性小鼠恒定区基因座的人重链可变区和人轻链可变区,使得小鼠响应于抗原性刺激而产生包括人可变区和小鼠恒定区的抗体。对抗体的重链可变区和轻链可变区进行编码的DNA被分离,并且可操作连接到对人重链恒定区和人轻链恒定区进行编码的DNA。然后DNA在能够表达完全人抗体的细胞中表达。

[0169] 通常,用所关注抗原挑战 VELOCIMMUNE[®] 小鼠,并且从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞(如B细胞)。可以将淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合以制备永生的杂交瘤细胞系,并且对此类杂交瘤细胞系进行筛选和选择以鉴定产生对所关注抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。对重链可变区和轻链可变区的进行编码DNA可以被分离并且连接到重链和轻链的期望同种型恒定区。此类抗体蛋白可以在如CHO细胞等细胞中产生。可替代地,对抗原特异性嵌合抗体或轻链可变结构域和重链可变结构域的进行编码DNA可以直接从抗原特异性淋巴细胞分离。

[0170] 最初,分离具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。如在下文的实验部分中,表征并选择抗体以获得期望特性,包含亲和力、选择性、表位等。将小鼠恒定区替换为期望的人恒定区以产生本发明的完全人抗体,例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4。虽然所选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特性存在于可变区中。

[0171] 包括Fc变体的抗冠状病毒纤突蛋白抗体

[0172] 根据本发明的某些实施方案,提供了包括Fc结构域的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段),所述Fc结构域包括增强或减少抗体与FcRn受体例如在酸性pH下(如与中性pH相比)的结合的一个或多个突变。例如,本发明包含在Fc结构域的C_H2区或C_H3区中包括突变的抗CoV-S抗体,其中一个或多个突变增加Fc结构域在酸性环境中(例如,在pH范围为约5.5到约6.0的核内体中)对FcRn的亲和力。当施用于动物时,此类突变可以导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性示例包括例如在位置250处的修饰(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,S或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T);或在位置428和/或433(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如,A、W、H、F或Y[N434A、N434W、N434H、N434F或N434Y])处的修饰;或在位置250和/或428处的修饰;或在位置307或308(例如,308F、V308F)和434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如,M428L)和

434S (例如, N434S) 修饰; 428L、259I (例如, V259I) 和308F (例如, V308F) 修饰; 433K (例如, H433K) 和434 (例如, 434Y) 修饰; 252、254和256 (例如, 252Y、254T和256E) 修饰; 250Q和428L 修饰 (例如, T250Q和M428L); 以及307和/或308修饰 (例如, 308F或308P)。在又一个实施方案中, 修饰包括265A (例如, D265A) 和/或297A (例如, N297A) 修饰。

[0173] 例如, 本发明包括包含Fc结构域的抗CoV-S抗原结合蛋白, 例如抗体或抗原结合片段, 该Fc结构域包含一对或多对突变组, 该一对或多对突变组选自由以下项组成的组: 250Q和248L (例如, T250Q和M248L); 252Y、254T和256E (如, M252Y、S254T和T256E); 428L和434S (例如, M428L和N434S); 257I和311I (例如, P257I和Q311I); 257I和434H (例如, P257I和N434H); 376V和434H (例如, D376V和N434H); 307A、380A和434A (例如, T307A、E380A和N434A); 以及433K和434F (例如, H433K和N434F)。

[0174] 设想了包括本文所示的包括前述Fc结构域突变的任何可能的组合的 V_H 和/或 V_L 的抗CoV-S抗原结合蛋白 (例如, 抗体和其抗原结合片段) 在本发明的范围内。

[0175] 本发明还包含抗CoV-S抗原结合蛋白、抗体或抗原结合片段, 其包括本文所示的 V_H 和嵌合重链恒定 (C_H) 区, 其中所述嵌合 C_H 区包括衍生自多于一种的免疫球蛋白同种型的 C_H 区的区段。例如, 本发明的抗体可以包括嵌合 C_H 区, 其包括衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4分子、与衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4分子的 C_H 3结构域的一部分或全部组合的 C_H 2结构域的一部分或全部。根据某些实施方案, 本发明的抗体包括具有嵌合铰链区的嵌合 C_H 区。例如, 嵌合铰链可以包括衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”氨基酸序列 (根据EU编号来自第216位到第227位的氨基酸残基), 其与衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列 (根据EU编号来自第228位到第236位的氨基酸残基) 组合。根据某些实施方案, 嵌合铰链区包括衍生自人IgG1或人IgG4上铰链的氨基酸残基和衍生自人IgG2下铰链的氨基酸残基。在某些实施方案中, 包括本文所述的嵌合 C_H 区的抗体可以表现出不会不利地影响抗体的治疗或药代动力学性质的经过修饰的Fc效应子功能。(参见例如, W02014/022540)。

[0176] 免疫缀合物

[0177] 本发明涵盖与另一个部分 (例如, 治疗性部分 (免疫缀合物), 如类毒素或治疗流感病毒感染的抗病毒药) 缀合的抗CoV-S抗原结合蛋白 (例如, 抗体或抗原结合片段)。在本发明的实施方案中, 将抗CoV-S抗体或片段与本文所示的任何另外的治疗剂缀合。如本文所使用的, 术语“免疫缀合物”是指与放射性药剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告基因部分、酶、肽或蛋白质或治疗剂化学或生物连接的抗原结合蛋白 (例如, 抗体或抗原结合片段)。抗原结合蛋白可以沿分子能够结合其靶标 (CoV-S) 的长度在任何位置处连接到放射性药剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告基因部分、酶、肽或蛋白质或治疗剂。免疫缀合物的示例包含抗体-药物缀合物和抗体-毒素融合蛋白。在本发明的一个实施方案中, 药剂可以是特异性结合CoV-S的第二种不同的抗体。可以与抗-CoV-S抗原结合蛋白 (例如, 抗体或片段) 缀合的治疗性部分的类型将考虑待治疗的病症和待实现的期望的治疗效果。参见例如Arnon等人, “用于癌症治疗中的药物免疫靶向的单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)”, 单克隆抗体与癌症治疗 (Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy), Reisfeld等人 (编辑), 第243-56页 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom等人, “用于药物递送的抗体 (Antibodies For Drug Delivery)”, 受

控药物递送 (Controlled Drug Delivery) (第2版), Robinson等人 (编辑), 第623-53页 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “癌症治疗中的细胞毒性剂的抗体载体: 综述 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)”, 单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies) 1984: 生物学与临床应用 (Biological And Clinical Applications), Pinchera等人 (编辑), 第475-506页 (1985); “放射性标记的抗体在癌症治疗中的应用分析、结果和未来展望 (Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)”, 用于癌症检测和治疗的单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy), Baldwin等人 (编辑), 第303-16页 (Academic Press 1985); 以及 Thorpe等人, “抗体-毒素缀合物的制备和细胞毒性特性 (The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates)”, 免疫学评论 (Immunol. Rev.), 62:119-58 (1982)。

[0178] 多特异性抗体

[0179] 本发明包含抗CoV-S抗原结合蛋白 (例如, 抗体和其抗原结合片段) 以及其使用方法和制备此类抗原结合蛋白的方法。术语“抗CoV-S”抗原结合蛋白 (例如, 抗体或抗原结合片段) 包含多特异性 (例如, 双特异性或双互补位) 分子, 所述多特异性分子包含与CoV-S特异性结合的至少一个第一抗原结合结构域 (例如, 来自表1的抗体的抗原结合结构域) 和与不同的抗原或与CoV-S中的与第一抗原结合结构域的表位不同的表位结合的至少一个第二抗原结合结构域。在一些实施方案中, 第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域两者选自表1的抗原结合结构域。在本发明的实施方案中, 第一表位和第二表位重叠。在本发明的另一个实施方案中, 第一表位和第二表位不重叠。例如, 在本发明的一个实施方案中, 多特异性抗体是双特异性IgG抗体 (例如, IgG1或IgG4), 其包含特异性结合CoV-S的包含表1的抗体的重和轻免疫球蛋白链的第一抗原结合结构域和特异性结合CoV-S的不同表位的第二抗原结合结构域。在一些实施方案中, 双特异性IgG抗体 (例如, IgG1或IgG4) 包含特异性结合CoV-S的第一抗原结合结构域和结合宿主细胞蛋白 (例如, ACE2或TMPRSS2) 的第二结合结构域。

[0180] 表1的抗体包含多特异性分子 (例如, 抗体或抗原结合片段), 所述多特异性分子分别包含那些抗体的CDR-H和CDR-L、 V_H 和 V_L 或HC和LC (包含本文所示的其变体)。

[0181] 在本发明的实施方案中, 与CoV-S特异性结合的抗原结合结构域可以包含在多特异性分子中, 所述抗原结合结构域包括:

[0182] (1)

[0183] (i) 重链可变域序列, 其包括表1中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3氨基酸序列, 以及

[0184] (ii) 轻链可变结构域序列, 其包括表1中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列;

[0185] 或者

[0186] (2)

[0187] (i) 重链可变结构域序列, 其包括表1中所示的氨基酸序列, 以及

[0188] (ii) 轻链可变结构域序列, 其包括表1中所示的氨基酸序列;

[0189] 或者

[0190] (3)

[0191] (i) 重链免疫球蛋白序列,其包括表1中所示的氨基酸序列,以及

[0192] (ii) 轻链免疫球蛋白序列,其包括表1中所示的氨基酸序列。

[0193] 在本发明的实施方案中,多特异性抗体或片段包含多于两种不同的结合特异性(例如,三特异性分子),例如,与第一和/或第二抗原结合结构域相同或不同的一个或多个另外的抗原结合结构域。

[0194] 在本发明的一个实施方案中,双特异性抗原结合片段包括对第一表位(例如,CoV-S)具有结合特异性的第一scFv(例如,包括表1的 V_H 和 V_L 序列)和对第二不同表位具有结合特异性的第二scFv。例如,在本发明的实施方案中,第一和第二scFv与接头(例如肽接头(例如,GS接头,如(GGGGS)_n(SEQ ID NO:834)))拴系在一起,其中n为例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。其他双特异性抗原结合片段包含双特异性IgG抗体的F(ab)₂,其包括表1和与不同表位结合的另一个抗体的重和轻链CDR。

[0195] 治疗方法

[0196] 本发明提供用于通过向需要此类治疗或预防的受试者(例如,人)施用治疗有效量的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)来治疗或预防病毒感染(例如,冠状病毒感染)的方法。

[0197] 受试者体内的冠状病毒感染可以通过向受试者施用本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白来治疗或预防。

[0198] 有效或治疗有效剂量的(例如,表1的)用于治疗或预防病毒感染的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)指的是足以减轻所治疗受试者的感染的一种或多种体征和/或症状的抗体或片段的量,无论所述减轻是通过诱导此类体征和/或症状的消退或消除完成的还是通过抑制此类体征和/或症状的进展完成的。剂量可以根据待施用的受试者的年龄和体型、目标疾病、病状、施用途径等而变化。在本发明的实施方案中,用于治疗或预防病毒感染(例如,在成人受试者中)的本发明的抗体或其抗原结合片段的有效或治疗有效剂量为约0.01到约200mg/kg,例如多达约150mg/kg。在本发明的实施方案中,剂量多达约10.8或11克(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11克)。根据感染的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。在某些实施方案中,本发明的抗原结合蛋白可以以初始剂量和随后的一个或多个二次剂量来施用。在某些实施方案中,初始剂量之后可以施用第二或多个后续剂量的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段的量可以与初始剂量的量大致相同或小于初始剂量的量,其中后续剂量间隔至少1天至3天;至少一周、至少2周;至少3周;至少4周;至少5周;至少6周;至少7周;至少8周;至少9周;至少10周;至少12周;或至少14周。

[0199] 如本文所使用的,术语“受试者”是指需要预防和/或治疗疾病或病症(如病毒感染或癌症)的哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、猫、狗、牛、猪、绵羊、马、山羊、兔子),优选地例如人。受试者可以患有病毒感染(例如,流感感染)或易患上感染。易患上感染的受试者或感染上感染(例如,冠状病毒或流感病毒感染)的风险较高的受试者包含由于自身免疫性疾病导致的免疫系统受损的受试者、接受免疫抑制疗法(例如,器官移植后)的受试者、患有免疫缺陷综合征(HIV)或获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的受试者、患有会耗尽或破坏白细胞的贫血形式的受试者、接受放射或化学疗法的受试者或患有炎性病症的受试者。另外地,年龄非常年轻(例如,5岁或更小)或年龄较大(例如,65岁或更大)的受试者处于较高风险中。

此外,受试者由于接近疾病的爆发(例如,受试者居住在人口密集城市中或接近已经确诊或疑似患有病毒感染的受试者)或职业选择(例如,医院工作者、药物研究者、到过感染区域的旅行者或经常乘飞机者)而处于感染上病毒感染的风险中。

[0200] “治疗(treat)”或“治疗(treating)”意指向具有疾病或感染(例如,病毒感染)的一种或多种体征或症状的受试者施用本发明(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段),对于所述疾病或感染而言,所述抗原结合蛋白在以有效或治疗有效量或剂量(如本文所讨论的)施用于受试者时是有效的。

[0201] 本发明还涵盖向处于病毒感染风险中的受试者预防性地施用本发明(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)以便预防此类感染。已经证明基于被动抗体的免疫预防法是预防受试者患上病毒感染的有效策略。参见例如,Berry等人,被动广谱流感免疫预防(Passive broad-spectrum influenza immunoprophylaxis)。流感研究和治疗(*Influenza Res Treat.*)2014;2014:267594。电子版发布于2014年9月22日;以及 Jianqiang等人,预防和控制甲型流感感染的被动免疫中和策略(Passive immune neutralization strategies for prevention and control of influenza A infections),免疫疗法(Immunotherapy)2012年2月;4(2):175-186;Prabhu等人,抗病毒素疗法(Antivir Ther.)2009;14(7):911-21,对H5血凝素具有特异性的嵌合单克隆抗体对致命的H5N1型流感的预防和治疗功效(Prophylactic and therapeutic efficacy of a chimeric monoclonal antibody specific for H5 hemagglutinin against lethal H5N1 influenza)。“预防(prevent)”或“预防(preventing)”意指向受试者施用本发明(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)以抑制疾病或感染(例如,病毒感染)在受试者体内的表现,对于所述疾病或感染,所述抗原结合蛋白在以有效或治疗有效量或剂量(如本文所讨论的)施用于受试者时是有效的。

[0202] 在本发明的实施方案中,受试者的病毒感染的体征或症状是例如通过病毒滴度测定(例如,将冠状病毒在鸡胚中繁殖或冠状病毒纤突蛋白测定)测定的病毒在受试者体内的存活或增殖。病毒感染的其他体征和症状在本文中进行了讨论。

[0203] 如上所述,在一些实施方案中,受试者可以是非人动物,并且本文所讨论的抗原结合蛋白(例如,抗体和抗原结合片段)可以在治疗和/或预防非人动物(例如,猫、狗、猪、牛、马、山羊、兔子、绵羊等)的疾病的兽医情景中使用。

[0204] 本发明提供了用于治疗或预防病毒感染(例如,冠状病毒感染)或用于诱导病毒感染的至少一种体征或症状的消退或消除或抑制所述至少一种体征或症状的进展的方法,如:

- [0205] • 发烧或感到发热/发冷;
- [0206] • 咳嗽;
- [0207] • 咽喉痛;
- [0208] • 流鼻涕或鼻塞;
- [0209] • 打喷嚏;
- [0210] • 肌肉或身体疼痛;
- [0211] • 头痛;
- [0212] • 疲劳(疲倦);

- [0213] • 呕吐;
- [0214] • 腹泻;
- [0215] • 呼吸道感染;
- [0216] • 胸闷;
- [0217] • 呼吸短促;
- [0218] • 支气管炎;和/或
- [0219] ● 肺炎,

[0220] (对于病毒感染而言次要的体征或症状),对有需要的受试者(例如,人)进行的所述治疗或预防或所述诱导或抑制是通过向所述受试者施用治疗有效量的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,通过将蛋白质注射到受试者体内)进行的。

[0221] 组合和药物组合物

[0222] 为了制备(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)的药物组合物,将抗原结合蛋白与药学上可接受的载体或赋形剂混合。参见例如雷明顿制药科学和美国药典:国家处方集(Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S.Pharmacopeia:National Formulary),Mack Publishing Company,Easton,Pa.(1984);Hardman等人(2001)古德曼·吉尔曼治疗学药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics),McGraw-Hill,New York,N.Y.;Gennaro(2000)雷明顿:药学的科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),Lippincott,Williams,and Wilkins,New York,N.Y.;Avis等人(编辑)(1993)药物剂型:肠胃外药物(Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications),Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编辑)(1990)药物剂型:片剂(Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets),Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编辑)(1990)药物剂型:分散系统(Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems),Marcel Dekker,NY;Weiner and Kotkoskie(2000)辅料毒性和安全性(Excipient Toxicity and Safety),Marcel Dekker, Inc.,New York,N.Y.在本发明的一个实施方案中,药物组合物是无菌的。此类组合物是本发明的一部分。

[0223] 本发明的范围包含干燥的(例如,冻干的)组合物,所述组合物包括(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)或包含药学上可接受的载体但基本上缺乏水的其药物组合物。

[0224] 在本发明的另外的实施方案中,与本文所公开的(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)组合施用于受试者的另外的治疗剂是根据医师案头参考(Physicians'Desk Reference)2003(汤姆森医疗保健(Thomson Healthcare);第57版(2002年11月1日))向受试者施用的。

[0225] 施用模式可以变化。施用途径包含口服、直肠、透粘膜、肠、肠胃外;肌肉、皮下、真皮内、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、眼内、吸入、吹入、局部、皮肤、透皮或动脉内。

[0226] 本发明提供了用于施用(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)的方法,所述方法包括将蛋白质引入受试者体内。例如,所述方法包括用注射器的针刺穿受试者的身体,并且将抗原结合蛋白注射到受试者的体内,例如,注射到受试者的

静脉、动脉、肿瘤、肌肉组织或皮下组织。

[0227] 本发明提供了一种器皿(例如,塑料或玻璃小瓶,例如具有盖或色谱柱、空心孔针或注射器筒),所述器皿包括以下中的任何一个:(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)、多肽(例如,表1的HC、LC、V_H或V_L)或(例如,表2的)多核苷酸或本文所示的载体或包括药学上可接受的载体的其药物组合物。

[0228] 在本公开的实施方案中,本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)与一个或多个另外的治疗剂组合施用。另外的治疗剂包含但不限于:抗炎剂;抗疟疾剂;特异性结合TMPRSS2的第二抗体或其抗原结合片段;和与CoV-S特异性结合的第二抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,抗疟疾剂是氯喹或羟氯喹。在一些实施方案中,所述抗炎剂是抗体,如萨瑞鲁单抗、托珠单抗或吉西鲁单抗。在一些实施方案中,另外的治疗剂是本文所公开的(例如,表1的)第二抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,表1的一种、两种、三种、四种或更多种抗体或其抗原结合片段可以组合(例如,同时或顺序地)施用。在某些实施方案中,两种、三种、四种或更多种抗体结合纤突蛋白的非重叠或部分重叠的表位,例如在纤突蛋白的受体结合结构域中。本领域已知用于确定两种或更多种抗体是否具有非重叠或部分重叠的表位的多种方法,例如交叉竞争测定。表1的抗体的具体组合在下文中列出(每个编号表示特定组合,例如mAb10989和mAb10987是组合1,mAb10989和mAb10934是组合2,以此类推)。在一些实施方案中,抗体的组合可以选自与不同的表位簇结合的那些抗体。例如,本文所描述的某些抗体属于如下的表位簇:簇1,mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;簇2,mAb10989、mAb10977和mAb10933;簇3,mAb10920;簇4,mAb10954、mAb10986和mAb10964;和簇5,mAb10984。因此,两个抗体的组合可以选自例如簇1和簇2、簇1和簇3、簇1和簇4、簇1和簇5、簇2和簇3、簇2和簇4、簇2和簇5、簇3和簇4、簇3和簇5以及簇4和簇5。在某些实施方案中,三种抗体可以组合施用(例如,同时地或顺序地)。例如,此类组合可以选自由mAb10987和mAb10933加上以下抗体中的任一种组成的组:mAb10913、mAb10915、mAb10916、mAb10917、mAb10918、mAb10920、mAb10921、mAb10922、mAb10923、mAb10924、mAb10925、mAb10926、mAb10927、mAb10928、mAb10929、mAb10930、mAb10931、mAb10932、mAb10934、mAb10935、mAb10936、mAb10937、mAb10940、mAb10938、mAb10939、mAb10941、mAb10942、mAb10943、mAb10944、mAb10945、mAb10946、mAb10947、mAb10948、mAb10949、mAb10951、mAb10950、mAb10954、mAb10955、mAb10956、mAb10957、mAb10958、mAb10959、mAb10960、mAb10961、mAb10964、mAb10965、mAb10966、mAb10967、mAb10969、mAb10970、mAb10971、mAb10973、mAb10974、mAb10975、mAb10976、mAb10977、mAb10978、mAb10979、mAb10980、mAb10981、mAb10982、mAb10983、mAb10984、mAb10985、mAb10986、mAb10988、mAb10989、mAb10990、mAb10991、mAb10992、mAb10993、mAb10994、mAb10995、mAb10996、mAb10997、mAb10998、mAb10999、mAb11000、mAb11001、mAb11002、mAb11003、mAb10914、mAb11004、mAb11005、mAb11006、mAb11007、mAb11008、mAb11009、mAb11010和mAb11011。在一些实施方案中,该组合是mAb10933、mAb10987和mAb10985。没有观察到mAb10933、mAb10987和mAb10985彼此交叉竞争。在一些实施方案中,特异性结合TMPRSS2的抗体是H1H7017N,如国际专利公开号WO/2019/147831中所描述的。

[0229]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| mAb10989 | X | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 0 | 2 | 6 | 4 | 4 | 4 | 7 | 8 | 9 | 7 | 4 | 4 | 6 | 4 | 4 | 6 | 4 | 4 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 6 | |
| mAb10987 | 12 | X | 13 | 14 | 14 | 15 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 20 | 21 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| mAb10934 | 23 | 24 | X | 25 | 25 | 26 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 31 | 32 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 |
| mAb10933 | 34 | 35 | 36 | X | 37 | 37 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 42 | 43 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 |
| mAb10920 | 45 | 46 | 47 | 48 | 48 | X | X | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 53 | 54 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 |
| mAb10922 | 56 | 57 | 58 | 59 | 59 | 60 | 60 | X | 61 | 62 | 63 | 64 | 64 | 65 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 |
| mAb10936 | 67 | 68 | 69 | 70 | 70 | 71 | 71 | 72 | X | 73 | 74 | 75 | 75 | 76 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 | 77 |
| mAb10954 | 78 | 79 | 80 | 81 | 81 | 82 | 82 | 83 | 84 | X | 85 | 86 | 86 | 87 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 |
| mAb10964 | 89 | 90 | 91 | 92 | 92 | 93 | 93 | 94 | 95 | 96 | X | 97 | 97 | 98 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 |
| mAb10977 | 100 | 101 | 102 | 103 | 103 | 104 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | X | X | 109 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 | 110 |
| mAb10984 | 111 | 112 | 113 | 114 | 114 | 115 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 120 | X | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 | 121 |
| mAb10986 | 122 | 123 | 124 | 125 | 125 | 126 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 131 | 132 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

[0230] 由于RNA病毒可以随着时间的推移积累突变,因此对任何直接抗病毒治疗剂的重要问题是选择治疗诱导的逃逸突变体的潜力。防止抗体治疗剂逃逸的策略包括选择保守结

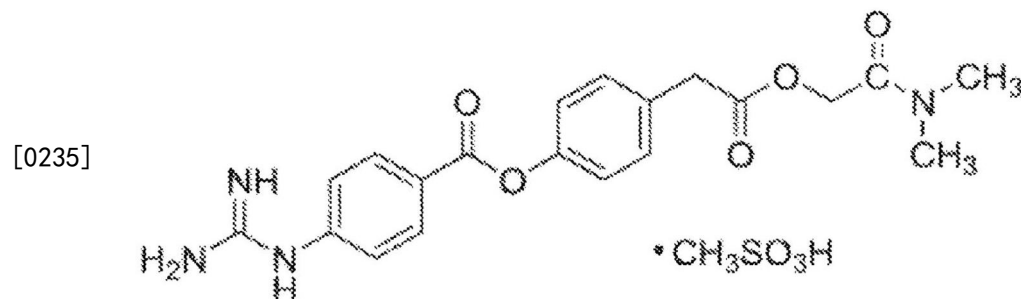
合表位或包含具有非重叠表位的多种抗体。然而,逃逸突变体的出现及其位置是不可预测的。例如,突变不需要发生在抗体结合位点就可以成为逃逸突变体。虽然可以基于序列和结构分析对表位保护进行一些明智的分析,但在强大的选择压力下仍然存在逃逸的可能性。此外,仅选择非重叠表位用于抗体组合治疗可能不足以防止逃逸。相反,技术人员将理解,当抗体结合表位时,抗体的组合将更有效,其中单个突变将不可能破坏两种抗体的结合。由于逃逸突变可能发生在表位区域之外,并且单个突变有可能破坏一种或两种抗体的结合,因此应当测试抗体组合防止逃逸的能力,而不是仅选择与非重叠表位结合的抗体。这进一步强调了结合两个非重叠表位的抗体是否会阻止逃逸,或者甚至抗体是否需要结合非重叠表位以防止逃逸的不可预测性。

[0231] 实际上,用抗流感HA茎结合抗体进行的逃逸研究表明,尽管不同流感亚型之间的茎表位高度保守,但仍可能出现逃逸突变体,其中一些逃逸突变出现在抗体表位区域之外。此外,对在多种冠状病毒中表现出广泛中和作用并因此可能靶向更保守残基的抗体的评估表明,这些抗体的中和效力比特异性针对本文所述的SARS-CoV-2的有效中和抗体的中和效力低几个数量级。中和效力被认为是抗SARS-CoV-2纤突抗体作用的关键机制,并且可以证明是临床疗效的重要驱动因素。包括针对天然循环序列变体的功能评估和包含具有非重叠表位的多种抗体的广泛效力的临床候选选择标准可以提供针对效力丧失的增强的保护。因此,在本公开的一些实施方案中,如本文所讨论的可以递送最佳的抗病毒效力同时最大限度地减少病毒逃逸的几率的有效中和非竞争性抗SARS-CoV-2纤突糖蛋白抗体的组合代表用于治疗 and 预防COVID-19的基于抗体混合物的治疗剂。具体地,对抗多种非竞争性抗体(例如,mAb10987和mAb10933)的逃逸需要同时选择两个不同的氨基酸突变,这允许病毒保持复制适应性,这比选择单个突变的可能性要小得多。

[0232] 在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是抗病毒药和/或疫苗。如本文所使用的,术语“抗病毒药”是指用于治疗、预防或减轻受试者的病毒感染的任何抗感染药。术语“抗病毒药”包含但不限于阳离子类固醇抗菌剂、亮抑酶肽、抑肽酶、利巴韦林(ribavirin)或干扰素- α 2b。用于通过与作为本发明的一部分的另外的治疗剂组合施用表1的抗体或抗原结合片段来治疗或预防需要所述治疗或预防的受试者的病毒(例如,冠状病毒)感染的方法。

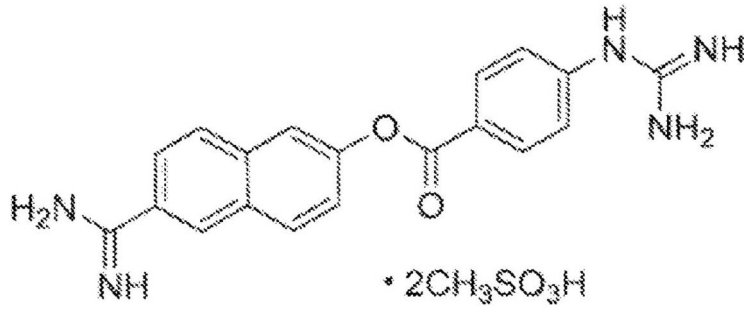
[0233] 例如,在本发明的实施方案中,所述另外的治疗剂是疫苗,例如冠状病毒疫苗。在本发明的实施方案中,疫苗是灭活/杀伤病毒疫苗、减毒活病毒疫苗或病毒亚基疫苗。

[0234] 例如,在本发明的实施方案中,所述另外的治疗剂是:



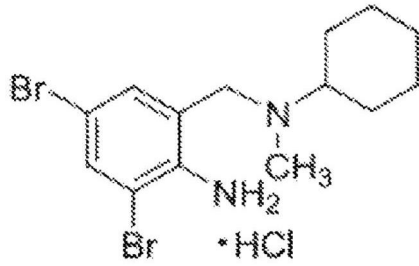
[0236] (卡莫他特甲磺酸盐);

[0237]



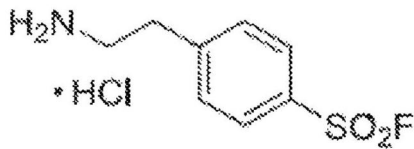
[0238] (萘莫司他甲磺酸盐) ;

[0239]

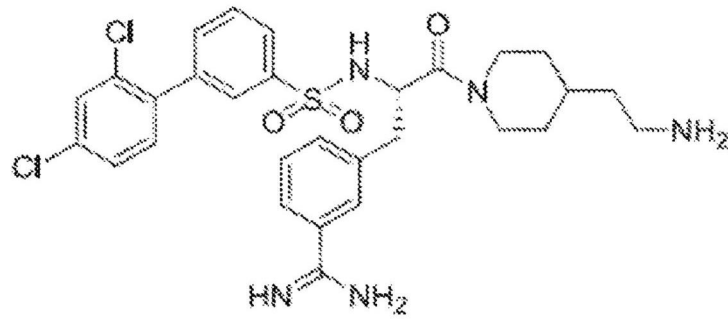


[0240] (盐酸溴己新(BHH)) ;

[0241]

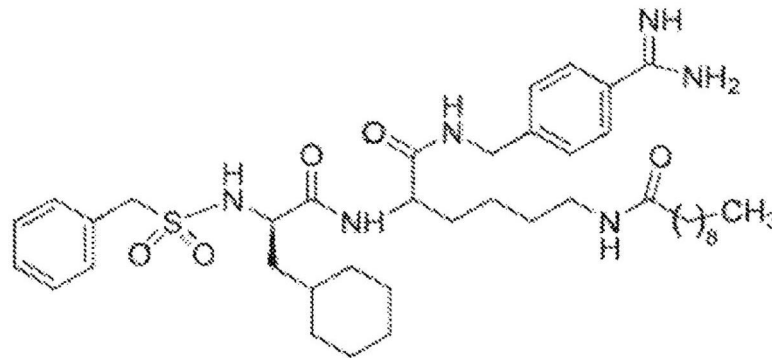


[0242] (4-(2-氨基甲基)苯磺酰氟盐酸盐(AESBF)) ;

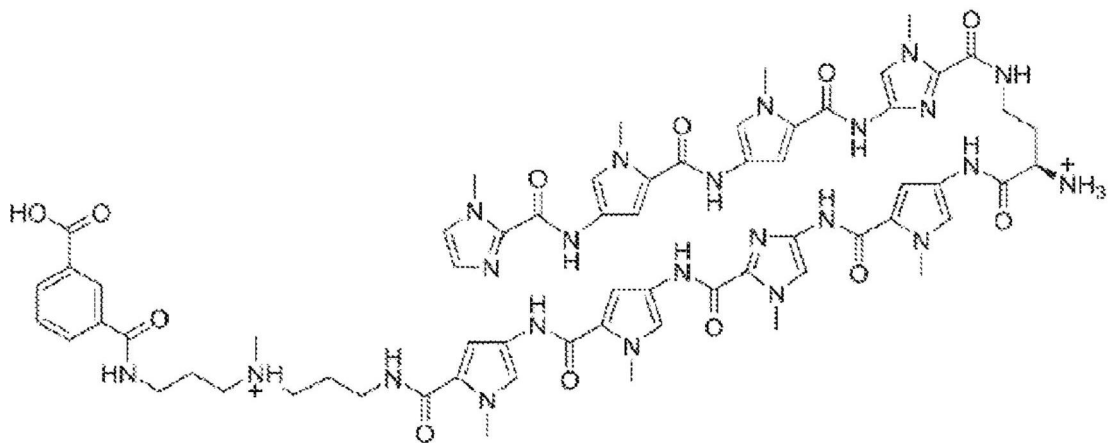


;

[0243]



; 或



[0244] (聚酰胺)。参见Shen等人,生物化学(Biochimie)142:1-10(2017)。

[0245] 在本发明的实施方案中,所述抗病毒药是与冠状病毒(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS-CoV)特异性结合的抗体或抗原结合片段。示例性抗CoV-S抗体包括但不限于:H4sH15188P;H1H15188P;H1H15211P;H1H15177P;H4sH15211P;H1H15260P2;H1H15259P2;H1H15203P;H4sH15260P2;H4sH15231P2;H1H15237P2;H1H15208P;H1H15228P2;H1H15233P2;H1H15264P2;H1H15231P2;H1H15253P2;H1H15215P;以及H1H15249P2,如国际专利申请公布号W0/2015/179535中所述,或其抗原结合片段,例如,其中抗体或片段包含包括CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,其 V_L 或轻链);以及包括前述抗CoV-S抗体中任一种的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3(例如,其 V_H 或重链)的重链。

[0246] 在本发明的某些实施方案中,所述另外的治疗剂不是抑肽素、亮抑酶肽、阳离子类固醇抗菌剂、流感疫苗(例如,杀伤、活、减毒全病毒或亚基疫苗)或针对流感病毒的抗体(例如,抗血凝素抗体)。

[0247] 术语“与…组合”指示可以将本发明的组分、抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)与另一种试剂一起调配成单个组合物例如以进行同时递送,或单独地调配成两种或更多种组合物(例如,试剂盒)。每种组分可以在与施用另一种组分时不同的时间施用于受试者;例如,每次施用可以在给定的时间段内以一定的间隔非同时(例如,分开地或顺序地)给予。此外,单独的组分可以通过相同途径或通过不同途径施用于受试者(例如,其中抗CoV-S抗体或其抗原结合片段)。

[0248] 试剂盒

[0249] 另外提供了包括与包含但不限于如本文所讨论的另外的治疗剂的一个或多个另外的组分组合的包含但不限于如本文所讨论的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)的一个或多个组分的试剂盒。抗原结合蛋白和/或另外的治疗剂可以被调配为单个组合物或以两个或更多个组合物(例如,与药学上可接受的载体)单独地调配在药物组合物中。

[0250] 在本发明的一个实施方案中,所述试剂盒在一个容器(例如,无菌玻璃或塑料小瓶)中包含本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)或其药物组合物并且在另一个容器(例如,无菌玻璃或塑料小瓶)中包含另外的治疗剂。

[0251] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包括本发明的组合,所述组合在单个共用容器中包含任选地一起调配在药物组合物中的本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)或其药物组合物以及一个或多个另外的治疗剂。

[0252] 如果试剂盒包含用于向受试者进行肠胃外施用的药物组合物,则所述试剂盒可以包含用于进行此类施用的装置(例如,注射装置)。例如,所述试剂盒可以包含一个或多个皮下注射针或如上文所讨论的含有本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)的其他注射装置。

[0253] 试剂盒可以包含包装插入物(package insert),所述包装插入物包含关于试剂盒中的药物组合物和剂型的信息。通常,此类信息帮助患者和医师有效地且安全地使用密封的药物组合物和剂型。例如,可以在插入物中提供关于本发明的组合的以下信息:药代动力学、药效学、临床研究、功效参数、适应症和用法、禁忌症、警告、注意事项、不良反应、过剂量、合适的剂量和施用、如何供应、合适的储存条件、参考资料、制造商/经销商信息和专利信息。

[0254] 抗体的诊断用途

[0255] 本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)可以用于检测和/或测量样品中的CoV-S。针对CoV-S的示例性测定可以包含例如使样品与本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白接触,其中所述抗CoV-S抗原结合蛋白标记有可检测标记或报告基因分子或用作捕获配体以选择性地将CoV-S从样品分离。与CoV-S复合的抗CoV-S抗原结合蛋白的存在指示CoV-S存在于样品中。可替代地,未经标记的抗CoV-S抗体可以与本身被可检测标记的第二抗体组合使用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,诸如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I;荧光或化学发光部分,诸如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或酶,诸如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可以用于检测或测量样品中的CoV-S的具体示例性测定包含中和测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选(FACS)。因此,本发明包含用于检测样品中的纤突蛋白多肽的存在的方法,所述

方法包括使样品与抗CoV-S抗原结合蛋白接触以及检测CoV-S/抗CoV-S抗原结合蛋白的存在,其中复合物的存在指示CoV-S的存在。

[0256] 本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白可以在用于检测样品中的CoV-S或其片段的存在的蛋白质印迹或免疫蛋白质印迹程序中使用。此种程序形成本发明的一部分并且包含例如以下步骤:

[0257] (1)提供包括要针对CoV-S的存在进行测试的样品的膜或其他固体基质,例如任选地包含使用本领域已知的方法(例如,半干印迹或罐印迹)将来自要针对CoV-S的存在进行测试的样品(例如,来自对样品中的蛋白质进行PAGE或SDS-PAGE电泳分离)的蛋白质转移到膜或其他固体基质上;以及使要针对CoV-S的存在进行测试的膜或其他固体基质或其片段与本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白接触。

[0258] 此类膜可以采用要针对CoV-S在非变性PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)凝胶或SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)凝胶中的存在进行测试的蛋白质(例如,在凝胶中的电泳分离后)已经转移到其的基于硝化纤维或乙烯基(例如,聚偏二氟乙烯(PVDF))的膜的形式。在使所述膜与抗CoV-S抗原结合蛋白接触之前,任选地用例如无脂干奶等阻断膜,以便结合膜上的非特异性蛋白质结合位点。

[0259] (2)将所述膜洗涤一次或多次以将未结合的抗CoV-S抗原结合蛋白和其他未结合的物质去除;以及

[0260] (3)检测结合的抗CoV-S抗原结合蛋白。

[0261] 检测结合的抗原结合蛋白指示CoV-S蛋白在所述膜或基质上和在所述样品中呈递。检测结合的抗原结合蛋白可以通过使抗原结合蛋白与可检测地标记的第二抗体(抗免疫球蛋白抗体)结合、并且然后检测第二抗体标记的存在来进行。

[0262] 本文所公开的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和抗原结合片段)也可以用于进行免疫组织化学。此种方法形成本发明的一部分并且包括例如

[0263] (1)使要针对CoV-S蛋白的存在进行测试的组织与本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白接触;以及

[0264] (2)在所述组织上或中检测抗原结合蛋白。

[0265] 如果抗原结合蛋白自身可检测地标记,则可以直接检测到其。可替代地,抗原结合蛋白可以通过可检测地标记的第二抗体结合,其中然后检测所述标记。

[0266] 实施例

[0267] 提出以下实施例,以向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是其发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,份数是重量份数,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,室温是约25°C,并且压力为大气压或接近大气压。

[0268] 实施例1:针对SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)的人抗体的产生

[0269] 在包括对人免疫球蛋白重链可变区和 κ 轻链可变区或人免疫球蛋白重链可变区和 λ 轻链可变区的进行编码DNA的 VELOCIMMUNE[®]小鼠中产生针对SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)的人抗体。用表达SARS-CoV-2-S受体结合结构域(RBD)(NCBI登录号(MN908947.3) SEQ ID NO:832的氨基酸1-1273)的载体、然后用带有SARS-CoV-2-S载体或

SARS-CoV-2-S蛋白的增强剂使每个小鼠产生免疫。由SARS-CoV-2-S特异性免疫测定来监测抗体免疫应答。当达到期望的免疫应答时,收获淋巴细胞并使其与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生SARS-CoV-2-S特异性抗体的细胞系。如美国专利7582298所描述的,抗SARS-CoV-2-S抗体直接从抗原阳性的小鼠B细胞中分离,而不与骨髓瘤细胞融合,所述专利通过全文引用的方式并入。使用这种方法,获得了完全人抗SARS-CoV-2-S抗体(即,具有人可变结构域和人恒定结构域的抗体)。

[0270] 抗体也从人血样中分离。实验室确认SARS-CoV-2和症状性COVID-19疾病的PCR测试为阳性后3-4周,采集患者全血。在ACK裂解缓冲液(Life Technologies)中裂解红细胞,并通过Ficoll梯度分离外周血单核细胞(PBMC)。通过荧光激活细胞分选(FACS)从PBMC中分离结合SARS-CoV-2纤突蛋白的单个B细胞。将分离的B细胞单孔铺板并与抗体轻和重可变区域特异性PCR引物混合。每个B细胞的cDNA通过逆转录酶(RT)反应合成。然后将每个所产生的RT产物分离并转移到两个对应的孔中以用于后续的抗体重链和轻链PCR。首先将一组所产生的RT产物通过使用对抗体重可变区前导序列具有特异性的5'简并引物或对抗体轻链可变区前导序列具有特异性的5'简并引物 and 对抗体恒定区具有特异性的3'引物的PCR进行扩增以形成扩增子。然后将扩增子通过使用对抗体重可变区构架1具有特异性的5'简并引物或对抗体轻链可变区构架1具有特异性的5'简并引物 and 对抗体恒定区具有特异性的3'引物的PCR再次进行扩增以产生用于进行克隆的扩增子。将抗体重链和轻链衍生的PCR产物分别克隆到含有重恒定区和轻恒定区的表达载体中。将表达全长重和轻链对的表达载体转染到CHO细胞以产生抗体蛋白以进行测试。

[0271] 根据本实施例的方法产生的示例性抗体的生物学性质在下文所示的实施例中详细描述。

[0272] 实施例2:重链和轻链可变区氨基酸和核苷酸序列

[0273] 表1示出了示例性抗SARS-CoV-2-S抗体的重链和轻链可变区和CDR以及重链和轻链序列的氨基酸序列标识符。对应的核酸序列标识符列于表2中。

[0274] 表1:氨基酸序列标识符

| 抗体名称 | SEQ ID NO | | | | | | | | | |
|----------|-----------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 | HC | LC |
| mAb10913 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 |
| mAb10915 | 22 | 24 | 26 | 28 | 30 | 32 | 34 | 36 | 38 | 40 |
| mAb10916 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 42 | 20 |
| mAb10917 | 44 | 46 | 26 | 49 | 51 | 53 | 55 | 57 | 59 | 61 |
| mAb10918 | 22 | 24 | 26 | 28 | 30 | 32 | 34 | 36 | 63 | 40 |
| mAb10920 | 65 | 67 | 69 | 71 | 73 | 75 | 55 | 77 | 79 | 81 |
| mAb10921 | 83 | 85 | 26 | 87 | 89 | 91 | 55 | 93 | 95 | 97 |
| mAb10922 | 99 | 101 | 103 | 105 | 107 | 109 | 111 | 113 | 115 | 117 |
| mAb10923 | 119 | 121 | 123 | 125 | 127 | 129 | 55 | 131 | 133 | 135 |
| mAb10924 | 137 | 139 | 141 | 143 | 145 | 147 | 149 | 151 | 153 | 155 |
| mAb10925 | 65 | 67 | 69 | 71 | 73 | 75 | 55 | 77 | 157 | 81 |
| mAb10926 | 83 | 85 | 26 | 87 | 89 | 91 | 55 | 93 | 159 | 97 |
| mAb10927 | 99 | 101 | 103 | 105 | 107 | 109 | 111 | 113 | 161 | 117 |
| mAb10928 | 119 | 121 | 123 | 125 | 127 | 129 | 55 | 131 | 163 | 135 |
| mAb10929 | 137 | 139 | 141 | 143 | 145 | 147 | 149 | 151 | 165 | 155 |
| mAb10930 | 167 | 169 | 171 | 173 | 175 | 129 | 55 | 177 | 179 | 181 |

[0275]

[0276]

| | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| mAb10931 | 167 | 169 | 171 | 173 | 175 | 129 | 55 | 177 | 183 | 181 |
| mAb10932 | 185 | 187 | 26 | 189 | 191 | 75 | 194 | 196 | 198 | 200 |
| mAb10933 | 202 | 204 | 206 | 208 | 210 | 212 | 55 | 214 | 216 | 218 |
| mAb10934 | 220 | 222 | 224 | 226 | 228 | 230 | 194 | 232 | 234 | 236 |
| mAb10935 | 238 | 24 | 26 | 240 | 242 | 244 | 194 | 246 | 248 | 250 |
| mAb10936 | 252 | 254 | 256 | 258 | 260 | 129 | 55 | 262 | 264 | 266 |
| mAb10937 | 268 | 270 | 272 | 274 | 276 | 129 | 55 | 278 | 280 | 282 |
| mAb10940 | 284 | 169 | 286 | 288 | 290 | 292 | 294 | 296 | 298 | 300 |
| mAb10938 | 302 | 24 | 26 | 304 | 306 | 308 | 194 | 310 | 312 | 314 |
| mAb10939 | 316 | 187 | 319 | 321 | 323 | 325 | 55 | 327 | 329 | 331 |
| mAb10941 | 333 | 85 | 26 | 336 | 338 | 340 | 294 | 296 | 342 | 344 |
| mAb10942 | 185 | 187 | 26 | 189 | 191 | 75 | 194 | 196 | 346 | 200 |
| mAb10943 | 202 | 204 | 206 | 208 | 210 | 212 | 55 | 214 | 348 | 218 |
| mAb10944 | 220 | 222 | 224 | 226 | 228 | 230 | 194 | 232 | 350 | 236 |
| mAb10945 | 238 | 24 | 26 | 240 | 242 | 244 | 194 | 246 | 352 | 250 |
| mAb10946 | 252 | 254 | 256 | 258 | 260 | 129 | 55 | 262 | 354 | 266 |
| mAb10947 | 268 | 270 | 272 | 274 | 276 | 129 | 55 | 278 | 356 | 282 |
| mAb10948 | 302 | 24 | 26 | 304 | 306 | 308 | 194 | 310 | 358 | 314 |
| mAb10949 | 316 | 187 | 319 | 321 | 323 | 325 | 55 | 327 | 360 | 331 |
| mAb10951 | 333 | 85 | 26 | 336 | 338 | 340 | 294 | 296 | 362 | 344 |
| mAb10950 | 284 | 169 | 286 | 288 | 290 | 292 | 294 | 296 | 364 | 300 |
| mAb10954 | 366 | 85 | 26 | 370 | 372 | 244 | 194 | 375 | 377 | 379 |
| mAb10955 | 381 | 383 | 26 | 385 | 387 | 389 | 194 | 310 | 392 | 394 |
| mAb10956 | 396 | 187 | 26 | 399 | 401 | 389 | 194 | 403 | 405 | 407 |
| mAb10957 | 409 | 411 | 26 | 414 | 416 | 53 | 55 | 418 | 420 | 422 |
| mAb10958 | 366 | 85 | 26 | 370 | 372 | 244 | 194 | 375 | 424 | 379 |
| mAb10959 | 381 | 383 | 26 | 385 | 387 | 389 | 194 | 310 | 426 | 394 |
| mAb10960 | 396 | 187 | 26 | 399 | 401 | 389 | 194 | 403 | 428 | 407 |
| mAb10961 | 409 | 411 | 26 | 414 | 416 | 53 | 55 | 418 | 430 | 422 |
| mAb10964 | 432 | 434 | 436 | 438 | 440 | 442 | 55 | 445 | 447 | 449 |
| mAb10965 | 451 | 453 | 26 | 455 | 457 | 459 | 34 | 462 | 464 | 466 |
| mAb10966 | 468 | 187 | 26 | 470 | 472 | 389 | 194 | 474 | 476 | 478 |
| mAb10967 | 480 | 24 | 483 | 485 | 487 | 389 | 194 | 489 | 491 | 493 |
| mAb10969 | 495 | 497 | 499 | 501 | 503 | 389 | 194 | 214 | 506 | 508 |
| mAb10970 | 510 | 24 | 26 | 512 | 514 | 516 | 194 | 518 | 520 | 522 |
| mAb10971 | 524 | 411 | 26 | 528 | 530 | 532 | 55 | 534 | 536 | 538 |
| mAb10973 | 432 | 434 | 436 | 438 | 440 | 442 | 55 | 445 | 540 | 449 |
| mAb10974 | 451 | 453 | 26 | 455 | 457 | 459 | 34 | 462 | 542 | 466 |
| mAb10975 | 468 | 187 | 26 | 470 | 472 | 389 | 194 | 474 | 544 | 478 |
| mAb10976 | 480 | 24 | 483 | 485 | 487 | 389 | 194 | 489 | 546 | 493 |
| mAb10977 | 548 | 550 | 552 | 554 | 556 | 558 | 294 | 560 | 562 | 564 |
| mAb10978 | 495 | 497 | 499 | 501 | 503 | 389 | 194 | 214 | 566 | 508 |
| mAb10979 | 510 | 24 | 26 | 512 | 514 | 516 | 194 | 518 | 568 | 522 |
| mAb10980 | 524 | 411 | 26 | 528 | 530 | 532 | 55 | 534 | 570 | 538 |
| mAb10981 | 548 | 550 | 552 | 554 | 556 | 558 | 294 | 560 | 572 | 564 |
| mAb10982 | 574 | 187 | 576 | 578 | 580 | 582 | 584 | 586 | 588 | 590 |
| mAb10983 | 574 | 187 | 576 | 578 | 580 | 582 | 584 | 586 | 592 | 590 |

[0277]

| | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| mAb10984 | 594 | 596 | 26 | 598 | 600 | 12 | 14 | 602 | 604 | 606 |
| mAb10985 | 608 | 169 | 610 | 612 | 614 | 616 | 584 | 618 | 620 | 622 |
| mAb10986 | 624 | 626 | 26 | 628 | 630 | 582 | 632 | 634 | 636 | 638 |
| mAb10987 | 640 | 642 | 499 | 644 | 646 | 648 | 650 | 652 | 654 | 656 |
| mAb10988 | 658 | 660 | 662 | 664 | 666 | 668 | 670 | 672 | 674 | 676 |
| mAb10989 | 678 | 680 | 682 | 684 | 686 | 688 | 650 | 690 | 692 | 694 |
| mAb10990 | 594 | 596 | 26 | 598 | 600 | 12 | 14 | 602 | 696 | 606 |
| mAb10991 | 608 | 169 | 610 | 612 | 614 | 616 | 584 | 618 | 698 | 622 |
| mAb10992 | 624 | 626 | 26 | 628 | 630 | 582 | 632 | 634 | 700 | 638 |
| mAb10993 | 640 | 642 | 499 | 644 | 646 | 648 | 650 | 652 | 702 | 656 |
| mAb10994 | 658 | 660 | 662 | 664 | 666 | 668 | 670 | 672 | 704 | 676 |
| mAb10995 | 678 | 680 | 682 | 684 | 686 | 688 | 650 | 690 | 706 | 694 |
| mAb10996 | 708 | 24 | 26 | 711 | 713 | 129 | 55 | 715 | 717 | 719 |
| mAb10997 | 708 | 24 | 26 | 711 | 713 | 129 | 55 | 715 | 721 | 719 |
| mAb10998 | 723 | 187 | 26 | 725 | 727 | 129 | 55 | 729 | 731 | 733 |
| mAb10999 | 723 | 187 | 26 | 725 | 727 | 129 | 55 | 729 | 735 | 733 |
| mAb11000 | 737 | 24 | 26 | 739 | 741 | 743 | 55 | 745 | 747 | 749 |
| mAb11001 | 737 | 24 | 26 | 739 | 741 | 743 | 55 | 745 | 751 | 749 |
| mAb11002 | 753 | 24 | 26 | 755 | 713 | 129 | 55 | 715 | 757 | 719 |
| mAb11003 | 753 | 24 | 26 | 755 | 713 | 129 | 55 | 715 | 759 | 719 |
| mAb10914 | 44 | 46 | 26 | 49 | 51 | 53 | 55 | 57 | 762 | 61 |
| mAb11004 | 764 | 766 | 499 | 768 | 770 | 91 | 55 | 772 | 774 | 776 |
| mAb11005 | 764 | 766 | 499 | 768 | 770 | 91 | 55 | 772 | 778 | 776 |
| mAb11006 | 780 | 782 | 26 | 784 | 786 | 53 | 55 | 788 | 790 | 792 |
| mAb11007 | 780 | 782 | 26 | 784 | 786 | 53 | 55 | 788 | 794 | 792 |
| mAb11008 | 796 | 24 | 26 | 798 | 800 | 53 | 55 | 802 | 804 | 806 |
| mAb11009 | 796 | 24 | 26 | 798 | 800 | 53 | 55 | 802 | 808 | 806 |
| mAb11010 | 810 | 812 | 814 | 816 | 818 | 129 | 820 | 822 | 824 | 826 |
| mAb11011 | 810 | 812 | 814 | 816 | 818 | 129 | 820 | 822 | 828 | 826 |

[0278] 表2:核酸序列标识符

[0279]

| 抗体名称 | SEQ ID NO | | | | | | | | | |
|----------|-----------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 | HC | LC |
| mAb10913 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 | 17 | 19 |
| mAb10915 | 21 | 23 | 25 | 27 | 29 | 31 | 33 | 35 | 37 | 39 |
| mAb10916 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 | 41 | 19 |
| mAb10917 | 43 | 45 | 47 | 48 | 50 | 52 | 54 | 56 | 58 | 60 |
| mAb10918 | 21 | 23 | 25 | 27 | 29 | 31 | 33 | 35 | 62 | 39 |
| mAb10920 | 64 | 66 | 68 | 70 | 72 | 74 | 54 | 76 | 78 | 80 |
| mAb10921 | 82 | 84 | 47 | 86 | 88 | 90 | 54 | 92 | 94 | 96 |
| mAb10922 | 98 | 100 | 102 | 104 | 106 | 108 | 110 | 112 | 114 | 116 |
| mAb10923 | 118 | 120 | 122 | 124 | 126 | 128 | 54 | 130 | 132 | 134 |
| mAb10924 | 136 | 138 | 140 | 142 | 144 | 146 | 148 | 150 | 152 | 154 |
| mAb10925 | 64 | 66 | 68 | 70 | 72 | 74 | 54 | 76 | 156 | 80 |

[0280]

| | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| mAb10926 | 82 | 84 | 47 | 86 | 88 | 90 | 54 | 92 | 158 | 96 |
| mAb10927 | 98 | 100 | 102 | 104 | 106 | 108 | 110 | 112 | 160 | 116 |
| mAb10928 | 118 | 120 | 122 | 124 | 126 | 128 | 54 | 130 | 162 | 134 |
| mAb10929 | 136 | 138 | 140 | 142 | 144 | 146 | 148 | 150 | 164 | 154 |
| mAb10930 | 166 | 168 | 170 | 172 | 174 | 128 | 54 | 176 | 178 | 180 |
| mAb10931 | 166 | 168 | 170 | 172 | 174 | 128 | 54 | 176 | 182 | 180 |
| mAb10932 | 184 | 186 | 47 | 188 | 190 | 192 | 193 | 195 | 197 | 199 |
| mAb10933 | 201 | 203 | 205 | 207 | 209 | 211 | 54 | 213 | 215 | 217 |
| mAb10934 | 219 | 221 | 223 | 225 | 227 | 229 | 193 | 231 | 233 | 235 |
| mAb10935 | 237 | 23 | 47 | 239 | 241 | 243 | 193 | 245 | 247 | 249 |
| mAb10936 | 251 | 253 | 255 | 257 | 259 | 128 | 54 | 261 | 263 | 265 |
| mAb10937 | 267 | 269 | 271 | 273 | 275 | 128 | 54 | 277 | 279 | 281 |
| mAb10940 | 283 | 168 | 285 | 287 | 289 | 291 | 293 | 295 | 297 | 299 |
| mAb10938 | 301 | 23 | 47 | 303 | 305 | 307 | 193 | 309 | 311 | 313 |
| mAb10939 | 315 | 317 | 318 | 320 | 322 | 324 | 54 | 326 | 328 | 330 |
| mAb10941 | 332 | 334 | 47 | 335 | 337 | 339 | 293 | 295 | 341 | 343 |
| mAb10942 | 184 | 186 | 47 | 188 | 190 | 192 | 193 | 195 | 345 | 199 |
| mAb10943 | 201 | 203 | 205 | 207 | 209 | 211 | 54 | 213 | 347 | 217 |
| mAb10944 | 219 | 221 | 223 | 225 | 227 | 229 | 193 | 231 | 349 | 235 |
| mAb10945 | 237 | 23 | 47 | 239 | 241 | 243 | 193 | 245 | 351 | 249 |
| mAb10946 | 251 | 253 | 255 | 257 | 259 | 128 | 54 | 261 | 353 | 265 |
| mAb10947 | 267 | 269 | 271 | 273 | 275 | 128 | 54 | 277 | 355 | 281 |
| mAb10948 | 301 | 23 | 47 | 303 | 305 | 307 | 193 | 309 | 357 | 313 |
| mAb10949 | 315 | 317 | 318 | 320 | 322 | 324 | 54 | 326 | 359 | 330 |
| mAb10951 | 332 | 334 | 47 | 335 | 337 | 339 | 293 | 295 | 361 | 343 |
| mAb10950 | 283 | 168 | 285 | 287 | 289 | 291 | 293 | 295 | 363 | 299 |
| mAb10954 | 365 | 367 | 368 | 369 | 371 | 373 | 193 | 374 | 376 | 378 |
| mAb10955 | 380 | 382 | 47 | 384 | 386 | 388 | 193 | 390 | 391 | 393 |
| mAb10956 | 395 | 397 | 47 | 398 | 400 | 388 | 193 | 402 | 404 | 406 |
| mAb10957 | 408 | 410 | 412 | 413 | 415 | 52 | 54 | 417 | 419 | 421 |
| mAb10958 | 365 | 367 | 368 | 369 | 371 | 373 | 193 | 374 | 423 | 378 |
| mAb10959 | 380 | 382 | 47 | 384 | 386 | 388 | 193 | 390 | 425 | 393 |
| mAb10960 | 395 | 397 | 47 | 398 | 400 | 388 | 193 | 402 | 427 | 406 |
| mAb10961 | 408 | 410 | 412 | 413 | 415 | 52 | 54 | 417 | 429 | 421 |
| mAb10964 | 431 | 433 | 435 | 437 | 439 | 441 | 443 | 444 | 446 | 448 |
| mAb10965 | 450 | 452 | 47 | 454 | 456 | 458 | 460 | 461 | 463 | 465 |
| mAb10966 | 467 | 397 | 412 | 469 | 471 | 388 | 193 | 473 | 475 | 477 |
| mAb10967 | 479 | 481 | 482 | 484 | 486 | 388 | 193 | 488 | 490 | 492 |
| mAb10969 | 494 | 496 | 498 | 500 | 502 | 388 | 193 | 504 | 505 | 507 |
| mAb10970 | 509 | 481 | 412 | 511 | 513 | 515 | 193 | 517 | 519 | 521 |
| mAb10971 | 523 | 525 | 526 | 527 | 529 | 531 | 54 | 533 | 535 | 537 |
| mAb10973 | 431 | 433 | 435 | 437 | 439 | 441 | 443 | 444 | 539 | 448 |
| mAb10974 | 450 | 452 | 47 | 454 | 456 | 458 | 460 | 461 | 541 | 465 |
| mAb10975 | 467 | 397 | 412 | 469 | 471 | 388 | 193 | 473 | 543 | 477 |
| mAb10976 | 479 | 481 | 482 | 484 | 486 | 388 | 193 | 488 | 545 | 492 |
| mAb10977 | 547 | 549 | 551 | 553 | 555 | 557 | 293 | 559 | 561 | 563 |
| mAb10978 | 494 | 496 | 498 | 500 | 502 | 388 | 193 | 504 | 565 | 507 |

[0281]

| | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| mAb10979 | 509 | 481 | 412 | 511 | 513 | 515 | 193 | 517 | 567 | 521 |
| mAb10980 | 523 | 525 | 526 | 527 | 529 | 531 | 54 | 533 | 569 | 537 |
| mAb10981 | 547 | 549 | 551 | 553 | 555 | 557 | 293 | 559 | 571 | 563 |
| mAb10982 | 573 | 186 | 575 | 577 | 579 | 581 | 583 | 585 | 587 | 589 |
| mAb10983 | 573 | 186 | 575 | 577 | 579 | 581 | 583 | 585 | 591 | 589 |
| mAb10984 | 593 | 595 | 47 | 597 | 599 | 11 | 13 | 601 | 603 | 605 |
| mAb10985 | 607 | 168 | 609 | 611 | 613 | 615 | 583 | 617 | 619 | 621 |
| mAb10986 | 623 | 625 | 47 | 627 | 629 | 581 | 631 | 633 | 635 | 637 |
| mAb10987 | 639 | 641 | 498 | 643 | 645 | 647 | 649 | 651 | 653 | 655 |
| mAb10988 | 657 | 659 | 661 | 663 | 665 | 667 | 669 | 671 | 673 | 675 |
| mAb10989 | 677 | 679 | 681 | 683 | 685 | 687 | 649 | 689 | 691 | 693 |
| mAb10990 | 593 | 595 | 47 | 597 | 599 | 11 | 13 | 601 | 695 | 605 |
| mAb10991 | 607 | 168 | 609 | 611 | 613 | 615 | 583 | 617 | 697 | 621 |
| mAb10992 | 623 | 625 | 47 | 627 | 629 | 581 | 631 | 633 | 699 | 637 |
| mAb10993 | 639 | 641 | 498 | 643 | 645 | 647 | 649 | 651 | 701 | 655 |
| mAb10994 | 657 | 659 | 661 | 663 | 665 | 667 | 669 | 671 | 703 | 675 |
| mAb10995 | 677 | 679 | 681 | 683 | 685 | 687 | 649 | 689 | 705 | 693 |
| mAb10996 | 707 | 709 | 47 | 710 | 712 | 128 | 54 | 714 | 716 | 718 |
| mAb10997 | 707 | 709 | 47 | 710 | 712 | 128 | 54 | 714 | 720 | 718 |
| mAb10998 | 722 | 186 | 47 | 724 | 726 | 128 | 54 | 728 | 730 | 732 |
| mAb10999 | 722 | 186 | 47 | 724 | 726 | 128 | 54 | 728 | 734 | 732 |
| mAb11000 | 736 | 23 | 47 | 738 | 740 | 742 | 54 | 744 | 746 | 748 |
| mAb11001 | 736 | 23 | 47 | 738 | 740 | 742 | 54 | 744 | 750 | 748 |
| mAb11002 | 752 | 23 | 47 | 754 | 712 | 128 | 54 | 714 | 756 | 718 |
| mAb11003 | 752 | 23 | 47 | 754 | 712 | 128 | 54 | 714 | 758 | 718 |
| mAb10914 | 760 | 45 | 47 | 48 | 50 | 52 | 54 | 56 | 761 | 60 |
| mAb11004 | 763 | 765 | 498 | 767 | 769 | 90 | 54 | 771 | 773 | 775 |
| mAb11005 | 763 | 765 | 498 | 767 | 769 | 90 | 54 | 771 | 777 | 775 |
| mAb11006 | 779 | 781 | 47 | 783 | 785 | 52 | 54 | 787 | 789 | 791 |
| mAb11007 | 779 | 781 | 47 | 783 | 785 | 52 | 54 | 787 | 793 | 791 |
| mAb11008 | 795 | 709 | 47 | 797 | 799 | 52 | 54 | 801 | 803 | 805 |
| mAb11009 | 795 | 709 | 47 | 797 | 799 | 52 | 54 | 801 | 807 | 805 |
| mAb11010 | 809 | 811 | 813 | 815 | 817 | 128 | 819 | 821 | 823 | 825 |
| mAb11011 | 809 | 811 | 813 | 815 | 817 | 128 | 819 | 821 | 827 | 825 |

[0282] 虽然本文所公开的抗体具有完全人可变区,但是可以具有小鼠恒定区(例如,小鼠IgG1 Fc或小鼠IgG2 Fc(a或b同种型))或人恒定区(例如,人IgG1 Fc或人IgG4 Fc)。如本领域普通技术人员所理解的,具有特定Fc同种型的抗体可以转化为具有不同Fc同种型的抗体(例如,具有小鼠IgG1 Fc的抗体可以转化为具有人IgG4的抗体等),但无论如何,由表1和2中所示出的数字标识符指示的可变结构域(包含CDR)将保持相同,并且无论恒定结构域的性质如何,预期抗原的结合性质相同或基本上类似。

[0283] 通过下一代测序对衍生自 VELOCIMMUNE[®]小鼠和衍生自人样品的抗体的可变区进行测序,并鉴定重链和轻链对的组库(图10A和图10B)。VI抗体的主要谱系使用与VK1-9、VK1-33或VK1-39配对的VH3-53,而人源性抗体使用与VK1-33配对的VH3-66或与VK1-39配对的VH2-70。对重叠序列的进一步分析示出VI与人源性抗体之间的分离的κ链的组库中的较强重叠。尽管λ链的组库并没有很好地重叠,这可能是由于这个试验中仅包含两只小鼠。VI与人源性抗体的重链的平均CDR长度类似,平均长度分别为13个和14.5个氨基酸。VI和人源性抗体的平均κCDR长度同为9个氨基酸并且接近平均长度分别为11.1个和10.6个

氨基酸的 λ 链。人源化小鼠和人源性抗体的可用性允许更多的V基因的多样性,并且使得能够随后对非竞争抗体进行鉴定。

[0284] 如上文所描述的,从以下来源获得抗体:从产生自 VELOCIMMUNE[®]小鼠的杂交瘤、通过从抗原阳性的 VELOCIMMUNE[®]小鼠B细胞直接分离或通过从抗原阳性人B细胞直接分离。这些来源的总结在表3中示出。

[0285] 表3:抗体来源

| 抗体 | 分离 |
|-----------------|---------|
| mAb10913 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10915 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10916 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10917 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10918 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10920 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10921 | 小鼠 B 细胞 |
| [0286] mAb10922 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10923 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10924 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10925 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10926 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10927 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10928 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10929 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10930 | 小鼠 B 细胞 |

[0287]

| | |
|----------|---------|
| mAb10931 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10932 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10933 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10934 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10935 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10936 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10937 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10940 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10938 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10939 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10941 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10942 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10943 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10944 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10945 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10946 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10947 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10948 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10949 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10951 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10950 | 小鼠 B 细胞 |
| mAb10954 | 人 B 细胞 |
| mAb10955 | 人 B 细胞 |
| mAb10956 | 人 B 细胞 |
| mAb10957 | 人 B 细胞 |
| mAb10958 | 人 B 细胞 |
| mAb10959 | 人 B 细胞 |
| mAb10960 | 人 B 细胞 |
| mAb10961 | 人 B 细胞 |
| mAb10964 | 人 B 细胞 |
| mAb10965 | 人 B 细胞 |
| mAb10966 | 人 B 细胞 |
| mAb10967 | 人 B 细胞 |
| mAb10969 | 人 B 细胞 |
| mAb10970 | 人 B 细胞 |
| mAb10971 | 人 B 细胞 |
| mAb10973 | 人 B 细胞 |
| mAb10974 | 人 B 细胞 |
| mAb10975 | 人 B 细胞 |
| mAb10976 | 人 B 细胞 |
| mAb10977 | 人 B 细胞 |
| mAb10978 | 人 B 细胞 |

| | | |
|--------|----------|---------|
| | mAb10979 | 人 B 细胞 |
| | mAb10980 | 人 B 细胞 |
| | mAb10981 | 人 B 细胞 |
| | mAb10982 | 小鼠 B 细胞 |
| | mAb10983 | 小鼠 B 细胞 |
| | mAb10984 | 人 B 细胞 |
| | mAb10985 | 人 B 细胞 |
| | mAb10986 | 人 B 细胞 |
| | mAb10987 | 人 B 细胞 |
| | mAb10988 | 人 B 细胞 |
| | mAb10989 | 人 B 细胞 |
| | mAb10990 | 人 B 细胞 |
| | mAb10991 | 人 B 细胞 |
| | mAb10992 | 人 B 细胞 |
| | mAb10993 | 人 B 细胞 |
| | mAb10994 | 人 B 细胞 |
| [0288] | mAb10995 | 人 B 细胞 |
| | mAb10996 | 杂交瘤 |
| | mAb10997 | 杂交瘤 |
| | mAb10998 | 杂交瘤 |
| | mAb10999 | 杂交瘤 |
| | mAb11000 | 杂交瘤 |
| | mAb11001 | 杂交瘤 |
| | mAb11002 | 杂交瘤 |
| | mAb11003 | 杂交瘤 |
| | mAb10914 | 小鼠 B 细胞 |
| | mAb11004 | 杂交瘤 |
| | mAb11005 | 杂交瘤 |
| | mAb11006 | 杂交瘤 |
| | mAb11007 | 杂交瘤 |
| | mAb11008 | 杂交瘤 |
| | mAb11009 | 杂交瘤 |
| | mAb11010 | 杂交瘤 |
| | mAb11011 | 杂交瘤 |

[0289] 实施例3:通过结合ELISA表征杂交瘤上清液

[0290] 进行ELISA结合测定以鉴定与SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域(RBD)结合的抗体上清液。将由在C端处用6X组氨酸标签和两个myc表位标签(SARS-CoV-2-S-RBD-mmH;另请参见NCBI登录号MN908947.3)表达的SARS-CoV-2的RBD(氨基酸319-541)组成的蛋白质在4°C下在PBS缓冲液中以1 μ g/ml涂覆在96孔板上过夜。随后使用0.5% (w/v)的含BSA的PBS的溶液阻断非特异性结合位点。仅将抗体上清液或培养基在PSA+0.5% BSA阻断缓冲液中以1:40或1:50稀释,并转移到经过洗涤的微量滴定板。在室温下温育一小时后,将孔洗涤,并用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗人IgG抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司

(Jackson Immunoresearch))或与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗小鼠IgG抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)检测板结合的上清液。然后根据制造商的建议使用TMB底物溶液(BD生物科学公司)对板进行显影,并在Victor X5读板仪上测量450nm处的吸光度。

[0291] 如上文所描述的,在SARS-CoV-2-S-RBD-mmH蛋白涂覆在微板的情况下,使用结合ELISA法评估抗SARS-CoV-2-S抗体结合SARS-CoV-2-S的受体结合结构域(SARS-CoV-2-S-RBD)的能力。用HRP缀合的抗-hFc或抗-mFc抗体检测与涂覆在96孔微量滴定板上的SARS-CoV-2-S-RBD-mmH结合的单点抗体上清液。

[0292] 三个试验的结合结果汇总于表4中。指示了SARS-CoV-2结合信号(吸光度450nm),每个实验提供仅培养基背景作为阴性参考。标记有IC(不确定)的样品的板具有实验异常,并且因此所述样品报告为无值。如与仅培养基对照比较所示出的,测试的上清液显示出与SARS-CoV-2-S-RBD的大量结合。

[0293] 表4:上清液与SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域的结合

[0294]

| 上清液 | 上清液稀释度 | 检测抗体 | 结合信号(450nm处的吸光度) |
|----------|--------|-------|------------------|
| mAb10913 | 1:50 | a-hFc | 2.752 |
| mAb10914 | 1:50 | a-hFc | 2.857 |
| mAb10915 | 1:50 | a-hFc | 2.76 |
| mAb10932 | 1:50 | a-hFc | 2.718 |
| mAb10933 | 1:50 | a-hFc | 2.762 |
| mAb10934 | 1:50 | a-hFc | 2.688 |
| mAb10935 | 1:50 | a-hFc | 2.676 |
| mAb10936 | 1:50 | a-hFc | 2.644 |
| mAb10937 | 1:50 | a-hFc | 2.664 |
| mAb10920 | 1:50 | a-hFc | 2.683 |
| mAb10921 | 1:50 | a-hFc | 2.633 |
| mAb10922 | 1:50 | a-hFc | 2.595 |
| mAb10923 | 1:50 | a-hFc | 2.353 |

| | | | | |
|--------|----------|------|-------|-------|
| | mAb10924 | 1:50 | a-hFc | 2.269 |
| | mAb10930 | 1:50 | a-hFc | 2.451 |
| | mAb10938 | 1:50 | a-hFc | 2.536 |
| | mAb10939 | 1:50 | a-hFc | 2.516 |
| | mAb10940 | 1:50 | a-hFc | 2.77 |
| | mAb10941 | 1:50 | a-hFc | IC |
| | mAb10982 | 1:50 | a-hFc | 2.537 |
| | mAb10984 | 1:50 | a-hFc | 0.716 |
| | mAb10985 | 1:50 | a-hFc | 2.35 |
| | mAb10986 | 1:50 | a-hFc | 2.331 |
| | mAb10987 | 1:50 | a-hFc | 2.438 |
| | mAb10988 | 1:50 | a-hFc | 3.062 |
| | mAb10989 | 1:50 | a-hFc | 3.116 |
| | mAb10969 | 1:50 | a-hFc | 2.629 |
| | mAb10970 | 1:50 | a-hFc | 2.807 |
| | mAb10971 | 1:50 | a-hFc | 3.052 |
| | mAb10964 | 1:50 | a-hFc | 3.086 |
| | mAb10965 | 1:50 | a-hFc | 2.918 |
| [0295] | mAb10966 | 1:50 | a-hFc | 0.421 |
| | mAb10967 | 1:50 | a-hFc | 1.732 |
| | mAb10954 | 1:50 | a-hFc | 1.963 |
| | mAb10955 | 1:50 | a-hFc | 2.469 |
| | mAb10956 | 1:50 | a-hFc | 2.6 |
| | mAb10957 | 1:50 | a-hFc | 2.49 |
| | mAb10977 | 1:50 | a-hFc | 2.925 |
| | mAb11010 | 1:40 | a-mFc | 2.896 |
| | mAb11004 | 1:40 | a-mFc | 2.908 |
| | mAb11000 | 1:40 | a-mFc | 2.725 |
| | mAb11006 | 1:40 | a-mFc | 2.619 |
| | mAb11008 | 1:40 | a-mFc | 2.907 |
| | mAb10998 | 1:40 | a-mFc | 2.835 |
| | mAb10996 | 1:40 | a-mFc | 2.826 |
| | mAb11002 | 1:40 | a-mFc | 2.581 |
| | 仅培养基 | 1:50 | a-hFc | 0.069 |
| | 仅培养基 | 1:40 | a-mFc | 0.058 |
| | 仅培养基 | 1:50 | a-hFc | 0.055 |

[0296] 实施例4:抗体与表达SARS-CoV-2-S的病毒样颗粒的结合

[0297] 为了研究一组抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体结合SARS-CoV-2纤突糖蛋白的能力,开发了在基于电化学发光的检测平台(MSD)中使用表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒样颗粒(VLP)进行体外结合测定。

[0298] 为了瞬时表达SARS-CoV-2纤突蛋白(NCBI登录号MN908947.3,氨基酸16-1211;SEQ ID NO:833),将缺乏糖蛋白G(VSV δ G)的水泡性口炎病毒(VSV)用S-CoV-2纤突蛋白进行假型化(VSV-SARS-CoV-2-S)并在HEK293T细胞中产生。作为阴性结合对照,将VSV δ G用VSV G蛋白(VSV-G)进行假型化。

[0299] 根据以下程序进行实验。将上文所描述的两类型的VLP稀释于PBS中,接种到96孔碳电极板(多阵列高结合板,MSD)中,并在4℃下温育过夜,以允许VLP粘附。将非特异性结合位点在室温下用含2% BSA(w/v)的PBS阻断1小时。将含有从SARS CoV-2免疫小鼠或受感染人血清产生的抗体的上清液以及在1x PBS+0.5% BSA缓冲液中以1:10或1:20稀释的仅培养基对照添加到板结合的颗粒。然后将板在室温下摇动温育1小时,然后使用AquaMax2000洗板机(MDS分析技术公司(MDS Analytical Technologies))将板用1x PBS洗涤以去除未结合的抗体。在室温下用SULFO-TAGTM缀合的抗人IgG抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)或SULFO-TAGTM缀合的抗小鼠IgG抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)对板结合的抗体进行1小时的检测。洗涤后,根据制造商建议的程序用读取缓冲液(MSD)对板进行显影,并用SECTOR成像仪600(Meso Scale Development)仪器记录发光信号。捕获直接结合信号(在RLU中),并计算出表达SARS-CoV-2-S的VLP与无关VLP的比率。

[0300] 如上文所描述的,使用免疫结合测定评估抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体与表达SARS-CoV-2-S的VLP的结合相较于与无关的表达VSV的VLP结合的能力。用稀释度为1:10或1:20的抗体上清液对96孔高结合平板(MSD)上的固定的VLP进行单点结合,结合1小时,并使用SULFO-TAGTM缀合的抗人IgG或抗小鼠IgG抗体进行检测。将来自电化学发光的结合信号记录在Sector成像仪600(MSD)上。测定抗体与VLP的结合的RLU值。比较表达SARS-CoV-2-S的VLP结合信号与对照VLP来计算比率。

[0301] 来自三个实验的结合结果汇总于表5中。从表达SARS-COV-2-S的VLP观察到的信号指示结合,而与阴性VLP的比较则提供了相对背景。仅培养基样品提供了二级抗体与没有上清液的样品的结合的基线信号。在表达SARS-CoV-2-S的VLP上,46种抗体的特异性结合比仅培养基样品(20-35RLU)高出>4倍,结合信号的范围为85-13,600RLU。表达SARS-CoV-2-S的VSV:VSV-VLP(阴性对照)的比率的范围为1.1-22.7,其中许多在VSV-VLP上具有高背景。mAb11002的比率为0.9可能是由于上清液样品中的单克隆抗体的浓度较低。

[0302] 表5:SARS-CoV-2-S VLP结合

| 上清液 | 上清液 稀释度 | 二级检 测抗体 | VSV-VLP 结合 信号 (RLU) | VSV-SARS-CoV- 2-S VLP 结合信号 (RLU) | 结合信号的比率: VSV-SARS-CoV- 2-S/VSV-VLP |
|----------|------------|------------|------------------------|--|--|
| mAb10913 | 1:10 | a-hFc | 2155 | 3244 | 1.5 |
| mAb10914 | 1:10 | a-hFc | 3885 | 5181 | 1.3 |
| mAb10915 | 1:10 | a-hFc | 980 | 9022 | 9.2 |
| mAb10932 | 1:10 | a-hFc | 989 | 10451 | 10.6 |
| mAb10933 | 1:10 | a-hFc | 507 | 966 | 1.9 |
| mAb10934 | 1:10 | a-hFc | 3876 | 5041 | 1.3 |
| mAb10935 | 1:10 | a-hFc | 2087 | 3867 | 1.9 |
| mAb10936 | 1:10 | a-hFc | 2325 | 8076 | 3.5 |
| mAb10937 | 1:10 | a-hFc | 1404 | 1920 | 1.4 |
| mAb10920 | 1:10 | a-hFc | 8366 | 10041 | 1.2 |
| mAb10921 | 1:10 | a-hFc | 1194 | 5436 | 4.6 |
| mAb10922 | 1:10 | a-hFc | 1473 | 2229 | 1.5 |
| mAb10923 | 1:10 | a-hFc | 1224 | 1859 | 1.5 |
| mAb10924 | 1:10 | a-hFc | 487 | 969 | 2 |
| mAb10930 | 1:10 | a-hFc | 1769 | 3207 | 1.8 |
| mAb10938 | 1:10 | a-hFc | 1232 | 6623 | 5.4 |
| mAb10939 | 1:10 | a-hFc | 1777 | 5074 | 2.9 |
| mAb10940 | 1:10 | a-hFc | 606 | 2072 | 3.4 |
| mAb10941 | 1:10 | a-hFc | 673 | 4588 | 6.8 |
| mAb10982 | 1:10 | a-hFc | 1178 | 2016 | 1.7 |
| mAb10984 | 1:10 | a-hFc | 2486 | 8989 | 3.6 |
| mAb10985 | 1:10 | a-hFc | 2049 | 3279 | 1.6 |
| mAb10986 | 1:10 | a-hFc | 2044 | 10831 | 5.3 |
| mAb10987 | 1:10 | a-hFc | 1839 | 2450 | 1.3 |
| mAb10988 | 1:10 | a-hFc | 1832 | 2305 | 1.3 |
| mAb10989 | 1:10 | a-hFc | 672 | 1999 | 3 |
| mAb10969 | 1:10 | a-hFc | 3096 | 3313 | 1.1 |
| mAb10970 | 1:10 | a-hFc | 1364 | 5712 | 4.2 |
| mAb10971 | 1:10 | a-hFc | 1135 | 7266 | 6.4 |
| mAb10964 | 1:10 | a-hFc | 1439 | 8601 | 6 |
| mAb10965 | 1:10 | a-hFc | 743 | 1370 | 1.8 |
| mAb10966 | 1:10 | a-hFc | 1428 | 6574 | 4.6 |
| mAb10967 | 1:10 | a-hFc | 1446 | 9510 | 6.6 |
| mAb10954 | 1:10 | a-hFc | 641 | 6308 | 9.8 |
| mAb10955 | 1:10 | a-hFc | 932 | 1788 | 1.9 |
| mAb10956 | 1:10 | a-hFc | 1030 | 1581 | 1.5 |
| mAb10957 | 1:10 | a-hFc | 604 | 5544 | 9.2 |
| mAb10977 | 1:10 | a-hFc | 4141 | 13600 | 3.3 |
| mAb11010 | 1:20 | a-mFc | 96 | 363 | 3.8 |
| mAb11004 | 1:20 | a-mFc | 110 | 406 | 3.7 |
| mAb11000 | 1:20 | a-mFc | 333 | 592 | 1.8 |
| mAb11006 | 1:20 | a-mFc | 165 | 3747 | 22.7 |
| mAb11008 | 1:20 | a-mFc | 103 | 324 | 3.1 |
| mAb10998 | 1:20 | a-mFc | 74 | 218 | 2.9 |
| mAb10996 | 1:20 | a-mFc | 51 | 85 | 1.7 |
| mAb11002 | 1:20 | a-mFc | 156 | 146 | 0.9 |
| 仅培养基 | 1:10 | a-hFc | 30 | 35 | 1.2 |
| 仅培养基 | 1:20 | a-mFc | 35 | 20 | 0.6 |
| 仅培养基 | 1:10 | a-hFc | 39 | 29 | 0.7 |

[0305] 实施例5:VSV-SARS-CoV-2-S假病毒感染性的抗体中和

[0306] 为了研究一组抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体中和SARS-CoV-2的能力,开发了使用VSV-SARS-CoV-2-S假病毒进行的体外中和测定。

[0307] 如上文所描述的,通过用对SARS-CoV-2纤突蛋白进行编码的质粒瞬时转染293T细胞来产生VSV假型化病毒。在使用125 μ L Lipofectamine LTX、30 μ L PLUS试剂和高达3mL Opti-Mem以15 μ g/板的纤突蛋白DNA转染前一天,在DMEM完全培养基中将细胞以每板 1.2×10^7 个细胞接种在15cm的板中。转染后24小时,将细胞用10mL PBS洗涤,然后在10mL的Opti-Mem中以0.1VSV^{AG:mNeon}病毒的MOI感染。将病毒在细胞上温育1小时,每10分钟轻轻摇动一次。将细胞用10mL PBS洗涤3次,然后用20mL感染培养基覆盖,然后在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下温育24小时。将上清液收集在冰上的250mL离心管中,然后以3000rpm离心5分钟以沉淀任何细胞碎片,在冰上等分,然后冷冻到-80 $^{\circ}$ C。在用于中和测定中之前,在Vero细胞上测试感染性。这个材料将被称为VSV-SARS-CoV-2-S。

[0308] 用VSV-SARS-CoV-2-S进行中和测定

[0309] 在第1天,将Vero细胞以80%汇合度接种在T225烧瓶中。对于种子细胞,将培养基从细胞去除,将细胞用20mL PBS (Gibco:20012-043) 洗涤,并添加5mL TrypLE并在37 $^{\circ}$ C下温育~5分钟,直到细胞脱落为止。添加5mL的完整DMEM使胰蛋白酶失活,并上下移液以分配细胞。为了计数重悬细胞,将20,000个Vero细胞平板接种在96孔黑色聚苯乙烯微板(康宁公司(Corning):3904)中的每孔100 μ L预热的完整DMEM中。

[0310] 在第2天,将VSV-SARS-CoV-2-S在冰上解冻,并用感染培养基1:1稀释。

[0311] 在V型底96孔板中,在60 μ L感染培养基中产生每种上清液的稀释液。对于培养基(阴性)对照,将60 μ L的经过稀释的条件培养基添加到孔。除培养基对照孔外,向每个孔添加60 μ L的经过稀释的VSV-SARS-CoV-2-S。向这些孔添加60 μ L的感染培养基。然后将假病毒与上清液稀释液在室温下一起温育30分钟。将培养基从Vero细胞板去除,将100 μ L的上清液/假病毒混合物转移到细胞,并将板在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下温育24小时。1:4和1:20(并且针对一些样品,1:100)的最终上清液稀释度用于评估VSV-SARS-CoV-2-S假病毒的中和。

[0312] 在第3天,在温育24小时后,将上清液从细胞孔去除,并用100 μ L的PBS置换。然后在带有MiniMax成像细胞仪的SpectraMax i3上对板进行读取。

[0313] 使用中和荧光聚焦测定评估抗SARS-CoV-2-S抗体中和基于VSV的表达SARS-CoV-2-S的假型化病毒的能力。三个测定的结合结果总结如下。与模拟上清液对照相比,每种稀释度下的抗体的中和效力表示为百分比。所有抗体展现出中和能力,并且特别是对于以1:100评价的一组抗体,示出较高中和的抗体可以表示更有效的中和能力。

[0314] 表6:VLP的中和

| | 上清液 | 中和 (1:4 稀释度) | 中和 (1:20 稀释度) | 中和 (1:100 稀释度) |
|--------|----------|--------------|---------------|----------------|
| [0315] | mAb10913 | 99.5 | 95.5 | 69.1 |
| | mAb10914 | 94.2 | 74.8 | 43.6 |
| | mAb10915 | 96.7 | 74.2 | 29.6 |
| | mAb10932 | 99.8 | 94.6 | 68 |
| | mAb10933 | 99.8 | 98.9 | 88.4 |
| | mAb10934 | 99.9 | 99.8 | 98.4 |
| | mAb10935 | 99.6 | 98.5 | 88.8 |
| | mAb10936 | 99.7 | 99.1 | 92.9 |
| | mAb10937 | 97.5 | 87.7 | 56.3 |
| | mAb10920 | 99.5 | 95.5 | 69.1 |
| | mAb10921 | 98.2 | 91.4 | 46.1 |
| | mAb10922 | 99.8 | 99.1 | 88.4 |
| | mAb10923 | 99.5 | 92.9 | 67.7 |
| | mAb10924 | 98.1 | 85.4 | 55.2 |
| | mAb10930 | 99.1 | 91.1 | 59 |
| | mAb10938 | 98.1 | 83 | 54.2 |
| | mAb10939 | 98.6 | 90.5 | 64 |
| | mAb10940 | 97 | 89.9 | 66.4 |
| | mAb10941 | 98.9 | 92.9 | 73.8 |
| | mAb10982 | 97.4 | 83.8 | 44.5 |
| | mAb10984 | 99.8 | 95.1 | 83.4 |
| | mAb10985 | 99.7 | 88.4 | 63.5 |
| | mAb10986 | 99.7 | 98 | 86 |
| | mAb10987 | 99.3 | 97.7 | 94.6 |
| | mAb10988 | 97.6 | 87.6 | 62.2 |
| | mAb10989 | 100 | 99.8 | 98.2 |
| | mAb10969 | 97.2 | 91 | 63.7 |
| | mAb10970 | 99.6 | 96.7 | 82.4 |
| [0316] | mAb10971 | 99.5 | 97 | 73.9 |
| | mAb10964 | 99.7 | 99.7 | 94.1 |
| | mAb10965 | 98.5 | 87.6 | 68.6 |
| | mAb10966 | 99.5 | 95.5 | 76.2 |
| | mAb10967 | 98.9 | 91.4 | 69.2 |
| | mAb10954 | 99.8 | 96 | 70.7 |
| | mAb10955 | 98.8 | 88.6 | 62.7 |
| | mAb10956 | 97.1 | 84.1 | 61.6 |
| | mAb10957 | 97.6 | 76.4 | 48 |
| | mAb10977 | 95.5 | 79 | 47.7 |
| | mAb11010 | 85 | 54 | NT |
| | mAb11004 | 77 | 40 | NT |
| | mAb11000 | 98 | 82 | NT |
| | mAb11006 | 91 | 54 | NT |
| | mAb11008 | 96 | 77 | NT |
| | mAb10998 | 88 | 59 | NT |
| | mAb10996 | 85 | 58 | NT |
| | mAb11002 | 35 | -1 | NT |

[0317] *NT: 未测试到

[0318] 实施例6: 抗体在抗体依赖性细胞介导的毒性替代测定中的表征

[0319] 在使用报告基因细胞和与抗体结合的靶细胞的替代生物测定中测量了靶向SARS-CoV-2纤突蛋白的抗体与Fc γ R3a (在自然杀伤(NK)细胞上显著表达的Fc受体, 其诱导抗体

依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 相互作用的能力。这个测定使用的是被工程化成在转录因子NFAT (NFAT-Luc) 以及高亲和力人Fc γ R3a¹⁷⁶Val同种异型受体 (Jurkat/NFAT-Luc/hFc γ R3a¹⁷⁶Val) 的控制下表达报告基因萤光素酶的Jurkat T细胞。靶细胞是工程化的表达人CD20的Jurkat T细胞 (用作与靶向CD20的人IgG1抗体的阳性对照) 和受强力霉素诱导型启动子控制的全长SARS-CoV-2纤突蛋白。将报告基因细胞与靶细胞一起温育, 并且Fc γ R3a通过与靶细胞结合的人IgG1抗体的Fc结构域的结合导致报告基因细胞中的转录因子NFAT活化并驱动萤光素酶的表达, 然后通过发光读数对所述萤光素酶的表达进行测量。

[0320] Jurkat T细胞被工程化成组成型表达全长人CD20 (NCBI登录号为NP_690605.1的氨基酸M1-P297)、Tet3G反式活化蛋白 (使用Takara pEF1 α -Tet3G载体克隆的, 目录号631167) 以及强力霉素诱导型全长SARS-CoV-2纤突蛋白 (NCBI登录号YP_009724390.1的氨基酸M1-T1273)。对工程化的表达Jurkat/Tet3G/hCD20/SARS-CoV2纤突蛋白的细胞进行分选以使纤突蛋白进行高表达, 并且随后维持在RPMI+10%无Tet的FBS+P/S/G+500 μ g/ml G418+1 μ g/ml嘌呤霉素+250 μ g/ml潮霉素生长培养基中。

[0321] Jurkat T细胞被工程化成稳定表达经活化的T细胞的核因子 (NFAT) 萤光素酶报告基因构建体以及高亲和力人Fc γ R3a¹⁷⁶Val同种异型受体 (NCBI登记号P08637 VAR_003960的氨基酸M1-K254)。将工程化报告基因细胞维持在RPMI1640+10% FBS+P/S/G+0.5 μ g/ml嘌呤霉素+500 μ g/ml G418生长培养基中。

[0322] 在开始替代ADCC测定之前的36小时, 在含1 μ g/ml强力霉素的RPMI+10%无Tet的FBS+P/S/G细胞培养基 (西格玛公司 (Sigma)) 中诱导 5×10^5 个靶细胞/ml。实验前一天, 将报告基因细胞在RPMI 1640+10% FBS+P/S/G+0.5 μ g/ml嘌呤霉素+500 μ g/ml G418生长培养基中分裂成 7.5×10^5 个细胞/ml的密度。

[0323] 简而言之, 在实验当天, 将靶细胞和报告基因细胞转移到测定培养基 (RPMI+10%无Tet的FBS+P/S/G) 中, 并以3:2的比率 (3×10^4 个靶细胞/孔和 2×10^4 个报告基因细胞/孔) 添加到384孔白色微量滴定板中, 然后添加不同浓度的抗SARS-CoV-2-S抗体上清液。每个板上包含阳性对照 (带有人IgG1的CD20抗体) 样品和不含抗体的阴性对照样品以使抗SARS-CoV-2-S抗体上清液的检测到的ADCC活性归一化。将板在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下温育5小时, 然后添加等体积的ONE-GloTM (普洛麦格公司 (Promega)) 试剂以裂解细胞并检测萤光素酶活性。在多标签读板仪Envision (珀金埃尔默公司 (PerkinElmer)) 上以相对光单位 (RLU) 捕获发射的光, 并使用以下等式对数据进行分析和归一化:

$$[0324] \quad \text{ADCC活性 (\%)} = 100 \times \frac{\text{平均RLU (测试样品)} - \text{平均RLU (背景信号)}}{\text{平均RLU (阳性对照)} - \text{平均RLU (背景信号)}}$$

[0325] 抗SARS-COV-2-S抗体活化Fc γ R3a受体的能力在替代ADCC测定中通过将Jurkat/NFAT-Luc/Fc γ R3a¹⁷⁶Val用作报告基因细胞并将Jurkat/hCD20/SARS-CoV2纤突用作靶细胞进行了评价。测试的每个抗体含有IgG1结构域。

[0326] 表7汇总了结果, 其示出了原始萤光素酶活性, 并且指示了计算出的阳性对照的%。观察到一定范围的ADCC活性%, 这表明抗体上清液使Fc γ R3a活化。所有样品展现出替代ADCC活性的某种度量, 并且抗体上清液中的10个抗体上清液展现出的替代ADCC活性比在阳性对照中观察到的更好。

[0327] 表7: 抗SARS-CoV-2-S抗体上清液的ADCC替代活性。

| | mAb | ADCC 平均 RLU | ADCC (活性 (%)) |
|--------|----------|-------------|---------------|
| | mAb10913 | 11,480 | 111.9 |
| | mAb10914 | 21,960 | 265.8 |
| | mAb10915 | 14,280 | 153 |
| | mAb10932 | 13,020 | 108.8 |
| | mAb10933 | 9,740 | 68.5 |
| | mAb10934 | 11,680 | 92 |
| | mAb10935 | 11,540 | 90.4 |
| | mAb10936 | 15,160 | 133.8 |
| [0328] | mAb10937 | 12,340 | 100.1 |
| | mAb10920 | 15,480 | 137.8 |
| | mAb10921 | 10,080 | 67.7 |
| | mAb10922 | 9,140 | 56.3 |
| | mAb10923 | 13,340 | 107.1 |
| | mAb10924 | 7,220 | 33 |
| | mAb10930 | 8,900 | 53.4 |
| | mAb10938 | 12,960 | 102.5 |
| | mAb10939 | 9,440 | 59.7 |
| | mAb10940 | 12,520 | 106.2 |
| | mAb10941 | 10,340 | 77.2 |
| | mAb10982 | 7,900 | 59.4 |
| | mAb10984 | 6780 | 6.8 |
| | mAb10985 | 5840 | 2.8 |
| | mAb10986 | 6200 | 4.4 |
| | mAb10987 | 12020 | 29.4 |
| | mAb10988 | 7200 | 8.7 |
| | mAb10989 | 10200 | 21.5 |
| | mAb10969 | 10500 | 23.1 |
| [0329] | mAb10970 | 7640 | 10.6 |
| | mAb10971 | 7480 | 10 |
| | mAb10964 | 6380 | 5.1 |
| | mAb10965 | 6780 | 6.9 |
| | mAb10966 | 7080 | 10.4 |
| | mAb10967 | 6740 | 8.6 |
| | mAb10954 | 6940 | 9.8 |
| | mAb10955 | 6740 | 8.7 |
| | mAb10956 | 6760 | 8.8 |
| | mAb10957 | 7120 | 10.8 |
| | mAb10977 | 12980 | 33.8 |

[0330] 实施例7:抗SARS-CoV-2-S抗体结合特异性测定

[0331] 进行路明克斯 (Luminex) 结合测定以测定抗SARS-COV-2-S抗体与一组抗原的结合。对于这个测定,将抗原通过链霉亲和素胺偶联或捕获到路明克斯微球,如下:将大约1千万个MagPlex微球(路明克斯公司(Luminex Corp.),MagPlex微球,目录号MC10000和MC12000)通过在pH 6.2的500 μ L 0.1M NaPO₄(活化缓冲液)中涡旋而重新悬浮并且然后离心以去除上清液。因为微球对光敏感,所以使其避光。将微球重新悬浮于160 μ L的活化缓冲

液中,并将羧酸酯基团(-COOH)通过添加20 μ L的50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific),目录号24525)、然后添加20 μ L的50mg/mL 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺(EDC,赛默飞世尔科技公司,目录号22980)在25 $^{\circ}$ C下活化。10分钟后,通过添加pH 5的600 μ L 50mM MES(偶联缓冲液)将反应的pH降低到5.0,并将微球涡旋并离心以去除上清液。将经活化的微球立即与500 μ L的含25 μ g/mL的蛋白质抗原或链霉亲和素的偶联缓冲液混合,并在25 $^{\circ}$ C下温育两小时。将偶联反应通过添加pH 8.0的50 μ L的1M Tris-HCl淬灭,并将微球涡旋、离心并用800 μ L的0.005% PBS(吐温(Tween) 20 0.05%)洗涤三次,以去除未偶联的蛋白质和其他反应组分。将微球以1千万个微球/mL重新悬浮于1mL的PBS 2% BSA 0.05%叠氮化钠中。为了对抗原进行链霉亲和素捕获,将500 μ L的含12.5 μ g/mL的生物素化蛋白的PBS溶液添加到链霉亲和素偶联的微球并在25 $^{\circ}$ C下温育一小时。将微球涡旋、离心并用800 μ L的PBS洗涤三次,并且然后使用500 μ L的含30mM生物素(密理博西格玛公司(Millipore-Sigma),目录号B4501)的pH 8.0的0.15M Tris阻断。将微球温育30分钟,然后涡旋、离心并用800 μ L的PBS洗涤三次。将微球以1千万个微球/mL重新悬浮于1mL的PBS 2% BSA 0.05%叠氮化钠中。

[0332] 将用于不同蛋白质和生物素化蛋白的微球以2700个珠粒/ml混合,并将75 μ L的微球平板接种在96孔ProcartaPlex平底板(赛默飞世尔科技公司,目录号:EPX-44444-000)的每个板中,并与25 μ L的含有抗体的单独的抗SARS-CoV-2上清液混合。将样品和微球在25 $^{\circ}$ C温育两小时,并且然后用200 μ L的含有0.05%吐温20的DPBS洗涤两次。为了检测抗体与单独的微球结合的水平,添加100 μ L的含2.5 μ g/mL R-藻红蛋白偶联的山羊F(ab')₂抗人 κ (南方生物技术公司(Southern Biotech),目录号2063-09)的阻断缓冲液(用于含有鼠Fc区的抗体)或100 μ L的含1.25 μ g/mL F(ab')₂片段特异性的R-藻红蛋白亲和纯化F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(杰克逊免疫研究实验室有限公司,目录号:115-116-072)的阻断缓冲液(用于含有人Fc区的抗体),并将其在25 $^{\circ}$ C下温育30分钟。30分钟后,将样品用200 μ L的洗涤缓冲液洗涤两次,然后重新悬浮于150 μ L的洗涤缓冲液中。在路明克斯FlexMap 3DB(路明克斯公司)和路明克斯xPonent β 软件版本4.3(路明克斯公司)中对板进行读取。测定中使用的SARS-CoV-2蛋白如下:

[0333] RBD_(R319-F541).mmh:SEQ ID NO:829

[0334] RBD_(R319-F541).mFc:SEQ ID NO:830

[0335] RBD_(R319-F541).hFc:SEQ ID NO:831

[0336] 路明克斯结合的结果在表8和表9中示出为中值荧光强度(MFI)信号强度。结果示出46个抗SARS-CoV-2-S抗体上清液与SARS-CoV-2-SRBD蛋白特异性结合。这些结果还示出这些抗体中的五个抗体与SARS冠状病毒纤突RBD蛋白交叉反应,其结合信号大于1000MFI。

[0338]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| mAb10913 | 30709 | 29247 | 16645 | 33023 | 27452 | 31929 | 31561 | 18899 | 24931 | 35 | 39 | 21 | 20 | 26 | 14 | 34 | 26 | 29 | 28 | 29 |
| mAb10914 | 31967 | 29650 | 15986 | 30740 | 25957 | 30464 | 30591 | 14914 | 21609 | 47 | 39 | 22 | 19 | 28 | 15 | 31 | 23 | 86 | 71 | 49 |
| mAb10915 | 31795 | 30293 | 20062 | 31772 | 30625 | 32437 | 31267 | 17595 | 22917 | 42 | 40 | 21 | 18 | 23 | 15 | 31 | 24 | 86 | 91 | 56 |
| mAb10932 | 29984 | 30133 | 17697 | 30640 | 26220 | 30559 | 29880 | 17627 | 22099 | 34 | 26 | 19 | 14 | 19 | 12 | 26 | 19 | 60 | 49 | 40 |
| mAb10933 | 33356 | 32090 | 19383 | 34944 | 30110 | 35106 | 34484 | 21178 | 27509 | 39 | 31 | 18 | 14 | 19 | 14 | 24 | 17 | 22 | 21 | 26 |
| mAb10934 | 33797 | 32649 | 21238 | 34325 | 33016 | 35841 | 33636 | 20643 | 27483 | 38 | 27 | 18 | 15 | 18 | 10 | 24 | 20 | 77 | 68 | 47 |
| mAb10935 | 34853 | 32603 | 19328 | 35886 | 31444 | 35611 | 35037 | 19991 | 25554 | 37 | 25 | 21 | 15 | 18 | 14 | 25 | 17 | 74 | 67 | 42 |
| mAb10936 | 33947 | 32305 | 21636 | 33740 | 32810 | 33912 | 33613 | 19487 | 25187 | 46 | 36 | 20 | 19 | 21 | 13 | 29 | 20 | 32 | 26 | 32 |
| mAb10937 | 33866 | 32225 | 19689 | 34233 | 31501 | 34624 | 33878 | 19553 | 26404 | 44 | 50 | 21 | 19 | 26 | 14 | 27 | 22 | 21 | 23 | 29 |
| mAb10920 | 34842 | 34440 | 20254 | 36415 | 31708 | 36828 | 36277 | 21085 | 28516 | 59 | 68 | 26 | 24 | 30 | 13 | 39 | 27 | 38 | 35 | 44 |
| mAb10921 | 24977 | 23596 | 11307 | 19429 | 18186 | 22306 | 21766 | 8959 | 12212 | 35 | 31 | 19 | 19 | 19 | 12 | 23 | 18 | 55 | 44 | 39 |
| mAb10922 | 31768 | 30755 | 18629 | 32355 | 27854 | 33609 | 31376 | 18287 | 24678 | 36 | 41 | 18 | 19 | 18 | 9 | 29 | 22 | 20 | 21 | 24 |
| mAb10923 | 35208 | 34289 | 19593 | 37372 | 33555 | 37756 | 36324 | 22502 | 28855 | 53 | 66 | 29 | 23 | 36 | 14 | 37 | 25 | 24 | 29 | 39 |
| mAb10924 | 29730 | 27987 | 17044 | 28308 | 26898 | 28744 | 28423 | 15672 | 20577 | 41 | 30 | 18 | 17 | 19 | 12 | 29 | 22 | 19 | 22 | 28 |
| mAb10930 | 25119 | 25131 | 16563 | 28560 | 25922 | 28870 | 28744 | 16530 | 21151 | 42 | 49 | 19 | 16 | 20 | 14 | 27 | 22 | 29 | 24 | 29 |
| mAb10938 | 29409 | 27069 | 17205 | 30533 | 24638 | 29593 | 29134 | 15431 | 21163 | 38 | 36 | 19 | 16 | 19 | 13 | 25 | 20 | 86 | 65 | 46 |
| mAb10939 | 32196 | 30883 | 18746 | 33900 | 28857 | 32864 | 32472 | 18171 | 23928 | 38 | 50 | 19 | 16 | 18 | 14 | 27 | 19 | 41 | 27 | 30 |
| mAb10940 | 35221 | 35290 | 21000 | 35978 | 30675 | 36507 | 34945 | 21350 | 25807 | 32 | 28 | 20 | 15 | 18 | 11 | 22 | 19 | 18 | 21 | 25 |
| mAb10941 | 32392 | 31171 | 20428 | 34061 | 28431 | 33347 | 33232 | 19668 | 26738 | 45 | 37 | 22 | 19 | 22 | 15 | 30 | 24 | 82 | 69 | 47 |
| mAb10982 | 24263 | 22180 | 12278 | 23296 | 19935 | 23020 | 23066 | 10847 | 14017 | 30 | 54 | 24 | 17 | 21 | 13 | 29 | 20 | 64 | 60 | 42 |
| mAb10984 | 27854 | 26197 | 17054 | 28350 | 22479 | 28442 | 27808 | 15590 | 19245 | 33 | 31 | 22 | 21 | 25 | 13 | 29 | 20 | 237 | 341 | 172 |
| mAb10985 | 30214 | 27854 | 15488 | 29443 | 24827 | 31054 | 28936 | 16219 | 20787 | 31537 | 32343 | 22721 | 18 | 28 | 14 | 31 | 22 | 168 | 195 | 159 |
| mAb10986 | 27187 | 25196 | 15921 | 28407 | 23388 | 27693 | 27693 | 16034 | 19061 | 39 | 38 | 21 | 15 | 19 | 14 | 27 | 20 | 233 | 286 | 184 |
| mAb10987 | 32171 | 29074 | 16736 | 33115 | 26059 | 32757 | 31238 | 17465 | 23089 | 33 | 27 | 22 | 15 | 23 | 15 | 28 | 23 | 196 | 235 | 172 |
| mAb10988 | 23858 | 22160 | 12659 | 26095 | 21793 | 24822 | 23949 | 12910 | 16208 | 41 | 67 | 25 | 17 | 29 | 14 | 32 | 25 | 169 | 181 | 130 |
| mAb10989 | 17687 | 17286 | 11189 | 19568 | 16117 | 22435 | 19316 | 12263 | 14234 | 47 | 73 | 21 | 16 | 22 | 11 | 24 | 19 | 161 | 206 | 186 |
| mAb10969 | 29550 | 27587 | 15391 | 31386 | 26565 | 31042 | 30950 | 18466 | 23959 | 37 | 34 | 20 | 16 | 20 | 11 | 26 | 19 | 21 | 22 | 29 |
| mAb10970 | 33154 | 31662 | 20184 | 34739 | 29182 | 34991 | 34704 | 21047 | 24625 | 38 | 25 | 19 | 14 | 16 | 15 | 23 | 17 | 35 | 23 | 28 |
| mAb10971 | 29355 | 28850 | 16660 | 28746 | 24602 | 30032 | 29848 | 16986 | 21579 | 32 | 31 | 20 | 15 | 13 | 13 | 20 | 19 | 44 | 29 | 24 |
| mAb10964 | 31754 | 28907 | 19225 | 32420 | 27736 | 33074 | 32317 | 18650 | 24154 | 19999 | 23855 | 5186 | 15 | 17 | 13 | 20 | 19 | 19 | 22 | 26 |
| mAb10965 | 30812 | 26863 | 13707 | 27139 | 23351 | 29618 | 28034 | 14133 | 18864 | 30 | 23 | 16 | 19 | 20 | 12 | 26 | 23 | 58 | 53 | 43 |

[0339]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| mAb10966 | 30939 | 27440 | 17905 | 30363 | 25115 | 30778 | 29869 | 16403 | 23308 | 35 | 21 | 20 | 16 | 16 | 12 | 24 | 16 | 56 | 53 | 42 |
| mAb10967 | 28453 | 26496 | 16771 | 29650 | 24263 | 28660 | 28061 | 15776 | 21869 | 35 | 30 | 21 | 17 | 19 | 13 | 23 | 21 | 61 | 71 | 45 |
| mAb10954 | 30410 | 28281 | 18394 | 31284 | 24677 | 31768 | 29604 | 16626 | 21270 | 30 | 26 | 15 | 17 | 16 | 10 | 18 | 21 | 57 | 61 | 41 |
| mAb10955 | 29627 | 28476 | 16785 | 30790 | 24689 | 31227 | 31054 | 17858 | 22675 | 36 | 21 | 14 | 15 | 18 | 16 | 20 | 19 | 57 | 48 | 42 |
| mAb10956 | 27900 | 25690 | 12891 | 28349 | 24505 | 30225 | 28810 | 15013 | 19981 | 32 | 24 | 16 | 15 | 16 | 13 | 22 | 24 | 58 | 49 | 41 |
| mAb10957 | 23411 | 20615 | 10566 | 18692 | 16725 | 22560 | 20258 | 8451 | 11989 | 32 | 22 | 16 | 15 | 18 | 11 | 22 | 19 | 40 | 29 | 28 |
| mAb10977 | 16770 | 14605 | 8845 | 13827 | 12774 | 15216 | 16783 | 6476 | 9406 | 36 | 28 | 23 | 17 | 19 | 13 | 24 | 21 | 17 | 20 | 25 |

[0341]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|------|----|----|----|----|----|-----|-----|----|
| mAb11010 | 11024 | 12885 | 9349 | 14432 | 15688 | 8880 | 9628 | 5136 | 10794 | 18276 | 16793 | 7421 | 7 | 14 | 14 | 19 | 18 | 134 | 28 | 28 |
| mAb11004 | 3350 | 11337 | 4299 | 4583 | 7625 | 4877 | 6905 | 4482 | 9526 | 5524 | 740 | 33 | 15 | 20 | 12 | 26 | 17 | 228 | 24 | 25 |
| mAb11000 | 17802 | 10971 | 11335 | 23007 | 11593 | 22316 | 5671 | 9356 | 5415 | 39 | 31 | 18 | 13 | 19 | 9 | 27 | 17 | 384 | 82 | 49 |
| mAb11006 | 5134 | 4744 | 1396 | 2866 | 3812 | 3985 | 3749 | 2052 | 1037 | 615 | 667 | 339 | 18 | 17 | 13 | 15 | 18 | 156 | 16 | 24 |
| mAb11008 | 4047 | 3178 | 3047 | 4260 | 4106 | 2570 | 2311 | 6880 | 1419 | 120 | 174 | 31 | 18 | 16 | 15 | 20 | 18 | 45 | 19 | 32 |
| mAb10998 | 1847 | 3837 | 2228 | 2230 | 467 | 1740 | 2005 | 724 | 717 | 29 | 37 | 16 | 19 | 18 | 14 | 24 | 19 | 48 | 29 | 32 |
| mAb10996 | 9142 | 2906 | 4319 | 8738 | 5398 | 2084 | 16101 | 1425 | 6232 | 1355 | 1279 | 28 | 13 | 21 | 14 | 26 | 18 | 185 | 132 | 95 |
| mAb11002 | 11558 | 10181 | 2197 | 9530 | 5471 | 9382 | 8461 | 1107 | 2867 | 80 | 56 | 31 | 10 | 22 | 13 | 25 | 18 | 288 | 52 | 32 |

[0342] 实施例8:抗SARS-CoV-2-S抗体多样性测定

[0343] 进行结合测定以测定抗SARS-COV-2-S抗体的结合曲线。对于这个测定,如上文针

对路明克斯结合测定所描述的,抗原是胺偶联的。简而言之,将用于16个不同珠粒区的大约9百万个MagPlex微球(路明克斯公司, MagPlex微球, 目录号MagPlex MC10000和MC12000)通过在pH6.2的500 μ L 0.1M NaPO₄中涡旋而重新悬浮并且然后离心以去除上清液。将微球重新悬浮于160 μ L的活化缓冲液中,并将羧酸酯基团(-COOH)通过添加20 μ L的50mg/mL N-羧基琥珀酰亚胺(NHS, 赛默飞世尔科技公司, 目录号24525)、然后添加20 μ L的50mg/mL 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺(EDC, 赛默飞世尔科技公司, 目录号22980)在25 $^{\circ}$ C下活化。10分钟后,通过添加pH 5的600 μ L的50mM MES(偶联缓冲液)将反应的pH降低到5.0,并将微球涡旋并离心以去除上清液。将经活化的微球立即与500 μ L的含20 μ g/mL的SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD) (R319-F541) -mmH的偶联缓冲液混合,并在25 $^{\circ}$ C下温育两小时。将偶联反应通过添加pH 8.0的50 μ L的1M Tris-HCl淬灭,并将微球涡旋、离心并用1000 μ L的PBS洗涤三次。将微球以9百万个微球/mL重新悬浮于250 μ L的PBS中。

[0344] 对16个含有胺偶联的蛋白质的微球区中的15个微球区进行如下修饰以进行结合测定:将微球用PBS 5% DMSO洗涤两次,并将500 μ l的化学品或酶按照制造建议溶解并以10nM添加到上文所描述的胺偶联的微球。随后将其涡旋并在室温下旋转温育2小时。用PBS 2% BSA洗涤微球3次。将微球以9百万个微球/mL重新悬浮于1mL的PBS中。

[0345] 将经蛋白质修饰的微球和未经蛋白质修饰的(完整的)微球以2700个珠粒/ml混合,并将75 μ L的微球平板接种在96孔ProcartaPlex 96孔平底板(赛默飞世尔科技公司, 目录号:EPX-44444-000)的每个板中,并与25 μ L的含有抗体的单独的抗SARS-CoV-2-S上清液混合。将样品和微球在25 $^{\circ}$ C下温育两小时,并且然后用200 μ L的含有0.05%吐温20的DPBS洗涤两次。为了检测抗体与单独的微球结合的水平,添加100 μ L的含2.5 μ g/mL R-藻红蛋白偶联的山羊F(ab')₂抗人 κ (南方生物技术公司, 目录号2063-09)的阻断缓冲液(用于含有hFc的抗体)或100 μ L的含1.25 μ g/mL F(ab')₂片段特异性的R-藻红蛋白亲和纯化F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(杰克逊免疫研究实验室有限公司, 目录号115-116-072)的阻断缓冲液(用于含有mFc的抗体)或100 μ L的含1.25 μ g/mL R-藻红蛋白抗His(生物传奇公司(Biolegend), 目录号362603)的阻断缓冲液(用于ACE-2对照,R&D, 目录号933-ZN),并将其在25 $^{\circ}$ C下温育30分钟。30分钟后,将样品用200 μ l的洗涤缓冲液洗涤两次,然后重新悬浮于150 μ l的洗涤缓冲液中。在FlexMap3D[®](路明克斯公司)和路明克斯xPonent[®]软件版本4.3(路明克斯公司)中对板进行读取。

[0346] 路明克斯分箱的结果在表10中示出为中值荧光强度(MFI)信号强度。为了确定簇,相对于完整蛋白质(未经修饰的微球)对数据进行归一化并聚类。将46种抗SARS-CoV-2抗体分类为含有2种或更多种抗体的9个簇,并将11种抗体分类为单个节点。基于层次聚类和树状图的这些结果来分配簇。这些结果示出46种抗SARS-CoV-2-S抗体上清液具有不同的结合特性和曲线,这表明收集了与SARS-CoV-2纤突蛋白上的不同表位结合的抗体。

[0347]

表 10: 抗 SARS-CoV-2-S 单克隆抗体与 SARS-CoV-2-S RBD.mmH (未经修饰的和经化学或酶修饰的) 的结合信号 (MFI) 和簇分配

| 样品 | 簇 | 未经修饰的 SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RB D) (R319-F541).mmH | MOD1 | MOD2 | MOD3 | MOD4 | MOD5 | MOD6 | MOD7 | MOD8 | MOD9 | MOD10 | MOD11 | MOD12 | MOD13 | MOD14 | MOD15 |
|------------------|---|--|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 人_ ACE2 (10 nM) | 1 | 873 | 5119 | 1852 | 5106 | 202 | 5408 | 5013 | 36 | 4500 | 4091 | 4618 | 4505 | 5094 | 4743 | 3173 | |
| 人_ ACE2 (100 nM) | 1 | 10681 | 10320 | 2260 | 9661 | 559 | 9593 | 8624 | 36 | 6212 | 7922 | 8440 | 8957 | 8948 | 7927 | 5370 | |
| 人_ ACE2 (50 nM) | 1 | 9269 | 8238 | 2185 | 7707 | 391 | 7859 | 7577 | 35 | 5518 | 6447 | 7064 | 7233 | 7600 | 7112 | 4407 | |
| mAb10969 | 3 | 28551 | 54 | 24177 | 425 | 26049 | 3546 | 20577 | 23878 | 154 | 18918 | 24407 | 22409 | 24269 | 23672 | 14196 | |
| mAb10965 | 3 | 28080 | 38 | 21996 | 135 | 25727 | 3250 | 22419 | 24062 | 110 | 19061 | 22355 | 21414 | 25635 | 23144 | 14072 | |
| mAb10913 | 4 | 31694 | 102 | 28389 | 23270 | 29344 | 5018 | 28738 | 27854 | 15939 | 28645 | 27110 | 28878 | 31159 | 28971 | 27784 | 26272 |
| mAb10920 | 4 | 35534 | 162 | 26783 | 28090 | 32185 | 7105 | 32942 | 30958 | 17228 | 32758 | 31463 | 31910 | 35144 | 32185 | 32323 | 29949 |
| mAb10923 | 4 | 38711 | 153 | 32305 | 33866 | 36082 | 7540 | 35335 | 33924 | 20961 | 34187 | 33809 | 36323 | 38596 | 35381 | 33338 | 33131 |
| mAb10930 | 4 | 29502 | 110 | 21579 | 21533 | 27843 | 6195 | 26600 | 25103 | 10235 | 23744 | 24516 | 26738 | 27958 | 26968 | 25126 | 23951 |
| mAb10940 | 4 | 38871 | 94 | 34337 | 33453 | 36690 | 7817 | 36128 | 34544 | 14572 | 35967 | 34704 | 36070 | 39285 | 35462 | 34922 | 33614 |
| mAb10989 | 4 | 19671 | 49 | 16697 | 18260 | 15785 | 3369 | 19568 | 15206 | 6136 | 17756 | 15530 | 16838 | 15137 | 17411 | 18100 | 15946 |
| mAb11006 | 4 | 2044 | 30 | 705 | 3773 | 2553 | 517 | 2024 | 2503 | 299 | 2442 | 3749 | 1076 | 4622 | 2818 | 3344 | 3568 |

[0348]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|----|-------|-----|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| mAb10934 | 5 | 33057 | 81 | 27716 | 25092 | 31664 | 6648 | 30801 | 29926 | 6410 | 31261 | 30364 | 30709 | 32873 | 30502 | 28591 | 27785 |
| mAb10924 | 5 | 39205 | 118 | 32707 | 29366 | 36507 | 6378 | 35565 | 34210 | 6594 | 32856 | 33797 | 35875 | 38424 | 34647 | 33476 | 31524 |
| mAb10939 | 5 | 33647 | 62 | 24895 | 26392 | 31390 | 6276 | 31275 | 29594 | 4808 | 28465 | 29444 | 30699 | 33475 | 30596 | 29721 | 27129 |
| mAb10988 | 5 | 23009 | 68 | 15983 | 14842 | 20830 | 3536 | 20176 | 19499 | 2980 | 18329 | 19660 | 20692 | 21770 | 20130 | 18948 | 16558 |
| mAb10957 | 5 | 20879 | 52 | 15728 | 19383 | 19993 | 3582 | 17727 | 17989 | 2171 | 17357 | 19487 | 18596 | 21247 | 18757 | 17810 | 16081 |
| mAb10914 | 6 | 36047 | 143 | 32282 | 26967 | 34199 | 7162 | 32787 | 31823 | 5475 | 31226 | 31467 | 33235 | 35175 | 32626 | 31100 | 29217 |
| mAb10915 | 6 | 36690 | 159 | 32489 | 26427 | 33545 | 9731 | 33568 | 31823 | 9277 | 33442 | 31984 | 32902 | 35462 | 31937 | 32397 | 30009 |
| mAb10932 | 6 | 34024 | 191 | 28833 | 28557 | 31560 | 9946 | 31123 | 29765 | 9711 | 30122 | 29074 | 30433 | 33379 | 30283 | 29880 | 26795 |
| mAb10938 | 6 | 34522 | 174 | 28465 | 19403 | 31252 | 8932 | 29225 | 30918 | 7536 | 28109 | 30308 | 31264 | 33394 | 30814 | 30538 | 27751 |
| mAb10941 | 6 | 36369 | 140 | 31868 | 26129 | 33637 | 9455 | 33154 | 31478 | 7518 | 29802 | 31421 | 33958 | 35290 | 32925 | 31777 | 29159 |
| mAb10984 | 6 | 25759 | 109 | 22445 | 20925 | 24747 | 6880 | 23630 | 23895 | 3527 | 20212 | 22065 | 22318 | 26163 | 23227 | 22283 | 19349 |
| mAb10985 | 6 | 27394 | 99 | 24286 | 22986 | 26151 | 5519 | 25874 | 25023 | 6821 | 23642 | 23572 | 24654 | 27394 | 24677 | 24493 | 20787 |
| mAb10986 | 6 | 25414 | 118 | 20868 | 20557 | 23619 | 6591 | 23066 | 22813 | 2838 | 20672 | 21766 | 21720 | 25207 | 23400 | 22214 | 19694 |
| mAb10977 | 6 | 16980 | 54 | 14108 | 16590 | 15851 | 3505 | 14528 | 12779 | 4005 | 14193 | 12616 | 13320 | 16332 | 13632 | 14312 | 13136 |
| mAb10933 | 7 | 35267 | 69 | 30617 | 5243 | 32665 | 6161 | 32930 | 31043 | 1556 | 27705 | 29926 | 30801 | 34427 | 30409 | 30525 | 24367 |
| mAb10982 | 7 | 27505 | 80 | 20338 | 6650 | 25051 | 4585 | 24178 | 23770 | 1065 | 20361 | 23131 | 23247 | 26412 | 24027 | 23549 | 16765 |
| mAb10987 | 7 | 29327 | 54 | 25311 | 2235 | 27981 | 4110 | 27095 | 25690 | 1444 | 25621 | 25345 | 26335 | 29995 | 27049 | 26082 | 22871 |
| mAb10935 | 8 | 31883 | 81 | 28683 | 12724 | 30329 | 6457 | 27417 | 27785 | 2534 | 26151 | 27958 | 28752 | 30847 | 28522 | 27452 | 24816 |
| mAb10970 | 8 | 32271 | 94 | 26863 | 22547 | 30537 | 7029 | 27679 | 28333 | 1968 | 25233 | 27793 | 27610 | 31869 | 29871 | 26909 | 23775 |
| mAb10971 | 8 | 27415 | 106 | 23890 | 22184 | 27850 | 6869 | 25337 | 25164 | 1598 | 22587 | 25646 | 24384 | 27391 | 25761 | 24774 | 19590 |
| mAb10964 | 8 | 29963 | 122 | 23580 | 23419 | 27896 | 7085 | 27483 | 25968 | 2414 | 24740 | 25658 | 26439 | 29113 | 27243 | 26783 | 22405 |
| mAb10921 | 9 | 31657 | 91 | 28216 | 18123 | 30441 | 6821 | 28629 | 28756 | 941 | 23674 | 27586 | 27367 | 30969 | 28480 | 28331 | 21220 |
| mAb10966 | 9 | 29489 | 85 | 22836 | 19866 | 25736 | 5869 | 24217 | 26013 | 833 | 21800 | 24332 | 24977 | 27440 | 26554 | 24585 | 18580 |
| mAb10967 | 9 | 26784 | 107 | 20787 | 13760 | 25104 | 6192 | 21329 | 23434 | 574 | 19521 | 22352 | 22997 | 25506 | 22641 | 22836 | 17387 |
| mAb10954 | 9 | 28476 | 74 | 21915 | 19038 | 26186 | 5948 | 25299 | 24332 | 929 | 22237 | 24516 | 23457 | 28200 | 24897 | 24539 | 19717 |
| mAb10955 | 9 | 28637 | 39 | 24585 | 21155 | 27912 | 4141 | 23849 | 24862 | 1141 | 22191 | 24805 | 23688 | 27210 | 25575 | 24677 | 18944 |
| mAb10996 | S1 | 3403 | 20 | 5275 | 164 | 5562 | 488 | 3042 | 9125 | 28 | 8940 | 6336 | 6789 | 6229 | 5821 | 3484 | 1312 |
| mAb10937 | S2 | 33561 | 94 | 24890 | 104 | 31164 | 5904 | 30327 | 28675 | 1231 | 27597 | 27092 | 29937 | 32116 | 29661 | 29386 | 20543 |
| mAb10936 | S3 | 32919 | 136 | 26818 | 312 | 31261 | 7856 | 31008 | 29293 | 2916 | 29074 | 28775 | 30813 | 31711 | 29189 | 28522 | 21674 |
| mAb10922 | S4 | 33183 | 102 | 25384 | 1107 | 31348 | 5822 | 31313 | 29386 | 2248 | 29845 | 28629 | 30373 | 32931 | 30625 | 28962 | 23399 |
| mAb11002 | S5 | 9881 | 16 | 3348 | 155 | 8615 | 153 | 9542 | 7562 | 17 | 4144 | 6415 | 6790 | 8465 | 7688 | 6804 | 2016 |
| mAb10956 | S6 | 24562 | 29 | 21685 | 19337 | 23769 | 2275 | 19422 | 21961 | 331 | 16954 | 21282 | 21524 | 26646 | 21547 | 22767 | 15077 |
| mAb11010 | S7 | 6388 | 18 | 4155 | 5441 | 8832 | 384 | 7444 | 5766 | 162 | 5567 | 6718 | 9557 | 12522 | 5287 | 5898 | 4915 |

[0349]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-------|----|------|-------|-------|------|-------|-------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| mAb11008 | S8 | 7096 | 26 | 926 | 1525 | 2776 | 198 | 2750 | 1007 | 60 | 2350 | 2759 | 2824 | 3301 | 2745 | 2130 | 2831 |
| mAb10998 | S9 | 2557 | 18 | 247 | 1336 | 1524 | 104 | 2937 | 723 | 85 | 1611 | 2260 | 1206 | 2513 | 2186 | 727 | 1029 |
| mAb11004 | S10 | 6514 | 18 | 2205 | 604 | 3566 | 1155 | 4522 | 2229 | 71 | 1465 | 12665 | 10667 | 5925 | 5531 | 11578 | 1144 |
| mAb11000 | S11 | 16670 | 19 | 3416 | 12787 | 13493 | 2009 | 17756 | 12409 | 56 | 14151 | 19230 | 17204 | 21718 | 17952 | 17117 | 5151 |

[0350] 实施例9:抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体的Biacore结合动力学

[0351] 使用基于实时表面等离子共振的Biacore T200/Biacore 8K生物传感器测定来

自来自CHOt细胞或来自杂交瘤的初级上清液的不同SARS-CoV-2-S抗体的平衡解离常数(K_D)。所有结合研究在25℃下在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%v/v表面活性剂吐温-20、pH为7.4的(HBS-ET)运行缓冲液中进行。首先将Biacore CM5传感器芯片表面通过与小鼠抗人Fc特异性mAb或兔抗小鼠Fc γ 单克隆抗体(GE,目录号BR-1008-38)进行胺偶联来衍生化以捕获抗SARS-CoV-2抗体。对用C端myc-myc-六组氨酸标签表达的人SARS-CoV-2RBD细胞外结构域(SARS-COV-2RBD-MMH)、用C端小鼠IgG2a表达的SARS-CoV-2RBD细胞外结构域(SARS-COV-2RBD-mFc)或用C端人IgG1(SARS-COV-2RBD-hFc)表达的SARS-CoV-2RBD细胞外结构域进行结合研究。将在HBS-ET运行缓冲液中制备的单一浓度的SARS-COV-2RBD-MMH(100nM);SARS-COV-2RBD-mFc(50nM)或SARS-COV-2RBD-hFc(50nM)以30微升/分钟的流动速率注射1.5分钟,同时在HBS-ET运行缓冲液中监测抗体结合的不同SARS-CoV-2RBD试剂的解离2分钟。在每个循环结束时,使用10秒注射20mM磷酸的小鼠抗人Fc特异性单克隆抗体表面或40秒注射pH 1.5的10mM甘氨酸、HCl的兔抗小鼠Fc γ 特异性多克隆抗体再生SARS-CoV-2RBD抗体捕获表面。通过使用BiaEvaluation软件v3.1或Biacore Insight Evaluation软件v2.0或曲线拟合软件将实时结合传感图拟合到具有传质限制的1:1结合模型来确定结合速率(k_a)和解离速率(k_d)。结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期($t_{1/2}$)是根据动力学速率如下计算的:

[0352] $K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}$, 并且 $t_{1/2} (min) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$

[0353] 不同的SARS-CoV-2单克隆抗体与本发明的不同的抗SARS-COV-2RBD试剂在25℃下结合的结合动力学参数示出于表11和12中。

[0354] 表11: SARS-COV-2RBD-MMH与抗SARS-CoV-2单克隆抗体在25℃结合的结合动力学

| 上清液 | mAb 捕获水平 (RU) | 所结合的 50nM Ag (RU) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) | $t_{1/2}$ (分钟) |
|----------|---------------|-------------------|--------------|-------------|----------|----------------|
| mAb10913 | 2010 | 381 | 4.91E+05 | 2.28E-02 | 4.64E-08 | 0.5 |
| mAb10914 | 3169 | 174 | 3.49E+05 | 1.36E - 02 | 3.89E-08 | 0.8 |
| mAb10915 | 824 | 109 | 8.85E+04 | 3.18E-04 | 3.59E-09 | 36.3 |
| mAb10932 | 2261 | 326 | 8.50E+04 | 1.26E-04 | 1.48E-09 | 92 |
| mAb10933 | 1414 | 428 | 1.05E+06 | 4.08E-03 | 3.88E-09 | 2.8 |
| mAb10934 | 2918 | 981 | 1.01E+06 | 4.35E-03 | 4.32E-09 | 2.7 |
| mAb10935 | 3293 | 694 | 2.11E+05 | 3.99E-03 | 1.89E-08 | 2.9 |
| mAb10936 | 2491 | 717 | 3.03E+05 | 8.81E-04 | 2.91E-09 | 13.1 |
| mAb10937 | 1846 | 504 | 3.81E+05 | 5.73E-03 | 1.50E-08 | 2 |
| mAb10920 | 1295 | 234 | 6.22E+05 | 2.20E - 02 | 3.54E-08 | 0.5 |
| mAb10921 | 1024 | 141 | 9.52E+04 | 4.99E-04 | 5.24E-09 | 23.1 |
| mAb10922 | 2395 | 786 | 3.91E+05 | 2.00E-03 | 5.11E-09 | 5.8 |
| mAb10923 | 1278 | 322 | 2.94E+05 | 6.04E-03 | 2.06E-08 | 1.9 |
| mAb10924 | 766 | 166 | 1.97E+05 | 3.65E-03 | 1.85E-08 | 3.2 |
| mAb10930 | 3137 | 328 | 8.90E+04 | 1.85E-03 | 2.08E-08 | 6.2 |
| mAb10938 | 2167 | 180 | 6.60E+04 | 3.48E-04 | 5.28E-09 | 33.2 |
| mAb10939 | 1505 | 241 | 1.69E+05 | 3.38E-03 | 2.00E-08 | 3.4 |
| mAb10940 | 2149 | 698 | 3.34E+05 | 2.38E-03 | 7.15E-09 | 4.9 |
| mAb10941 | 1811 | 288 | 9.85E+04 | 5.17E-04 | 5.25E-09 | 22.3 |
| mAb10982 | 1096 | 188 | 1.32E+05 | 2.71E-03 | 2.06E-08 | 4.3 |
| mAb10984 | 1654 | 387 | 1.55E+05 | 3.70E-04 | 2.39E-09 | 31.2 |
| mAb10985 | 1974 | 749 | 9.41E+05 | 1.45E-03 | 1.54E-09 | 8 |
| mAb10986 | 1560 | 524 | 3.21E+05 | 2.56E-04 | 7.97E-10 | 45.2 |
| mAb10987 | 1242 | 356 | 4.50E+05 | 1.04E - 02 | 2.32E-08 | 1.1 |
| mAb10988 | 1227 | 291 | 1.27E+06 | 3.52E - 02 | 2.77E-08 | 0.3 |
| mAb10989 | 692 | 257 | 1.60E+06 | 3.14E-03 | 1.96E-09 | 3.7 |
| mAb10969 | 2200 | 427 | 1.80E+05 | 4.71E-03 | 2.61E-08 | 2.5 |
| mAb10970 | 1865 | 438 | 1.37E+05 | 7.99E-04 | 5.82E-09 | 14.4 |
| mAb10971 | 1482 | 358 | 1.68E+05 | 4.49E-04 | 2.67E-09 | 25.8 |
| mAb10964 | 1208 | 460 | 1.06E+06 | 7.56E-04 | 7.14E-10 | 15.3 |
| mAb10965 | 1046 | 168 | 1.19E+05 | 2.73E-03 | 2.28E-08 | 4.2 |
| mAb10966 | 1422 | 343 | 1.57E+05 | 4.40E-04 | 2.81E-09 | 26.3 |
| mAb10967 | 1421 | 175 | 1.12E+05 | 1.08E-04 | 9.66E-10 | 106.9 |
| mAb10954 | 1150 | 338 | 2.34E+05 | 4.05E-04 | 1.73E-09 | 28.5 |
| mAb10955 | 1032 | 199 | 1.38E+05 | 2.69E-03 | 1.95E-08 | 4.3 |
| mAb10956 | 1303 | 184 | 2.02E+05 | 5.31E-03 | 2.62E-08 | 2.2 |
| mAb10957 | 736 | 163 | 1.34E+05 | 3.15E-04 | 2.35E-09 | 36.7 |
| mAb10977 | 221 | 57 | 2.33E+05 | 7.17E-04 | 3.08E-09 | 16.1 |
| mAb11010 | 1027 | 108 | 3.35E+05 | 1.48E-03 | 4.42E-09 | 7.8 |
| mAb11004 | 1111 | 161 | 1.88E+05 | 3.12E-03 | 1.66E-08 | 3.7 |
| mAb11000 | 381 | 16 | 1.40E+05 | 2.41E - 02 | 1.72E-07 | 0.5 |
| mAb11006 | 1118 | 49 | 8.97E+04 | 3.67E-04 | 4.10E-09 | 31.5 |
| mAb11008 | 887 | 56 | 6.73E+04 | 4.00E-03 | 5.94E-08 | 2.9 |
| mAb10998 | 1155 | 69 | 1.95E+05 | 2.28E-02 | 1.17E-07 | 0.5 |
| mAb10996 | 616 | 28 | 1.53E+05 | 1.10E - 02 | 7.18E-08 | 1.1 |
| mAb11002 | 1070 | 8 | 3.21E+05 | 2.54E - 02 | 7.93E-08 | 0.5 |

[0357] 表12: SARS-COV-2 RBD-mFc或SARS-COV-2 RBD-hFc与抗SARS-CoV-2单克隆抗体在25°C下结合的结合动力学

| 上清液 | mAb 捕获水平 (RU) | 所结合的 50nM Ag (RU) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) | $t_{1/2}$ (分钟) |
|----------|---------------|-------------------|--------------|-------------|------------|----------------|
| mAb10913 | 961 | 575 | 6.23E+05 | 1.52E-04 | 2.44E-10 | 76.1 |
| mAb10914 | 1467 | 313 | 1.83E+05 | 1.00E - 05* | 5.47E-11 | 1155* |
| mAb10915 | 392 | 141 | 2.81E+05 | 1.00E - 05* | 3.56E-11 | 1155* |
| mAb10932 | 1060 | 372 | 2.42E+05 | 1.00E - 05* | 4.13E-11 | 1155* |
| mAb10933 | 681 | 465 | 1.23E+06 | 2.12E-04 | 1.73E-10 | 54.4 |
| mAb10934 | 1401 | 949 | 1.41E+06 | 1.17E-04 | 8.32E-11 | 98.3 |
| mAb10935 | 1667 | 830 | 3.83E+05 | 1.00E - 05* | 2.61E-11 | 1155* |
| mAb10936 | 1171 | 699 | 6.52E+05 | 1.00E - 05* | 1.53E-11 | 1155* |
| mAb10937 | 904 | 575 | 6.39E+05 | 7.28E-05 | 1.14E-10 | 158.7 |
| mAb10920 | 617 | 357 | 7.02E+05 | 2.92E-04 | 4.16E-10 | 39.5 |
| mAb10921 | 489 | 170 | 2.66E+05 | 1.00E - 05* | 3.75E-11 | 1155* |
| mAb10922 | 1286 | 828 | 7.19E+05 | 2.42E-05 | 3.36E-11 | 478.2 |
| mAb10923 | 613 | 362 | 6.51E+05 | 2.83E-05 | 4.35E-11 | 407.7 |
| mAb10924 | 465 | 223 | 3.67E+05 | 8.13E-05 | 2.22E-10 | 142.1 |
| mAb10930 | 2156 | 449 | 2.32E+05 | 1.00E - 05* | 4.31E-11 | 1155* |
| mAb10938 | 1363 | 333 | 3.11E+05 | 1.00E - 05* | 3.22E-11 | 1155* |
| mAb10939 | 904 | 324 | 2.99E+05 | 1.15E-05 | 3.87E-11 | 1004.3 |
| mAb10940 | 1508 | 893 | 5.61E+05 | 2.86E-05 | 5.09E-11 | 403.8 |
| mAb10941 | 1132 | 371 | 2.60E+05 | 1.00E - 05* | 2.15E-11 | 1155* |
| mAb10982 | 529 | 236 | 3.10E+05 | 1.69E-05 | 5.44E-11 | 683.6 |
| mAb10984 | 1213 | 573 | 4.02E+05 | 1.00E - 05* | 2.49E-11 | 1155* |
| mAb10985 | 1463 | 1040 | 1.09E+06 | 1.27E-05 | 1.17E-11 | 910.9 |
| mAb10986 | 1168 | 752 | 6.33E+05 | 1.00E - 05* | 1.58E-11 | 1155* |
| mAb10987 | 902 | 632 | 8.20E+05 | 1.70E-04 | 2.08E-10 | 67.8 |
| mAb10988 | 892 | 628 | 1.24E+06 | 3.46E-04 | 2.79E-10 | 33.4 |
| mAb10989 | 505 | 378 | 2.07E+06 | 9.30E-05 | 4.50E-11 | 124.2 |
| mAb10969 | 1658 | 738 | 3.05E+05 | 1.51E-05 | 4.96E-11 | 764 |
| mAb10970 | 1370 | 661 | 3.48E+05 | 1.00E - 05* | 2.88E-11 | 1155* |
| mAb10971 | 1081 | 556 | 3.95E+05 | 1.00E - 05* | 2.53E-11 | 1155* |
| mAb10964 | 875 | 651 | 1.43E+06 | 1.00E - 05* | 7.00E - 12 | 1155* |
| mAb10965 | 762 | 322 | 2.97E+05 | 1.00E - 05* | 3.36E-11 | 1155* |
| mAb10966 | 921 | 430 | 4.02E+05 | 1.00E - 05* | 2.49E-11 | 1155* |
| mAb10967 | 945 | 355 | 3.99E+05 | 1.00E - 05* | 2.51E-11 | 1155* |
| mAb10954 | 734 | 414 | 5.77E+05 | 1.00E - 05* | 1.73E-11 | 1155* |
| mAb10955 | 634 | 292 | 3.96E+05 | 2.34E-05 | 5.92E-11 | 493.6 |
| mAb10956 | 842 | 339 | 3.74E+05 | 1.48E-04 | 3.95E-10 | 78 |
| mAb10957 | 449 | 209 | 3.58E+05 | 1.00E - 05* | 2.79E-11 | 1155* |
| mAb10977 | 161 | 102 | 5.56E+05 | 1.04E-04 | 1.87E-10 | 110.9 |
| mAb11010 | 1014 | 163 | 4.24E+05 | 1.00E - 05* | 2.36E-11 | 1155* |
| mAb11004 | 1101 | 241 | 3.46E+05 | 6.63E-05 | 1.91E-10 | 174.2 |
| mAb11000 | 380 | 61 | 4.38E+05 | 1.83E-03 | 4.17E-09 | 6.3 |
| mAb11006 | 1112 | 75 | 1.88E+05 | 1.00E - 05* | 5.32E-11 | 1155* |
| mAb11008 | 872 | 110 | 1.61E+05 | 1.15E-04 | 7.15E-10 | 100.4 |
| mAb10998 | 1140 | 227 | 3.30E+05 | 5.21E-04 | 1.58E-09 | 22.2 |
| mAb10996 | 629 | 83 | 2.88E+05 | 9.32E-04 | 3.24E-09 | 12.4 |
| mAb11002 | 1068 | 60 | 2.69E+05 | 4.49E-03 | 1.67E-08 | 2.6 |

[0360] *:在实验条件下基于对解离速率常数和解离半衰期进行的测量的极限的估计值。

[0361] 实施例10:通过阻断ELISA来表征抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体

[0362] 开发了基于ELISA的阻断测定以测定抗SARS-CoV-2-S抗体阻断SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域(RBD)与人血管紧张素转化酶2(hACE2)结合的能力。

[0363] 实验中使用的SARS-CoV-2蛋白包含在c端处用人IgG1的Fc部分表达的SARS-CoV-2纤突蛋白(氨基酸Arg319到Phe541)的受体结合结构域(RBD)部分(SARS-CoV-2RBD-hFc;参见NCBI登录号MN908947.3)。实验中使用的人ACE2蛋白购自R&D系统公司(R&Dsystems)并包含具有c端10X组氨酸标签的氨基酸谷氨酰胺18到丝氨酸740(hACE2-His;NCBI登录号Q9BYF1)。

[0364] 使用以下程序进行实验。将单克隆抗五-His抗体(凯杰公司)在PBS中以1 μ g/ml在4 $^{\circ}$ C下涂覆在96孔微量滴定板上过夜。将hACE2-His受体以0.2 μ g/ml添加到PBS中并在室温下结合2小时。随后使用0.5% (w/v)的含BSA的PBS的溶液阻断非特异性结合位点。在其他微量滴定板中,将恒定量的10pM或15pM(如表13中所指示的)的SARS-CoV-2RBD-hFc蛋白与在PBS+0.5% BSA中1:10或1:20稀释的抗体结合。在一小时温育后,将这些抗体-蛋白质复合物转移到涂覆有hACE2-His的微量滴定板。在室温下温育1.5小时后,将孔洗涤,并用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗人IgG抗体(杰克森)检测板结合的SARS-CoV-2RBD-hFc蛋白。然后根据制造商的建议使用TMB底物溶液(BD生物科学公司,目录号555214)对板进行显影,并在Victor X5读板仪上测量450nm处的吸光度。

[0365] 通过计算在存在抗体的情况下与不存在抗体的情况下的固定的SARS-CoV-2-S RBD-hFc浓度的信号的减少%来进行数据分析。在计算中,对于每个板,不存在抗体的恒定的SARS-CoV-2-S RBD-hFc的样品的结合信号被称为100%结合或0%阻断;并且仅不存在SARS-CoV-2RBD-hFc的培养基的样品的基线信号被称为0%结合或100%阻断。

[0366] 使用阻断ELISA形式评估抗SARS-CoV-2-S抗体阻断SARS-CoV-2-SRBD与人ACE2结合的能力。用HRP缀合的抗-hFc抗体检测到单点测试抗体上清液阻断了10pM或15pM SARS-CoV-2-S RBD-hFc与在涂覆在96孔微量滴定板上的抗His抗体上呈递的hACE2-His的结合。

[0367] 三个测定的阻断结果汇总于表13中。指示了SARS-CoV-2-S结合信号(450nm)和G计算的阻断%。对于测试样品,观察到一定范围的阻断。对于在第6列和第7列中指示NA的样品,在第4列和第5列中包含板校正值,因为数据与那些样品发生的单板切换一致。46个抗体上清液中的43个抗体上清液阻断大于50%的SARS-CoV-2-S RBD-hFc与板涂覆的人ACE2的结合,其中所述抗体上清液中的16个抗体上清液阻断>90%的信号。

[0368] 表13:阻断ELISA结果

[0369]

| 上清液 | SARS-CoV-2 RBD 固定浓度 | 上清液稀释度 | 板校正的 SARS-CoV-2 RBD-hFc 与 His 呈递的 ACE2 的结合 (Abs 450nm) | 板校正的 SARS-CoV-2 RBD-hFc 与 His 呈递的 ACE2 的结合的阻断% | SARS-CoV-2 RBD-hFc 与 His 呈递的 ACE2 的结合 (Abs 450nm) | SARS-CoV-2 RBD-hFc 与 His 呈递的 ACE2 的结合的阻断% |
|----------|---------------------|--------|--|--|---|---|
| mAb10913 | 15pM | 1:10 | 0.206 | 80.5 | 0.206 | 80.5 |
| mAb10914 | 15pM | 1:10 | 0.326 | 59.1 | 0.326 | 59.1 |
| mAb10915 | 15pM | 1:10 | 0.171 | 89.7 | 0.171 | 89.7 |
| mAb10932 | 15pM | 1:10 | 0.254 | 57.3 | 0.254 | 57.3 |
| mAb10933 | 15pM | 1:10 | 0.158 | 96.3 | 0.158 | 96.3 |
| mAb10934 | 15pM | 1:10 | 0.209 | 78 | 0.209 | 78 |
| mAb10935 | 15pM | 1:10 | 0.238 | 69.4 | 0.238 | 69.4 |
| mAb10936 | 15pM | 1:10 | 0.234 | 70.6 | 0.234 | 70.6 |

[0370]

| | | | | | | |
|----------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| mAb10937 | 15pM | 1:10 | 0.176 | 88.1 | 0.176 | 88.1 |
| mAb10920 | 15pM | 1:10 | 0.601 | -56.5 | 0.601 | -56.5 |
| mAb10921 | 15pM | 1:10 | 0.192 | 82.7 | 0.192 | 82.7 |
| mAb10922 | 15pM | 1:10 | 0.181 | 86.4 | 0.181 | 86.4 |
| mAb10923 | 15pM | 1:10 | 0.237 | 43.6 | 0.237 | 43.6 |
| mAb10924 | 15pM | 1:10 | 0.175 | 78.2 | 0.175 | 78.2 |
| mAb10930 | 15pM | 1:10 | 0.241 | 42.5 | 0.241 | 42.5 |
| mAb10938 | 15pM | 1:10 | 0.169 | 87.5 | 0.169 | 87.5 |
| mAb10939 | 15pM | 1:10 | 0.204 | 65.6 | 0.204 | 65.6 |
| mAb10940 | 15pM | 1:10 | 0.152 | 95.2 | 0.152 | 95.2 |
| mAb10941 | 15pM | 1:10 | 0.174 | 97.2 | 0.174 | 97.2 |
| mAb10982 | 15pM | 1:10 | 0.195 | 83.5 | 0.195 | 83.5 |
| mAb10984 | 15pM | 1:10 | 0.166 | 96.3 | NA | NA |
| mAb10985 | 15pM | 1:10 | 0.162 | 97 | NA | NA |
| mAb10986 | 15pM | 1:10 | 0.158 | 97.8 | NA | NA |
| mAb10987 | 15pM | 1:10 | 0.243 | 81.8 | NA | NA |
| mAb10988 | 15pM | 1:10 | 0.244 | 84 | 0.244 | 84 |
| mAb10989 | 15pM | 1:10 | 0.155 | 101.8 | 0.155 | 101.8 |
| mAb10969 | 15pM | 1:10 | 0.221 | 87.8 | 0.221 | 87.8 |
| mAb10970 | 15pM | 1:10 | 0.164 | 97.7 | 0.164 | 97.7 |
| mAb10971 | 15pM | 1:10 | 0.17 | 96.7 | 0.17 | 96.7 |
| mAb10964 | 15pM | 1:10 | 0.169 | 96.9 | 0.169 | 96.9 |
| mAb10965 | 15pM | 1:10 | 0.158 | 98.8 | 0.158 | 98.8 |
| mAb10966 | 15pM | 1:10 | 0.157 | 94.2 | 0.157 | 94.2 |
| mAb10967 | 15pM | 1:10 | 0.145 | 97.9 | 0.145 | 97.9 |
| mAb10954 | 15pM | 1:10 | 0.147 | 97.3 | 0.147 | 97.3 |
| mAb10955 | 15pM | 1:10 | 0.162 | 92.7 | 0.162 | 92.7 |
| mAb10956 | 15pM | 1:10 | 0.189 | 84.5 | 0.189 | 84.5 |
| mAb10957 | 15pM | 1:10 | 0.154 | 95.1 | 0.154 | 95.1 |
| mAb10977 | 15pM | 1:10 | 0.315 | 71.5 | 0.315 | 71.5 |
| mAb11010 | 10pM | 1:20 | 0.186 | 82.1 | 0.186 | 82.1 |
| mAb11004 | 10pM | 1:20 | 0.211 | 70 | 0.211 | 70 |
| mAb11000 | 10pM | 1:20 | 0.173 | 72.7 | 0.173 | 72.7 |

| | | | | | | | |
|--------|----------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| [0371] | mAb11006 | 10pM | 1:20 | 0.236 | 58 | 0.236 | 58 |
| | mAb11008 | 10pM | 1:20 | 0.213 | 69.1 | 0.213 | 69.1 |
| | mAb10998 | 10pM | 1:20 | 0.185 | 61.6 | 0.185 | 61.6 |
| | mAb10996 | 10pM | 1:20 | 0.295 | -18.1 | 0.295 | -18.1 |
| | mAb11002 | 10pM | 1:20 | 0.177 | 79.2 | 0.177 | 79.2 |

[0372] 实施例11:通过氢-氘交换质谱法对针对纤突糖蛋白的抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体进行表位作图

[0373] 进行氢-氘交换质谱法 (HDX-MS) 以测定与mAb10989、mAb10987、mAb10934、mAb10933、mAb10920、mAb10922、mAb10936、mAb10954、mAb10964、mAb10977、mAb10984和mAb10986相互作用的SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域 (RBD (氨基酸R319-F541)) 的氨基酸残基。对HDX-MS方法的一般描述在例如以下文献中示出: Ehring (1999) 分析生物化学 (Analytical Biochemistry) 267 (2) :252-259; 以及Engen和Smith (2001) 分析化学 (Anal. Chem.) 73:256A-265A。

[0374] 在集成的HDX/MS平台上进行HDX-MS实验, 所述平台由用于氘标记和淬灭的Leaptec HDX PAL系统、用于样品消化和装载的沃特斯 (Waters) Acquity I级 (Binary溶剂管理器)、用于分析梯度的沃特斯Acquity I级 (二元溶剂管理器) 以及用于肽质量测量的赛默Q Exactive HF质谱仪组成。

[0375] 在pD 7.0下, 将标记溶液制备为D₂O中的PBS缓冲液 (10mM磷酸盐缓冲液、140mM NaCl和3mM KCl, 在25°C下相当于pH 7.4)。为了进行氘标记, 在各个时间点一式两份地将10 μL的RBD蛋白或与上文所列出的12种抗体中的每种抗体预混合的RBD蛋白与90 μL的D₂O标记溶液在20°C下一起温育。对于mAb10989、mAb10987、mAb10934和mAb10933, 时间点分别为0分钟 (非氘代对照)、5分钟和10分钟。对于mAb10920、mAb10922、mAb10936、mAb10954、mAb10964、mAb10977、mAb10984和mAb10986, 时间点分别为0分钟 (非氘代对照) 和10分钟。通过向每份样品添加90 μL的预冷却的淬灭缓冲液 (0.5MTCEP-HCl, 4M尿素和0.5%甲酸) 以在20°C下温育90秒钟来淬灭氘化反应。然后将淬灭的样品注射到Leaptec HDX PAL系统以进行在线胃蛋白酶/蛋白酶XIII消化。将消化的肽通过C18柱 (2.1mm×5mm, 沃特斯) 俘获, 并通过另一个C18柱 (2.1mm×50mm, 沃特斯) 在-5°C下以20分钟梯度 (对于mAb10989、mAb10987、mAb10934和mAb10933) 或以10分钟梯度 (对于mAb10920、mAb10922、mAb10936、mAb10954、mAb10956、mAb10964、mAb10977和mAb10984) 与0%到90%的流动相B溶液 (流动相A溶液: 含0.5%甲酸和4.5%乙腈的水, 流动相B溶液: 含0.5%甲酸的乙腈) 分离。通过赛默Q Exactive HF质谱法以LC-MS/MS或LC-MS模式对洗脱的肽进行分析。

[0376] 使用Byonic搜索引擎 (Protein Metrics) 针对包含RBD蛋白、胃蛋白酶、蛋白酶XIII的氨基酸序列和其反向序列的数据库搜索来自未氘化RBD蛋白样品的LC-MS/MS数据。使用非特异性酶消化和人糖基化作为常见的变量修饰, 将搜索参数设置为默认值。然后将鉴定的肽的列表输入到HDExaminer软件 (版本3.1) 以计算所有氘化样品的氘摄取 (D-摄取) 和氘摄取百分比的差异 (Δ%D)。氘摄取百分比的差异 (Δ%D) 如下计算。

[0377] 氘摄取的差异 (ΔD) = D-摄取 (RBD-mAb) - D-摄取 (单独的RBD)

$$[0378] \quad \text{氘摄取百分比的差异}(\Delta\%D) = \frac{\Delta D}{\text{肽的理论最大}D\text{摄取}} \times 100$$

[0379] 从单独的RBD和与mAb10989样品复合的RBD两者中鉴定出总共190种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为86.06%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， $\Delta\%D$ 值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸467-513(DISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPVRVVVL)(SEQ ID NO:835)的肽显著受mAb10989保护。

[0380] 从单独的RBD和与mAb10987样品复合的RBD两者中鉴定出总共187种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为86.06%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， $\Delta\%D$ 值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸432-452(CVIAWNSNNLDSKVGGNLYL)(SEQ ID NO:836)的肽显著受mAb10987保护。

[0381] 从单独的RBD和与mAb10934样品复合的RBD两者中鉴定出总共188种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为86.06%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， $\Delta\%D$ 值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸432-452(CVIAWNSNNLDSKVGGNLYL)(SEQ ID NO:836)、467-474(DISTEIQ)(SEQ ID NO:837)和480-513(CNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPVRVVVL)(SEQ ID NO:838)的肽显著受mAb10934保护。

[0382] 从单独的RBD和与mAb10933样品复合的RBD两者中鉴定出总共188种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为86.06%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， $\Delta\%D$ 值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸467-510(DISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPVRV)(SEQ ID NO:839)的肽显著受mAb10933保护。

[0383] 从单独的RBD和与mAb10920样品复合的RBD两者中鉴定出总共75种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为83.27%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， $\Delta\%D$ 值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸471-486(EIYQAGSTPCNGVEGF)(SEQ ID NO:840)和491-515(PLQSYGFQPTNGVGYQPVRVVLSF)(SEQ ID NO:841)的肽显著受mAb10920保护。

[0384] 从单独的RBD和与mAb10922样品复合的RBD两者中鉴定出总共86种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， $\Delta\%D$ 值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸432-452(CVIAWNSNNLDSKVGGNLYL)(SEQ ID NO:836)的肽显著受mAb10922保护。

[0385] 从单独的RBD和与mAb10936样品复合的RBD两者中鉴定出总共81种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为82.07%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， $\Delta\%D$ 值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸351-360(YAWNRKRISN)(SEQ ID NO:842)、432-452(CVIAWNSNNLDSKVGGNLYL)(SEQ ID NO:836)、467-486(DISTEIQAGSTPCNGVEGF)(SEQ ID NO:843)和491-513(PLQSYGFQPTNGVGYQPVRVVVL)(SEQ ID NO:844)的肽显著受mAb10936保护。

[0386] 从单独的RBD和与mAb10954样品复合的RBD两者中鉴定出总共84种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， $\Delta\%D$

D值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸400-422(FVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYN)(SEQ ID NO:845)、453-486(YRLFRKSNLKPFRDIST EIIYQAGSTPCNGVEGF)(SEQ ID NO:846)和490-515(FPLQSYGFQPTNGVGYQP YRVVLSF)(SEQ ID NO:847)的肽显著受mAb10954保护。

[0387] 从单独的RBD和与mAb10964样品复合的RBD两者中鉴定出总共109种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为83.67%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， Δ % D值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸401-424(VIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYK)(SEQ ID NO:848)和471-513(EIIYQAGSTPCNGVEGF NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP YRVVVL)(SEQ ID NO:849)的肽显著受mAb10964保护。

[0388] 从单独的RBD和与mAb10977样品复合的RBD两者中鉴定出总共78种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， Δ % D值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸351-364(YAWNKRKISNCVAD)(SEQ ID NO:850)和471-486(EIIYQAGSTPCNGVEGF)(SEQ ID NO:840)的肽显著受mAb10977保护。

[0389] 从单独的RBD和与mAb10984样品复合的RBD两者中鉴定出总共88种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， Δ % D值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸400-422(FVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYN)(SEQ ID NO:845)和453-486(YRLFRKSNLKPFRDIST EIIYQAGSTPCNGVEGF)(SEQ ID NO:846)的肽显著受mAb10984保护。

[0390] 从单独的RBD和与mAb10986样品复合的RBD两者中鉴定出总共84种来自RBD的肽，这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即， Δ % D值小于-5%，如-6%、-10%，以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸400-422(FVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYN)(SEQ ID NO:845)、453-486(YRLFRKSNLKPFRDIST EIIYQAGSTPCNGVEGF)(SEQ ID NO:846)和490-515(FPLQSYGFQPTNGVGYQP YRVVLSF)(SEQ ID NO:847)的肽显著受mAb10986保护。

[0391] 总之，大多数测试的中和抗体以重叠包含ACE2界面的RBD残基的方式接触RBD；此外，抗体可以根据它们接触RBD表面的模式进行分组，如图15所示。上述数据也汇总于表14-25中。

[0392] 表14:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb时显著受保护的纤突蛋白受体结合结构域(RBD)肽

| RBD 残基 | 5 分钟温育 | | | 10 分钟温育 | | | $\Delta\%D$ |
|----------------|--------------|------|------------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10989 | RBD | ΔD | RBD-mAb10989 | RBD | ΔD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | | D-摄取 | D-摄取 | | |
| [0393] 467-474 | 2.67 | 3.16 | -0.49 | 2.53 | 3.17 | -0.64 | -10.5 |
| 470-473 | 0.48 | 0.98 | -0.50 | 0.47 | 0.98 | -0.51 | -28.0 |
| 470-474 | 0.99 | 1.46 | -0.47 | 0.99 | 1.44 | -0.45 | -16.9 |
| 471-474 | 0.51 | 0.89 | -0.38 | 0.51 | 0.89 | -0.38 | -20.9 |
| 475-486 | 2.20 | 2.93 | -0.73 | 2.11 | 2.94 | -0.83 | -9.7 |
| 475-487 | 3.31 | 4.50 | -1.19 | 3.61 | 4.48 | -0.87 | -11.4 |
| 475-489 | 2.77 | 4.48 | -1.71 | 2.78 | 4.53 | -1.75 | -16.0 |
| 475-490 | 2.63 | 4.96 | -2.33 | 2.67 | 4.97 | -2.30 | -19.8 |
| 480-489 | 1.82 | 3.67 | -1.85 | 1.77 | 3.69 | -1.92 | -26.2 |
| 483-486 | 0.31 | 0.78 | -0.47 | 0.30 | 0.78 | -0.48 | -26.5 |
| 487-489 | 0.05 | 0.40 | -0.35 | 0.02 | 0.39 | -0.37 | -40.4 |
| 487-490 | 0.11 | 0.90 | -0.79 | 0.11 | 0.84 | -0.73 | -42.3 |
| 487-491 | 0.10 | 1.05 | -0.95 | 0.10 | 1.03 | -0.93 | -52.0 |
| 487-495 | 0.62 | 1.59 | -0.97 | 0.67 | 1.57 | -0.90 | -17.4 |
| 487-509 | 5.63 | 6.99 | -1.36 | 5.68 | 7.02 | -1.34 | -8.3 |
| 487-510 | 6.08 | 7.37 | -1.29 | 6.08 | 7.44 | -1.36 | -7.7 |
| 487-512 | 5.72 | 6.48 | -0.76 | 5.60 | 6.77 | -1.17 | -5.1 |
| 487-513 | 5.15 | 6.16 | -1.01 | 5.07 | 6.14 | -1.07 | -5.3 |
| 488-490 | 0.03 | 0.22 | -0.19 | 0.00 | 0.23 | -0.23 | -23.2 |
| [0394] 488-491 | 0.04 | 0.37 | -0.33 | 0.04 | 0.36 | -0.32 | -36.3 |

[0395] 表15: 相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10987复合物时显著受保护的纤突蛋白RBD肽

| RBD 残基 | 5 分钟温育 | | | 10 分钟温育 | | | $\Delta\%D$ |
|----------------|--------------|------|------------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10987 | RBD | ΔD | RBD-mAb10987 | RBD | ΔD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | | D-摄取 | D-摄取 | | |
| [0396] 432-441 | 1.62 | 2.17 | -0.55 | 1.64 | 2.18 | -0.54 | -7.6 |
| 432-449 | 5.60 | 6.59 | -0.99 | 5.54 | 6.59 | -1.05 | -7.1 |
| 432-452 | 6.20 | 7.49 | -1.29 | 6.20 | 7.46 | -1.26 | -7.5 |
| 433-441 | 1.50 | 2.00 | -0.50 | 1.49 | 2.01 | -0.52 | -8.1 |
| 440-452 | 3.95 | 4.81 | -0.86 | 4.03 | 4.80 | -0.77 | -8.3 |
| 442-449 | 2.49 | 2.98 | -0.49 | 2.60 | 2.99 | -0.39 | -8.2 |

[0397] 表16: 相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10934复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 5 分钟温育 | | | 10 分钟温育 | | | $\Delta\%D$ |
|----------------|--------------|------|------------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10934 | RBD | ΔD | RBD-mAb10934 | RBD | ΔD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | | D-摄取 | D-摄取 | | |
| [0398] 432-452 | 5.70 | 7.49 | -1.79 | 5.62 | 7.46 | -1.84 | -10.6 |
| 433-441 | 1.60 | 2.00 | -0.40 | 1.63 | 2.01 | -0.38 | -6.2 |
| 434-441 | 2.24 | 2.42 | -0.18 | 2.13 | 2.52 | -0.39 | -5.3 |
| 440-452 | 3.12 | 4.81 | -1.69 | 3.10 | 4.80 | -1.70 | -17.1 |
| 442-449 | 2.37 | 2.98 | -0.61 | 2.37 | 2.99 | -0.62 | -11.4 |
| 442-452 | 2.67 | 4.21 | -1.54 | 2.66 | 4.23 | -1.57 | -19.1 |
| 443-452 | 2.53 | 3.78 | -1.25 | 2.52 | 3.78 | -1.26 | -17.5 |
| 444-451 | 1.79 | 2.73 | -0.94 | 1.80 | 2.73 | -0.93 | -17.2 |
| 444-452 | 1.82 | 3.09 | -1.27 | 1.75 | 3.09 | -1.34 | -20.7 |
| 445-452 | 1.24 | 2.42 | -1.18 | 1.24 | 2.43 | -1.19 | -22.0 |
| 467-474 | 2.64 | 3.16 | -0.52 | 2.58 | 3.17 | -0.59 | -10.2 |
| 470-473 | 0.51 | 0.98 | -0.47 | 0.55 | 0.98 | -0.43 | -25.0 |
| 470-474 | 1.03 | 1.46 | -0.43 | 1.01 | 1.44 | -0.43 | -16.0 |
| 471-474 | 0.56 | 0.89 | -0.33 | 0.55 | 0.89 | -0.34 | -18.6 |
| 480-489 | 3.19 | 3.67 | -0.48 | 3.19 | 3.69 | -0.50 | -6.8 |
| 487-489 | 0.04 | 0.40 | -0.36 | 0.06 | 0.39 | -0.33 | -38.6 |
| 487-490 | 0.54 | 0.90 | -0.36 | 0.53 | 0.84 | -0.31 | -18.8 |
| 487-491 | 0.63 | 1.05 | -0.42 | 0.70 | 1.03 | -0.33 | -20.5 |
| 487-495 | 0.73 | 1.59 | -0.86 | 0.71 | 1.57 | -0.86 | -16.0 |
| 487-509 | 5.55 | 6.99 | -1.44 | 5.57 | 7.02 | -1.45 | -8.9 |
| 487-510 | 5.89 | 7.37 | -1.48 | 6.00 | 7.44 | -1.44 | -8.5 |
| 487-513 | 4.37 | 6.16 | -1.79 | 4.79 | 6.14 | -1.35 | -7.9 |
| [0399] 488-509 | 4.50 | 5.49 | -0.99 | 4.60 | 5.52 | -0.92 | -6.2 |
| 488-510 | 5.84 | 6.58 | -0.74 | 5.65 | 6.67 | -1.02 | -5.4 |
| 490-509 | 5.16 | 6.01 | -0.85 | 5.30 | 6.12 | -0.82 | -5.8 |
| 490-512 | 5.15 | 6.37 | -1.22 | 5.30 | 6.28 | -0.98 | -6.4 |
| 490-513 | 4.90 | 6.10 | -1.20 | 5.05 | 6.05 | -1.00 | -6.1 |
| 503-509 | 1.19 | 1.39 | -0.20 | 1.21 | 1.41 | -0.20 | -5.5 |

[0400] 表17:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10933复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 5 分钟温育 | | | 10 分钟温育 | | | $\Delta\%D$ |
|----------------|--------------|------|------------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10933 | RBD | ΔD | RBD-mAb10933 | RBD | ΔD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | | D-摄取 | D-摄取 | | |
| [0401] 467-474 | 2.52 | 3.16 | -0.64 | 2.55 | 3.17 | -0.62 | -11.7 |
| 470-474 | 1.03 | 1.46 | -0.43 | 1.03 | 1.44 | -0.41 | -15.6 |
| 471-474 | 0.54 | 0.89 | -0.35 | 0.54 | 0.89 | -0.35 | -19.5 |
| 475-487 | 3.62 | 4.50 | -0.88 | 3.63 | 4.48 | -0.85 | -9.6 |
| 475-489 | 3.21 | 4.48 | -1.27 | 3.26 | 4.53 | -1.27 | -11.8 |
| 480-486 | 1.79 | 2.06 | -0.27 | 1.87 | 2.07 | -0.20 | -5.1 |
| 480-489 | 2.13 | 3.67 | -1.54 | 2.18 | 3.69 | -1.51 | -21.2 |
| 483-486 | 0.61 | 0.78 | -0.17 | 0.62 | 0.78 | -0.16 | -9.3 |
| 487-489 | 0.02 | 0.40 | -0.38 | 0.02 | 0.39 | -0.37 | -41.6 |
| 487-490 | 0.42 | 0.90 | -0.48 | 0.40 | 0.84 | -0.44 | -25.6 |
| 487-491 | 0.46 | 1.05 | -0.59 | 0.46 | 1.03 | -0.57 | -32.0 |
| 487-495 | 0.74 | 1.59 | -0.85 | 0.82 | 1.57 | -0.75 | -14.8 |
| 487-509 | 6.01 | 6.99 | -0.98 | 6.14 | 7.02 | -0.88 | -5.7 |
| 487-510 | 6.29 | 7.37 | -1.08 | 6.14 | 7.44 | -1.30 | -7.0 |
| 488-490 | 0.19 | 0.22 | -0.03 | 0.13 | 0.23 | -0.10 | -7.4 |
| 488-491 | 0.26 | 0.37 | -0.11 | 0.25 | 0.36 | -0.11 | -12.3 |

[0402] 表18:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10920复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 10 分钟温育 | | | |
|----------------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10920 | | RBD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | ΔD | $\Delta\%D$ |
| [0403] 471-486 | 4.63 | 5.40 | -0.77 | -6.6 |
| 475-486 | 2.74 | 3.27 | -0.53 | -6.5 |
| 491-513 | 5.45 | 6.57 | -1.12 | -6.6 |
| 495-510 | 4.51 | 5.43 | -0.92 | -8.5 |
| 495-513 | 4.41 | 5.13 | -0.72 | -5.4 |
| 496-515 | 3.58 | 4.35 | -0.77 | -5.4 |

[0404] 表19:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10922复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 10 分钟温育 | | | |
|----------------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10922 | | RBD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | ΔD | $\Delta\%D$ |
| [0405] 432-441 | 1.86 | 2.23 | -0.37 | -5.3 |
| 442-452 | 3.52 | 4.57 | -1.05 | -13.0 |

[0406] 表20:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10936复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 10 分钟温育 | | | |
|----------------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10936 | | RBD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | ΔD | $\Delta\%D$ |
| [0407] 351-360 | 2.68 | 3.10 | -0.42 | -5.9 |
| 432-441 | 1.85 | 2.23 | -0.38 | -5.3 |
| 442-452 | 2.55 | 4.57 | -2.02 | -25.0 |
| 443-452 | 2.98 | 4.01 | -1.03 | -14.2 |
| 467-470 | 0.69 | 0.84 | -0.15 | -8.1 |
| 471-486 | 4.73 | 5.40 | -0.67 | -5.8 |
| 491-513 | 5.48 | 6.57 | -1.09 | -6.4 |
| 495-510 | 4.38 | 5.43 | -1.05 | -9.8 |

[0408] 表21:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10954复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 10 分钟温育 | | | |
|----------------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10954 | | RBD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | ΔD | $\Delta\%D$ |
| [0409] 400-420 | 3.67 | 4.56 | -0.89 | -5.5 |
| 401-420 | 3.39 | 4.22 | -0.83 | -5.5 |
| 401-421 | 3.44 | 4.28 | -0.84 | -5.2 |
| 406-420 | 3.32 | 4.10 | -0.78 | -7.2 |
| 406-421 | 3.23 | 4.11 | -0.88 | -7.6 |
| 406-422 | 3.41 | 4.16 | -0.75 | -5.9 |
| 407-420 | 2.86 | 3.62 | -0.76 | -7.7 |
| 407-422 | 2.97 | 3.74 | -0.77 | -6.6 |
| 453-466 | 1.53 | 2.23 | -0.70 | -7.1 |
| 453-470 | 3.63 | 4.53 | -0.90 | -6.7 |
| 453-471 | 4.42 | 5.22 | -0.80 | -5.6 |

| | | | | | |
|--------|---------|------|------|-------|------|
| [0410] | 471-486 | 4.34 | 5.40 | -1.06 | -9.1 |
| | 472-486 | 4.47 | 5.29 | -0.82 | -7.6 |
| | 490-512 | 5.64 | 6.65 | -1.01 | -5.9 |
| | 490-513 | 5.61 | 6.57 | -0.96 | -5.3 |
| | 491-513 | 5.26 | 6.57 | -1.31 | -7.7 |
| | 493-512 | 4.86 | 5.69 | -0.83 | -5.7 |
| | 493-513 | 4.74 | 5.72 | -0.98 | -6.4 |
| | 495-510 | 4.77 | 5.43 | -0.66 | -6.2 |
| | 495-513 | 4.10 | 5.13 | -1.03 | -7.6 |
| | 496-512 | 3.60 | 4.60 | -1.00 | -8.6 |
| | 496-515 | 3.43 | 4.35 | -0.92 | -6.4 |

[0411] 表22:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10964复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 10 分钟温育 | | | | |
|-----------|--------------|------|------------|---------------|-------|
| | RBD-mAb10964 | | RBD | | |
| | D-摄取 | D-摄取 | ΔD | $\Delta \% D$ | |
| [0412] | 401-421 | 3.87 | 4.84 | -0.97 | -6.0 |
| | 406-419 | 3.34 | 3.91 | -0.57 | -5.8 |
| | 406-420 | 3.47 | 4.15 | -0.68 | -6.3 |
| | 406-421 | 3.53 | 4.22 | -0.69 | -5.9 |
| | 406-422 | 3.66 | 4.37 | -0.71 | -5.6 |
| | 406-424 | 3.31 | 4.24 | -0.93 | -6.5 |
| | 410-422 | 3.04 | 3.56 | -0.52 | -5.8 |
| | 471-486 | 4.65 | 5.41 | -0.76 | -6.4 |
| | 475-489 | 3.34 | 4.56 | -1.22 | -11.3 |
| | 480-489 | 2.32 | 3.19 | -0.87 | -12.1 |
| | 487-509 | 6.38 | 7.58 | -1.20 | -7.4 |
| | 495-513 | 4.50 | 5.20 | -0.70 | -5.2 |
| | 496-512 | 4.17 | 4.80 | -0.63 | -5.4 |
| | 496-513 | 3.90 | 4.85 | -0.95 | -7.5 |

[0413] 表23:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10977复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 10 分钟温育 | | | | |
|-----------|--------------|------|------------|---------------|-------|
| | RBD-mAb10977 | | RBD | | |
| | D-摄取 | D-摄取 | ΔD | $\Delta \% D$ | |
| [0414] | 351-364 | 4.82 | 5.38 | -0.56 | -5.2 |
| | 471-486 | 3.81 | 5.40 | -1.59 | -13.6 |
| | 472-486 | 4.20 | 5.29 | -1.09 | -10.1 |

[0415] 表24:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10984复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 10 分钟温育 | | | |
|-----------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10984 | | RBD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | ΔD | $\Delta\%D$ |
| 400-420 | 3.73 | 4.56 | -0.83 | -5.2 |
| 401-421 | 3.47 | 4.28 | -0.81 | -5.1 |
| 406-420 | 3.35 | 4.10 | -0.75 | -7.0 |
| 406-421 | 3.31 | 4.11 | -0.80 | -6.9 |
| 406-422 | 3.47 | 4.16 | -0.69 | -5.5 |
| 407-420 | 2.88 | 3.62 | -0.74 | -7.5 |
| 407-422 | 2.94 | 3.74 | -0.80 | -6.8 |
| 453-466 | 1.51 | 2.23 | -0.72 | -7.3 |
| 453-470 | 3.70 | 4.53 | -0.83 | -6.2 |
| 453-471 | 4.49 | 5.22 | -0.73 | -5.1 |
| 471-486 | 4.45 | 5.40 | -0.95 | -8.1 |
| 472-486 | 4.63 | 5.29 | -0.66 | -6.1 |

[0417] 表25:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10986复合物时显著受保护的RBD肽

| RBD 残基 | 10 分钟温育 | | | |
|-----------|--------------|------|------------|-------------|
| | RBD-mAb10986 | | RBD | |
| | D-摄取 | D-摄取 | ΔD | $\Delta\%D$ |
| 400-420 | 3.58 | 4.56 | -0.98 | -6.1 |
| 400-421 | 3.60 | 4.61 | -1.01 | -5.9 |
| 401-420 | 3.30 | 4.22 | -0.92 | -6.1 |
| 401-421 | 3.29 | 4.28 | -0.99 | -6.1 |
| 401-422 | 3.44 | 4.43 | -0.99 | -5.8 |
| 406-420 | 3.28 | 4.10 | -0.82 | -7.6 |
| 406-421 | 3.24 | 4.11 | -0.87 | -7.5 |
| 406-422 | 3.35 | 4.16 | -0.81 | -6.4 |
| 407-420 | 2.81 | 3.62 | -0.81 | -8.2 |
| 407-422 | 2.91 | 3.74 | -0.83 | -7.1 |
| 453-466 | 1.53 | 2.23 | -0.70 | -7.1 |
| 453-470 | 3.55 | 4.53 | -0.98 | -7.3 |
| 453-471 | 4.41 | 5.22 | -0.81 | -5.6 |
| 471-486 | 4.13 | 5.40 | -1.27 | -10.9 |
| 490-510 | 5.13 | 6.44 | -1.31 | -8.6 |
| 490-512 | 5.33 | 6.65 | -1.32 | -7.7 |
| 490-513 | 5.25 | 6.57 | -1.32 | -7.3 |
| 491-513 | 4.29 | 6.57 | -2.28 | -13.3 |
| 493-512 | 4.46 | 5.69 | -1.23 | -8.5 |
| 493-513 | 4.62 | 5.72 | -1.10 | -7.2 |
| 495-513 | 3.89 | 5.13 | -1.24 | -9.3 |
| 496-513 | 3.36 | 4.53 | -1.17 | -9.3 |
| 496-515 | 3.05 | 4.35 | -1.30 | -9.1 |

[0420] 实施例12:在选择压力下逃逸突变体的鉴定

[0421] 进行研究以确定在存在单独的抗SARS-CoV-2纤突糖蛋白抗体或这些抗体的组合的情况下,选择压力是否会导致逃逸突变体的产生。在500 μ L水泡性口炎病毒培养基(含有3%热灭活胎牛血清和青霉素/-链霉素-L-谷氨酰胺的DMEM高葡萄糖培养基)中以100 μ g/mL

开始以1:5连续稀释抗体。包括无抗体对照以说明可能发生的任何组织培养变化。将在500 μ l培养基中的总共 1.5×10^6 噬菌斑形成单位(pfu)的复制性VSV-SARS-CoV-2-S病毒添加到每个稀释液中,并在室温处温育30分钟。温育后,将混合物添加到 3×10^5 Vero E6细胞中并在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂处温育96小时。通过筛选细胞病变效应来监测病毒复制。从具有明显病毒复制的最高抗体浓度的孔中收集上清液和细胞层。按照制造商的下一代测序方案,使用TRIzol(Life Technologies)从细胞中提取总RNA,包括病毒RNA。对于第二轮选择,用VSV培养基使100 μ l含有病毒的上清液达到500 μ l,并在与之前相同或更大的抗体浓度下通过。再次收集上清液,从具有明显病毒复制的最高抗体浓度的孔中的细胞中提取RNA。

[0422] 使用Qubit RNA HS测定试剂盒(ThermoFisher)对RNA进行定量。用FastSelect-rRNA HMR(Qiagen)处理1ng至50ng RNA以除去宿主rRNA,并且片段化的温育条件如下:85 $^{\circ}$ C 6分钟,75 $^{\circ}$ C 2分钟,70 $^{\circ}$ C 2分钟,65 $^{\circ}$ C 2分钟,60 $^{\circ}$ C 2分钟,55 $^{\circ}$ C 2分钟,37 $^{\circ}$ C 5分钟,25 $^{\circ}$ C 5分钟,并保持在4 $^{\circ}$ C。使用KAPA RNA HyperPrep试剂盒(Roche Sequencing)从经处理的RNA制备链特异性RNA-seq文库。连接UDI和UMI衔接子(IDT)。进行十六循环PCR以扩增文库。在MiSeq(Illumina)上通过 2×70 个循环的多重配对读取运行进行测序。

[0423] 使用Array Studio软件包平台(Omicsoft)进行测序分析。使用“RNA-Seq数据套件的原始数据QC”评估配对末端RNA Illumina读数的质量。计算最小和最大读取长度、总核苷酸数和GC%。生成了总体质量报告,总结了每个样品中的所有读数以及每个碱基对的质量。然后使用Omicsoft序列比对器(OSA)版本4将双端RNA Illumina读数对VSV-SARS-CoV-2-S病毒基因组作图。使用默认参数通过质量评分修剪读数(当比对器在读数中遇到质量评分为2或更小的核苷酸时,其修剪读数的剩余部分)。使用汇总变量数据和注释变量数据包(Omicsoft)分析和注释OSA输出。计算每个样品的目标覆盖率。使用平均目标覆盖率大于500个读数的样品进行SNP调用。鉴定并注释最小频率为1%且覆盖率大于50的SNP。

[0424] 通过对复制的VSV-SARS-CoV-2-S病毒使用上述方法,在单一抗体以及抗体组合的压力下选择逃逸突变体(图18A)。对第一代中的四种单独抗体中的每一种鉴定了多个独立的逃逸突变体(图18B、图18C、图19)。如图1所示,两种非竞争性抗体(mAb10987+mAb10933)的组合阻止了SARS-CoV-2纤突蛋白中逃逸突变体的选择。用在该测定中测试的所有四种单独抗体鉴定逃逸突变体。这些突变体中的一些在单次传代后在群体中变得固定,并且以高达50 μ g/ml的抗体浓度(比IC₅₀高约10,000-100,000的浓度)存在于100%的测序读数中。逃逸突变体的测序(图19)表明,单个氨基酸变化甚至可以消除与针对所有已知RBD变体选择广度的抗体的结合,并且以低pM IC₅₀中和亲本病毒。

[0425] 为了进一步分析观察到的逃逸突变体,研究了22,872种公开可获得的独特基因组序列。SARS-CoV-2完整基因组序列从GISAID核苷酸数据库(www.gisaid.org)下载。对序列进行整理,并使用定制流水线在7,684个高质量基因组序列中评估纤突编码基因的遗传多样性。简而言之,Blastn用于将Wuhan_Hu_1纤突核苷酸序列(登录号:MN908947)与每个单独的基因组进行比对。分析结果,并且如果比对长度大于95%,同一性百分比大于70%,则验证基因的存在。提取、翻译并比对同源纤突序列,以鉴定相对于参考的氨基酸变化。

[0426] 该分析表明,在本研究中鉴定的两个逃逸氨基酸残基中以各一个的极低频率存在多态性。值得注意的是,该研究包括评估非竞争性抗体(mAb10987+mAb10933)和竞争性抗体(mAb10989+mAb10934),但不导致产生逃逸突变体的唯一条件是非竞争性抗体组合。尽管这

项研究是在组织培养细胞中使用替代病毒进行的,但预期当仅存在一种抗体时,在体内 SARS-CoV-2病毒也会在类似的压力下发生逃逸。对抗多种非竞争性抗体的逃逸需要同时选择两个不同的氨基酸突变,这允许病毒保持复制适应性,这比选择单个突变的可能性要小得多。

[0427] 评估用抗体混合物 (mAb10987+mAb10933) 处理后的逃逸。该抗体混合物被设计为通过包含两种抗体来避免逃逸,这两种抗体结合RBD的不同和非重叠区域并且因此可以同时结合和阻断RBD功能。在该抗体混合物的存在下尝试使VSV-SARS-CoV-2-S病毒生长并未导致逃逸突变体的过度生长(图18B、图18C、图19和图20)。因此,这种选择的混合物不能快速选择突变体,可能是因为逃逸不太可能需要在两个不同的遗传位点同时发生病毒突变,以消除混合物中两种抗体的结合和中和。

[0428] 除了上述混合物之外,还评估了用其他组合处理后的逃逸,这次用完全或部分竞争与RBD结合的抗体 (mAb10989+mAb10934和mAb10989+mAb10987),即与RBD重叠区域结合的两种抗体,尽管程度不同。在这些组合处理的选择压力下,快速产生了对一种组合有抗性而对另一种组合没有抗性的逃逸突变体(图18B、图18C、图19和图20)。对于mAb10989+mAb10934组合,其中抗体表现出完全竞争,单个氨基酸取代足以消除混合物的中和,表明这两种抗体都需要与E484残基结合以中和SARS-CoV-2。有趣的是,这样的快速逃逸在mAb10989+mAb10987组合处理后没有发生,其仅表现出部分竞争;当mAb10989预先结合时,mAb10987可以与RBD弱结合。因此,即使未选择同时结合的抗体组合有时也可能抵抗逃逸,因为它们的表位仅部分重叠,和/或将导致逃逸的残基不容易被病毒耐受,因此不容易选择。

[0429] 此外,还评估了mAb10933和mAb10987的组合中和表达称为B.1.1.7的SARS-CoV-2变体(也称为“UK变体”)的假型VSV的能力。该变体快速扩增,并且可能具有与野生型SARS-CoV-2不同的作用,包括比野生型病毒更严重的症状和对疫苗和/或治疗剂的潜在抗性。它部分地根据纤突蛋白中的以下突变来分类:HV 69-70缺失、Y144缺失、N501Y、A570D、P681H、T716I、S982A和D1118H。显示mAb10933和mAb10987的组合比任一单独抗体更有效地中和病毒(图21)。

| | | | | |
|--------|------------|------------------------------------|----------|---------------------|
| [0430] | | mAb10933 | mAb10987 | mAb10933 + mAb10987 |
| [0431] | 变体 | 相对于参考 SARS-CoV-2 D614G 的 IC50 降低倍数 | | |
| | UK B.1.1.7 | 0.98 | 0.70 | 1.04 |

[0432] 进行了进一步的实验以评估在三抗体组合 (mAb10933+mAb10987+mAb10985) 的存在下是否发生逃逸。三种单独的抗体 (mAb10933: 第2次传代; mAb10987: 第3次传代; mAb10985: 第1次传代) 中的每种抗体都迅速发生了完全逃逸。然而, mAb10933和mAb10987的组合将完全逃逸的产生延长到第7次传代,并且当将mAb10985添加到mAb10933和10987的组合中时,即使在11次传代之后也没有观察到逃逸。参见图22。

[0433] 实施例13: SARS-CoV-2野生型和变体纤突蛋白的中和

[0434] 为了测试抗SARS-CoV-2纤突蛋白抗体是否能够中和SARS-CoV-2变体,针对表达野生型和变体纤突蛋白的一组VSV假型化病毒对这些抗体进行了筛选。通过用对SARS-CoV-2

纤突蛋白进行编码的质粒或含有对SARS-CoV-2纤突蛋白氨基酸序列进行编码的已知变体的核苷酸变异的相同质粒瞬时转染293T细胞来产生VSV假型化病毒。通过Sanger测序来确认所有质粒。在使用125 μ L Lipofectamine LTX、30 μ L PLUS试剂和高达3mL Opti-Mem以15 μ g/板的纤突DNA转染前一天,在DMEM完全培养基(1000mL DMEM,Gibco;100mL FBS,Gibco;10mL PSG,Gibco)中将细胞以每板 1.2×10^7 个细胞接种在15cm的板中。转染后24小时,将细胞用10mL PBS洗涤,然后在10mL的Opti-Mem中以0.1VSV ^{Δ G:mNeon}病毒的MOI感染。将病毒在细胞上温育1小时,每10分钟轻轻摇动一次。将细胞用10mL PBS洗涤3次,然后用20mL感染培养基(1000mL DMEM,Gibco;10mL丙酮酸钠,Gibco;7mL BSA,Sigma;5mL庆大霉素,Gibco)覆盖,然后在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂处温育24小时。将假病毒上清液收集在冰上的250mL离心管中,然后以3000rpm离心5分钟以沉淀任何细胞碎片,在冰上等分,然后冷冻到-80 $^{\circ}$ C。在用于中和测定之前,在Vero细胞上测试感染性。这个材料将被称为VSV ^{Δ G:mNeon}/纤突假病毒或VSV ^{Δ G:mNeon}/纤突_(变体氨基酸突变)(例如,VSV ^{Δ G:mNeon}/纤突_H49Y)。

[0435] 在第1天,将Vero细胞以80%汇合度接种在T225烧瓶中,将细胞用PBS(Gibco:20012-043)洗涤,添加TrypLE以使细胞从烧瓶脱落,并添加完整DMEM以灭活胰蛋白酶。将20,000个Vero细胞平板接种在96孔黑色聚苯乙烯微板(康宁公司:3904)中的每孔100 μ L的预热的完整DMEM中。在第2天,将VSV ^{Δ G:mNeon}/纤突假病毒在冰上融化并用感染培养基稀释。将抗体在U型底96孔板中稀释,从而在210 μ L感染培养基中以2倍测定浓度产生每种抗体的稀释液。将120 μ L的经过稀释的抗体转移到新鲜的U型底板,并向每个板添加培养基和IgG1对照抗体。将120 μ L的经过稀释的假病毒添加到除培养基对照孔之外的每个孔。向这些孔添加120 μ L的感染培养基。将带有抗体的假病毒在室温下温育30分钟,然后将培养基从Vero细胞去除。将100 μ L的抗体/假病毒混合物添加到细胞,并且然后在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下温育24小时。在第3天,将上清液从细胞孔去除,并用100 μ L的PBS置换。在带有MiniMax成像细胞仪的SpectraMax i3上对板进行读取。

[0436] 对于复制型VSV-SARS-CoV-2-S病毒中和测定,如上所述但在VSV培养基(含有3%热灭活胎牛血清和青霉素/链霉素-L-谷氨酰胺的DMEM高葡萄糖培养基)中稀释抗体。将等体积的含有2000pfu VSV-SARS-CoV-2-S病毒的培养基与抗体稀释液混合并在室温处温育30分钟。然后将混合物添加到Vero细胞上并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂处温育24小时。将细胞固定(含2%多聚甲醛的PBS)20分钟,透化(含5%胎牛血清和0.1% Triton-X100的PBS)15分钟并封闭(含3%牛血清白蛋白的PBS)1小时。感染的细胞用兔抗VSV血清(Imanis Life Sciences)和AlexaFluor[®]488二抗的PBS+3%牛血清白蛋白溶液免疫染色。使用具有MiniMax成像细胞计数器的SpectraMax i3读板器对荧光焦点进行定量。

[0437] 除使用复制型和非复制型VSV-SARS-CoV-2-S病毒测试中和能力之外,还使用SARS-CoV-2病毒测试抗体。将单克隆抗体和抗体组合在DMEM(质量生物有限公司(Quality Biological))中连续稀释,补充10%(v/v)热灭活胎牛血清(西格玛公司),1%(v/v)青霉素/链霉素(李连生物制品公司(Gemini Bio-products))和1%(v/v)L-谷氨酰胺(2mM最终浓度,Gibco)(VeroE6培养基)到250 μ L的最终体积。接下来,将250 μ L的含SARS-CoV-2(WA-1)(1000PFU/mL)的VeroE6培养基添加到每个血清稀释液并添加到250 μ L培养基作为未经处理的对照。将病毒-抗体混合物在37 $^{\circ}$ C下温育60分钟。温育后,通过噬菌斑测定来测定混合物的病毒滴度。最后,使用4参数对数曲线拟合到中和百分比数据(GraphPad软件,加利福尼亚

州拉荷亚)来计算50%噬菌斑减少中和滴度(PRNT50)值(相对于未经处理的对照的噬菌斑形成,噬菌斑形成减少50%的血清稀释度)。

[0438] 在Vero细胞中测定对纤突蛋白(S-wt)的Wuhan-Hu-1(NCBI登录号MN908947.3)序列进行编码的表达VSV-SARS-CoV-2纤突蛋白(S)的假病毒的单独的单克隆抗体的半数最大抑制浓度(IC50)(表26)。大多数抗体在皮摩尔范围(pM)内显示出中和效力,其中有些抗体在纳摩尔(nM)范围内表现出中和效力。

[0439] 虽然重组ACE2能够介导VSV-纤突假颗粒的中和,但是如先前所报道的,其效力远低于单克隆抗体的效力,相对于最佳中和mAb,其效力下降多于1000倍(图11A和图11B)。此外,在中和测定中证实了mAb10987、mAb10989、mAb10933和mAb10934的有效中和活性,包括在人肺上皮Calu-3细胞系中的pVSV-SARS-CoV-2-S(mNeon)中和、在Vero细胞中的复制型VSV-SARS-CoV-2-S的中和,以及在VeroE6细胞中的SARS-CoV-2的中和(图11B、图11C和图11D)。所有中和测定跨四个mAb(mAb10987、mAb10989、mAb10933和mAb10934)产生类似的效力,并且没有组合显示出协同中和活性(图11C、图11D)。

[0440] 表26:针对Vero细胞中的VSV-SARS-CoV-2-S假颗粒的野生型菌株的mAb中和效力(IC50(M))

| 抗体 | IC50 (M) |
|----------|----------|
| mAb10934 | 5.44E-11 |
| mAb10936 | 1.11E-10 |
| mAb10987 | 4.06E-11 |
| mAb10924 | 1.36E-10 |
| mAb10935 | 2.21E-10 |
| mAb10913 | 2.31E-10 |
| mAb10939 | 2.36E-10 |
| mAb10937 | 2.62E-10 |
| mAb10920 | 2.64E-10 |
| mAb10941 | 2.78E-10 |
| mAb10923 | 3.29E-10 |
| mAb10915 | 3.40E-10 |
| mAb10932 | 3.58E-10 |
| mAb10921 | 3.74E-10 |

[0441]

| | | |
|--------|----------|----------|
| | mAb10914 | 3.94E-10 |
| | mAb10940 | 5.43E-10 |
| | mAb10989 | 7.23E-12 |
| | mAb10938 | 6.65E-10 |
| | mAb10922 | 1.21E-10 |
| | mAb10930 | 1.07E-09 |
| | mAb10954 | 9.22E-11 |
| | mAb10955 | 1.19E-10 |
| | mAb10933 | 4.28E-11 |
| | mAb10956 | 1.28E-10 |
| | mAb10957 | 1.76E-10 |
| | mAb10964 | 5.70E-11 |
| | mAb10965 | 1.42E-10 |
| | mAb10966 | 1.00E-10 |
| | mAb10967 | 2.43E-10 |
| [0442] | mAb10970 | 1.26E-10 |
| | mAb10971 | 1.55E-10 |
| | mAb10977 | 5.15E-11 |
| | mAb10982 | 3.69E-10 |
| | mAb10984 | 9.73E-11 |
| | mAb10985 | 2.57E-10 |
| | mAb10986 | 9.91E-11 |
| | mAb10988 | 2.98E-10 |
| | mAb10969 | 2.27E-09 |
| | mAb10996 | 1.13E-08 |
| | mAb10998 | 9.51E-09 |
| | mAb11002 | 非中和 |
| | mAb11000 | 2.79E-08 |
| | mAb11004 | 6.00E-09 |
| | mAb11006 | 1.40E-09 |
| | mAb11008 | 2.05E-08 |
| | mAb11010 | 非中和 |

[0443] 从表示全球循环菌株的7000多个公开可用的SARS-CoV-2序列鉴定了纤突(S)蛋白中的氨基酸变体,并将其克隆到VSV假颗粒中。用对变体进行编码的假颗粒进行中和测定以评估每种变体对单克隆抗体的中和效力的影响。表27展示了针对对变体进行编码的假颗粒的单克隆抗体相对于单一浓度为5 μ g/ml的SARS-CoV-2纤突(S-wt)的相对中和效力。对于每个单独的抗体和变体,捕获相对于S-wt的中和百分比。除mAb10985和R408I变体以外,没有抗体在5 μ g/ml浓度下展示出中和效力丧失。这些数据证实了针对全球循环SARS-CoV-2纤突变体的单克隆抗体的广泛的功能性中和覆盖率。

[0444] 为了进一步询问S蛋白变体对单克隆抗体的中和效力的影响,运行了完整中和曲线以测定针对位于S蛋白的受体结合结构域(RBD)内的变体的亚群的最有效的中和抗体的IC50值。表28示出了每种变体假颗粒的IC50中和值。在假颗粒中和测定之间可以观察到高达3倍的固有变异性,并且其并非指示中和效力的变化。这些数据证实了抗体保留其针对一组不同的S蛋白RBD变体的中和效力。

[0445] 表27:Vero细胞中的抗体浓度为5 μ g/ml的对S蛋白进行编码的VSV-SARS-CoV-2变体的相对中和

[0446]

| mAb | wt | H49Y | S50L | V341I | N354D | S359N | V367F | K378R |
|----------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| mAb10989 | 100% | 100% | 88% | 100% | 100% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10987 | 100% | 100% | 96% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10933 | 100% | 100% | 96% | 99% | 100% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10977 | 100% | 100% | 98% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% |
| mAb10934 | 100% | 100% | 95% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10964 | 100% | 100% | 90% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10954 | 100% | 100% | 92% | 100% | 100% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10984 | 100% | 100% | 95% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10986 | 100% | 100% | 98% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10966 | 100% | 100% | 90% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10936 | 100% | 100% | 96% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10955 | 100% | 100% | 95% | 99% | 99% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10922 | 100% | 100% | 98% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10970 | 100% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% |
| mAb10956 | 100% | 100% | 96% | 99% | 99% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10924 | 100% | 100% | 96% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10965 | 100% | 100% | 96% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% |
| mAb10971 | 100% | 100% | 90% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10957 | 100% | 100% | 91% | 99% | 99% | 98% | 100% | 99% |
| mAb10935 | 100% | NR | NR | NR | NR | 99% | NR | 99% |
| mAb10913 | 100% | 100% | 93% | 100% | 99% | 98% | 100% | 99% |
| mAb10939 | 100% | 100% | 93% | 98% | 99% | 100% | 100% | 99% |
| mAb10967 | 100% | 100% | 90% | 99% | 99% | 98% | 100% | 100% |
| mAb10985 | 100% | 100% | 96% | 99% | 99% | 98% | 100% | 99% |
| mAb10937 | 100% | 100% | 92% | 99% | 100% | 98% | 100% | 99% |
| mAb10920 | 100% | 100% | 92% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10941 | 100% | 99% | 97% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% |
| mAb10988 | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 98% | 100% | 100% |
| mAb10923 | 100% | 101% | 102% | 97% | 103% | 105% | 104% | 103% |
| mAb10915 | 100% | 100% | 95% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10932 | 100% | 100% | 93% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| mAb10982 | 100% | 100% | 94% | 99% | 99% | 99% | 100% | 100% |

[0447] 表27(续)

[0448]

| mAb | R408I | Q409E | A435S | K458R | G476S | Y483A | Y508H | H519P | D614G |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| mAb10989 | 100% | 101% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 97% | 100% |
| mAb10987 | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 97% | 100% |

| | | | | | | | | | |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|
| mAb10933 | 100% | 99% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 98% | 100% |
| mAb10977 | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | 97% | 100% |
| mAb10934 | 100% | 100% | 100% | 98% | 98% | 99% | 100% | 97% | 100% |
| mAb10964 | 99% | 100% | 99% | 98% | 100% | 99% | 100% | 96% | 100% |
| mAb10954 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 97% | 100% |
| mAb10984 | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 96% | 100% |
| mAb10986 | 100% | 100% | 100% | 98% | 99% | 100% | 100% | 99% | 100% |
| mAb10966 | 99% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 96% | 100% |
| mAb10936 | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 97% | 100% |
| mAb10955 | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | 97% | 100% |
| mAb10922 | 99% | 100% | 100% | 98% | 99% | 99% | 100% | 97% | 99% |
| mAb10970 | 100% | 101% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% |
| mAb10956 | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% | 97% | 100% |
| mAb10924 | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 98% | 100% |
| mAb10965 | 99% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 98% | 100% |
| mAb10971 | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 98% | 100% |
| mAb10957 | 99% | 100% | 99% | 98% | 99% | 99% | 100% | 98% | 100% |
| mAb10935 | NR | NR | NR | NR | 98% | NR | 99% | NR | NR |
| mAb10913 | 99% | 100% | 100% | 99% | 98% | 99% | 99% | 97% | 100% |
| mAb10939 | 99% | 100% | 99% | 98% | 97% | 98% | 100% | 96% | 100% |
| mAb10967 | 99% | 99% | 99% | 98% | 99% | 98% | 100% | 97% | 100% |
| mAb10985 | 26% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% | 97% | 99% |
| mAb10937 | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 98% | 100% |
| mAb10920 | 99% | 100% | 100% | 99% | 98% | 100% | 99% | 98% | 100% |
| mAb10941 | 99% | 100% | 100% | 98% | 98% | 98% | 100% | 96% | 100% |
| mAb10988 | 100% | 101% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 98% | 100% |
| mAb10923 | 103% | 104% | 100% | 100% | 96% | 98% | 101% | 97% | 101% |
| mAb10915 | 98% | 100% | 100% | 98% | 97% | 100% | 99% | 97% | 100% |
| mAb10932 | 99% | 100% | 99% | 99% | 98% | 100% | 99% | 98% | 100% |
| mAb10982 | 99% | 100% | 99% | 98% | 99% | 99% | 100% | 98% | 100% |

[0449] 表28:Vero细胞中VSV-SARS-CoV-2-S RBD变体的中和IC50 (M)

| | Q321S | V341I | A348T | N354D | S359N | V376F | K378S | R408I |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| mAb10933 | 6.85E-11 | 3.37E-11 | 4.13E-11 | 5.89E-11 | 2.12E-11 | 2.40E-11 | 3.52E-11 | 1.98E-11 |
| mAb10934 | 6.84E-11 | 7.42E-11 | 1.42E-10 | 9.76E-11 | 3.04E-11 | 3.20E-11 | 4.65E-11 | 2.75E-11 |
| mAb10984 | 2.75E-10 | 2.49E-10 | 2.01E-10 | 2.64E-10 | 1.23E-10 | 1.53E-10 | 1.88E-10 | 1.35E-10 |
| mAb10986 | 2.06E-10 | 1.92E-10 | 1.03E-10 | 2.49E-10 | 8.91E-11 | 1.49E-10 | 1.54E-10 | 6.14E-11 |

[0450]

| | | | | | | | | | |
|--------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| [0451] | mAb10987 | 5.02E-11 | 3.38E-11 | 2.98E-11 | 2.68E-11 | 2.41E-11 | 1.78E-11 | 2.40E-11 | 1.71E-11 |
| | mAb10989 | 1.46E-11 | 1.61E-11 | 7.33E-12 | 1.14E-11 | 4.30E-12 | 1.33E-11 | 1.21E-11 | 1.09E-11 |
| | mAb10964 | 5.65E-11 | 1.13E-10 | 3.52E-11 | 1.93E-10 | 6.83E-11 | 8.92E-11 | 6.19E-11 | 4.96E-11 |
| | mAb10954 | 2.32E-10 | 2.52E-10 | 1.84E-10 | 2.84E-10 | 1.09E-10 | 1.29E-10 | 1.65E-10 | 9.88E-11 |
| | IgG1 同种型对照 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 |

[0452] 表28(续)

| | Q409E | A435S | K458R | I472V | G476S | V483A | Y508H | H519P | |
|--------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| [0453] | mAb10933 | 5.65E-11 | 4.71E-11 | 3.43E-11 | 9.17E-11 | 1.41E-10 | 1.54E-11 | 4.77E-11 | 3.03E-11 |
| | mAb10934 | 5.94E-11 | 8.07E-11 | 3.46E-11 | 9.40E-11 | 3.51E-11 | 4.43E-11 | 6.73E-11 | 3.56E-11 |
| | mAb10984 | 1.52E-10 | 2.18E-10 | 1.59E-10 | 2.61E-10 | 2.10E-10 | 1.71E-10 | 2.83E-10 | 1.08E-10 |
| | mAb10986 | 1.95E-10 | 1.51E-10 | 1.00E-10 | 2.24E-10 | 1.13E-10 | 9.70E-11 | 2.01E-10 | 6.14E-11 |
| | mAb10987 | 4.06E-11 | 3.88E-11 | 1.68E-11 | 4.18E-11 | 1.86E-11 | 2.60E-11 | 2.75E-11 | 2.20E-11 |
| | mAb10989 | 2.12E-11 | 1.10E-11 | 7.51E-12 | 2.27E-11 | 6.80E-12 | 8.78E-12 | 1.71E-11 | 4.51E-12 |
| | mAb10964 | 6.61E-11 | 7.90E-11 | 5.46E-11 | 1.01E-10 | 3.42E-11 | 4.50E-11 | 1.02E-10 | 4.45E-11 |
| | mAb10954 | 2.64E-10 | 2.11E-10 | 1.45E-10 | 3.44E-10 | 1.83E-10 | 1.12E-10 | 2.05E-10 | 1.40E-10 |
| | IgG1 同种型对照 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 |

[0454] 使用编码SARS-CoV-2纤突蛋白的重组水泡性口炎病毒(VSV)与mAb10933-mAb10987组合中的每种单独抗体的连续传代的非临床研究鉴定了纤突蛋白突变体, 其对它们各自单独抗体的敏感性降低大于15倍(mAb10933单一疗法鉴定出纤突蛋白受体结合结构域中的K417E、K417R、K417N、Y453F、L455F、F486V和Q493K取代, 而mAb10987单一疗法鉴定出纤突受体结合结构域中的K444N、K444Q、K444T和V445A取代)。这些变体在一次传代中被鉴定出来, 并且一些变体通过第二次传代固定在病毒群体中。在各种抗体的存在下通过传代选择的这些变体都没有降低对REGN-COV2双抗体混合物的敏感性。此外, 在REGN-COV2双抗体混合物的存在下传代, 在相同次数的传代后没有鉴定出任何抗性取代。

[0455] 基因型和表型测试可用于监测临床试验中潜在的REGN-COV2抗性相关的纤突变体。在分析的66名患者中, 在来自I期研究的288个测序样品中未观察到mAb10933抗体的已知抗性变体。在288个分析样品中的3个中以>15%的等位基因频率鉴定出对mAb10987的中和敏感性降低(中和IC50降低约135倍)的G446V变体: 两个基线样品(一个在安慰剂中, 并且一个在研究的2400mg组中, 但不在来自相同个体的子序列样品中)和一个在研究的8000mg组中的第25天样品(在样品中总共1,292个读数中的4个测序读数)。G446V变体保持对mAb10933-mAb10987双抗体混合物的中和敏感, 并且在基线或治疗后, 在任何临床样品中没有鉴定出对mAb10933-mAb10987双抗体混合物具有抗性的变体。这些结果尚未与临床相关性相关。

[0456] 实施例14: 经纯化的抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体的Biacore结合动力学

[0457] 使用基于实时表面等离子共振的Biacore T200/Biacore 8K生物传感器测定与经过纯化的CHOt抗SARS-COV-2单克隆抗体(mAb)结合的不同的SARS-COV-2RBD试剂的平衡解离常数(K_D)。所有结合研究在25°C和37°C下在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05% v/v表面活性剂吐温-20、pH为7.4的(HBS-ET)运行缓冲液中进行。首先将Biacore CM5传感器芯片表面通过与小鼠抗人Fc特异性mAb(再生元公司(Regeneron), mAb2567)进行胺偶联来衍生化以捕获抗SARS-COV-2bmAb。对用C端myc-myc-六组氨酸表达的人SARS-COV-

2RBD细胞外结构域(SARS-COV-2RBD-MMH)、用C端小鼠IgG2a表达的SARS-COV-2RBD细胞外结构域(SARS-COV-2RBD-mFc)和用C端myc-myc-六组氨酸表达的SARS-CoV-2Spike ecto折叠子三聚体(SARS-CoV-2Spike ECD折叠子)进行结合研究。使用这些试剂可以分别测试抗体结合单体、二聚体和三聚体RBD肽的能力。SARS-COV-2Spike ECD折叠子的氨基酸序列如下(Spike ecto:氨基酸1-1198;三聚体上的折叠子:氨基酸1199-1225;GS:氨基酸1226-1227;凝血酶:氨基酸 1228-1233;myc-myc-六组氨酸标签:1234-1261):

[0458] QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVT
 WFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKT
 QSLIVNNAATNVVIKVFCEQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSA
 NNCTFEYVVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLV
 RDLPPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAA
 YYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQ
 TSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADY
 SVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQT
 GKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPF
 ERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLS
 FELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQ
 QFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQD
 VNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDI
 PIGAGICASYQTQTNSPGSASSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPT
 NFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRAL
 TGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIE
 [0459] DLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTD
 IAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYE
 NQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSS
 NFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA
 SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVITYV
 PAQEKNFHTTAPAICHGKAHFPREGVVFVSNNGTHWFVTQRNFYEPQIITD
 NTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGD
 ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNEIDLQELGKYEQYIKGYIPEAPRD
GQAYVRKDGWVLLSTFLGSLVPRGSEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHH
HHHH

[0460] 在HBS-ET运行缓冲液中制备不同浓度的hSARS-COV-2RBD-MMH (90nM-3.33nM, 3倍稀释度)、SARS-COV-2RBD-mFc (30nM-1.11nM, 3倍稀释度)和SARS-CoV2 Spike ECD折叠子 (0.78nM-25nM, 三倍系列稀释度), 并将其以50微升/分钟的流动速率注射3分钟, 同时在HBS-ET运行缓冲液中监测mAb结合的不同SARS-COV-2RBD试剂的解离6-10分钟。在每个循环

结束时,使用12秒注射20mM磷酸的小鼠抗人Fc特异性mAb表面再生SARS-COV-2RBD mAb捕获表面。通过使用BiaEvaluation软件v3.1或Biacore Insight Evaluation软件v2.0或曲线拟合软件将实时结合传感图拟合到具有传质限制的1:1结合模型来确定结合速率(k_a)和解离速率(k_d)。结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期($t_{1/2}$)是根据动力学速率如下计算的:

$$[0461] \quad K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ 并且 } t_{1/2} (\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0462] 不同的SARS-COV-2mAb与本发明的不同的抗SARS-COV-2RBD试剂在25°C和37°C结合的结合动力学参数分别示出于表29到34中。

[0463] 表29: SARS-COV-2RBD-MMH与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在25°C结合的结合动力学参数。

| 所捕获的 mAb (mAb#) | mAb 捕获水平 (RU) | 所结合的 90nM Ag (RU) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) | $t_{1/2}$ (分钟) |
|--------------------|---------------|----------------------|--------------|-------------|----------|----------------|
| mAb10913 | 287 ± 3 | 55.9 | 4.04E+05 | 2.12E - 02 | 5.26E-08 | 0.5 |
| mAb10914 | 310 ± 2 | 51.1 | 8.81E+04 | 3.76E-03 | 4.26E-08 | 3.1 |
| mAb10915 | 310 ± 2 | 63.2 | 9.61E+04 | 1.08E-04 | 1.13E-09 | 106.9 |
| mAb10920 | 307 ± 3 | 73.9 | 4.52E+05 | 1.30E-02 | 2.87E-08 | 0.9 |
| mAb10921 | 307 ± 3 | 61.4 | 1.01E+05 | 4.75E-04 | 4.71E-09 | 24.3 |
| mAb10922 | 312.2 ± 1.7 | 120.2 | 6.14E+05 | 1.48E-03 | 2.41E-09 | 7.8 |
| mAb10923 | 283 ± 2 | 80.4 | 4.66E+05 | 6.17E-03 | 1.32E-08 | 1.9 |
| mAb10924 | 319 ± 2 | 94.6 | 2.07E+05 | 1.74E-03 | 8.40E-09 | 6.6 |
| mAb10930 | 284.7 ± 0.7 | 59.6 | 1.24E+05 | 3.34E-03 | 2.70E-08 | 3.5 |
| mAb10932 | 315 ± 3 | 79.4 | 8.99E+04 | 1.21E-04 | 1.35E-09 | 95.5 |
| mAb10933 | 280 ± 1 | 99.8 | 1.52E+06 | 2.78E-03 | 1.83E-09 | 4.2 |
| mAb10934 | 280 ± 1 | 103.4 | 4.82E+06 | 5.77E-03 | 1.20E-09 | 2.0 |
| mAb10935 | 337 ± 2 | 107.8 | 3.93E+05 | 4.19E-03 | 1.07E-08 | 2.8 |
| mAb10936 | 311 ± 2 | 107.3 | 5.45E+05 | 1.07E-03 | 1.97E-09 | 10.8 |
| [0464] mAb10937 | 311 ± 2 | 102.2 | 5.72E+05 | 4.76E-03 | 8.34E-09 | 2.4 |
| mAb10938 | 338 ± 3 | 61.5 | 7.27E+04 | 1.75E-04 | 2.41E-09 | 66.0 |
| mAb10939 | 343 ± 2 | 82.3 | 1.63E+05 | 2.84E-03 | 1.74E-08 | 4.1 |
| mAb10940 | 338 ± 3 | 103.5 | 8.01E+05 | 2.51E-03 | 3.13E-09 | 4.6 |
| mAb10941 | 327 ± 1 | 92.1 | 1.20E+05 | 4.12E-04 | 3.43E-09 | 28.0 |
| mAb10954 | 286.9 ± 3 | 110.5 | 4.04E+05 | 3.64E-04 | 8.99E-10 | 31.7 |
| mAb10955 | 298.3 ± 2.5 | 88.8 | 1.61E+05 | 2.12E-03 | 1.32E-08 | 5.4 |
| mAb10956 | 293.7 ± 0.6 | 86.6 | 2.22E+05 | 4.06E-03 | 1.82E-08 | 2.8 |
| mAb10957 | 286.7 ± 2 | 93.0 | 1.38E+05 | 2.53E-04 | 1.84E-09 | 45.7 |
| mAb10964 | 259.6 ± 1.2 | 99.9 | 1.65E+06 | 3.90E-04 | 2.36E-10 | 29.6 |
| mAb10965 | 253.1 ± 1.9 | 63.6 | 1.24E+05 | 2.92E-03 | 2.35E-08 | 4.0 |
| mAb10966 | 266.6 ± 3 | 97.4 | 2.37E+05 | 3.65E-04 | 1.54E-09 | 31.6 |
| mAb10967 | 260.2 ± 0.9 | 70.7 | 1.24E+05 | 6.28E-05 | 5.08E-10 | 183.9 |
| mAb10969 | 272.2 ± 1.3 | 87.1 | 2.45E+05 | 3.80E-03 | 1.55E-08 | 3.0 |
| mAb10970 | 307.3 ± 1.3 | 102.8 | 2.27E+05 | 1.10E-03 | 4.85E-09 | 10.5 |
| mAb10971 | 263.1 ± 1.1 | 89.3 | 2.15E+05 | 3.75E-04 | 1.74E-09 | 30.8 |
| mAb10977 | 305 ± 3 | 98.5 | 2.43E+05 | 2.57E-04 | 1.06E-09 | 44.9 |

[0465]

| | | | | | | |
|----------|-----------|-------|----------|------------|----------|------|
| mAb10982 | 267.8±0.5 | 69.3 | 1.23E+05 | 2.06E-03 | 1.68E-08 | 5.6 |
| mAb10984 | 334±2.1 | 117.9 | 2.04E+05 | 4.26E-04 | 2.09E-09 | 27.1 |
| mAb10985 | 306.9±2.1 | 113.4 | 1.44E+06 | 1.55E-03 | 1.08E-09 | 7.5 |
| mAb10986 | 268.8±0.9 | 104.3 | 4.64E+05 | 1.49E-04 | 3.21E-10 | 77.5 |
| mAb10987 | 270.8±1.3 | 78.0 | 5.60E+05 | 1.20E - 02 | 2.14E-08 | 1.0 |
| mAb10988 | 279.2±2.3 | 63.6 | 8.29E+05 | 2.71E - 02 | 3.27E-08 | 0.4 |
| mAb10989 | 316.7±1.6 | 114.3 | 1.86E+06 | 2.78E-03 | 1.50E-09 | 4.2 |
| mAb10996 | 414.2±2.8 | 37.5 | 1.41E+05 | 2.28E-02 | 1.61E-07 | 0.5 |
| mAb10998 | 212.3±1 | 17.7 | 3.54E+05 | 1.84E - 02 | 5.21E-08 | 0.6 |
| mAb11000 | 322.6±3.5 | 73.6 | 1.09E+06 | 1.14E-03 | 1.04E-09 | 10.1 |
| mAb11002 | 291.7±2.7 | 13.8 | 1.65E+05 | 6.73E-03 | 4.07E-08 | 1.7 |
| mAb11004 | 232.9±0.6 | 76.4 | 3.79E+05 | 3.24E-03 | 8.54E-09 | 3.6 |
| mAb11006 | 277.2±1.1 | 66.9 | 9.67E+04 | 4.40E-04 | 4.55E-09 | 26.3 |
| mAb11008 | 214.9±1.5 | 40.8 | 9.30E+04 | 3.27E-03 | 3.52E-08 | 3.5 |
| mAb11010 | 221.8±1.3 | 76.8 | 1.11E+06 | 2.74E-03 | 2.47E-09 | 4.2 |
| mAb1932 | 205±0.8 | 5.3 | NB | NB | NB | NB |

[0466] 表30: SARS-COV-2RBD-MMH与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在37℃结合的结合动力学参数。

[0467]

| 所捕获的 mAb (mAb#) | mAb 捕获水平 (RU) | 所结合的 90nM Ag (RU) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) | $t_{1/2}$ (分钟) |
|--------------------|---------------|----------------------|--------------|-------------|----------|----------------|
| mAb10913 | 366 ± 6 | 49 | 5.29E+05 | 5.56E - 02 | 1.05E-07 | 0.2 |
| mAb10914 | 401 ± 3 | 63 | 2.51E+05 | 1.58E - 02 | 6.27E-08 | 0.7 |
| mAb10915 | 401 ± 3 | 93 | 1.57E+05 | 7.57E-04 | 4.84E-09 | 15.3 |
| mAb10920 | 394 ± 3 | 73 | 6.10E+05 | 3.41E - 02 | 5.60E-08 | 0.3 |
| mAb10921 | 394 ± 3 | 87 | 1.60E+05 | 2.07E-03 | 1.29E-08 | 5.6 |
| mAb10922 | 405.6±1.7 | 130 | 1.04E+06 | 9.27E-03 | 8.89E-09 | 1.2 |
| mAb10923 | 355 ± 3 | 84 | 6.15E+05 | 2.76E - 02 | 4.48E-08 | 0.4 |
| mAb10924 | 406 ± 5 | 110 | 2.99E+05 | 6.18E-03 | 2.07E-08 | 1.9 |
| mAb10930 | 373.9±3.5 | 42 | 2.30E+05 | 1.87E - 02 | 8.14E-08 | 0.6 |
| mAb10932 | 406 ± 4 | 119 | 1.43E+05 | 6.55E-04 | 4.57E-09 | 17.6 |
| mAb10933 | 368 ± 3 | 124 | 2.37E+06 | 8.28E-03 | 3.49E-09 | 1.4 |
| mAb10934 | 368 ± 3 | 117 | 4.62E+06 | 2.32E - 02 | 5.02E-09 | 0.5 |
| mAb10935 | 430 ± 5 | 75 | 4.37E+05 | 3.74E - 02 | 8.56E-08 | 0.3 |
| mAb10936 | 402 ± 3 | 126 | 9.75E+05 | 5.51E-03 | 5.65E-09 | 2.1 |
| mAb10937 | 402 ± 3 | 107 | 9.68E+05 | 2.43E - 02 | 2.51E-08 | 0.5 |
| mAb10938 | 434 ± 3 | 100 | 1.06E+05 | 1.12E-03 | 1.05E-08 | 10.3 |
| mAb10939 | 439 ± 5 | 90 | 2.40E+05 | 9.46E-03 | 3.95E-08 | 1.2 |
| mAb10940 | 434 ± 3 | 124 | 1.42E+06 | 1.23E - 02 | 8.70E-09 | 0.9 |
| mAb10941 | 418± 3 | 134 | 1.97E+05 | 1.75E-03 | 8.87E-09 | 6.6 |
| mAb10954 | 371.8±2 | 131 | 5.68E+05 | 1.35E-03 | 2.38E-09 | 8.6 |
| mAb10955 | 384.1±6.3 | 81 | 2.85E+05 | 1.26E - 02 | 4.43E-08 | 0.9 |
| mAb10956 | 383±2.3 | 89 | 3.56E+05 | 1.30E-02 | 3.65E-08 | 0.9 |

[0468]

| | | | | | | |
|----------|-----------|-----|----------|------------|----------|------|
| mAb10957 | 322±2.1 | 124 | 2.44E+05 | 6.19E-04 | 2.54E-09 | 18.7 |
| mAb10964 | 333.3±4.6 | 121 | 3.68E+06 | 2.08E-03 | 5.64E-10 | 5.6 |
| mAb10965 | 326.8±1.2 | 67 | 2.23E+05 | 9.19E-03 | 4.12E-08 | 1.3 |
| mAb10966 | 350.2±2.9 | 118 | 4.40E+05 | 1.67E-03 | 3.79E-09 | 6.9 |
| mAb10967 | 336±2.2 | 108 | 1.91E+05 | 2.62E-04 | 1.38E-09 | 44.1 |
| mAb10969 | 349.5±3 | 86 | 4.07E+05 | 1.59E - 02 | 3.92E-08 | 0.7 |
| mAb10970 | 393.8±3.4 | 104 | 3.33E+05 | 7.58E-03 | 2.28E-08 | 1.5 |
| mAb10971 | 347±1.9 | 116 | 3.92E+05 | 9.79E-04 | 2.50E-09 | 11.8 |
| mAb10977 | 341±1.4 | 122 | 4.35E+05 | 1.31E-03 | 3.01E-09 | 8.8 |
| mAb10982 | 347.5±1.3 | 67 | 1.94E+05 | 9.42E-03 | 4.85E-08 | 1.2 |
| mAb10984 | 422.5±0.7 | 144 | 3.28E+05 | 1.82E-03 | 5.55E-09 | 6.3 |
| mAb10985 | 395.5±2.5 | 134 | 2.57E+06 | 4.23E-03 | 1.65E-09 | 2.7 |
| mAb10986 | 349.3±1.5 | 129 | 8.24E+05 | 5.83E-04 | 7.07E-10 | 19.8 |
| mAb10987 | 354±5.3 | 82 | 8.38E+05 | 2.51E - 02 | 3.00E-08 | 0.5 |
| mAb10988 | 364.4±2.6 | 52 | 9.19E+05 | 5.78E - 02 | 6.29E-08 | 0.2 |
| mAb10989 | 405.6±1.9 | 128 | 2.97E+06 | 1.16E - 02 | 3.90E-09 | 1.0 |
| mAb10996 | 524.3±2.8 | 43 | 1.06E+05 | 1.25E - 02 | 1.19E-07 | 0.9 |
| mAb10998 | 271.1±0.6 | 15 | 2.81E+05 | 7.54E-03 | 2.68E-08 | 1.5 |
| mAb11000 | 418.2±1 | 87 | 2.89E+05 | 9.10E-03 | 3.14E-08 | 1.3 |
| mAb11002 | 370.1±2.5 | 12 | 2.81E+05 | 7.54E-03 | 2.68E-08 | 1.5 |
| mAb11004 | 297.8±0.4 | 79 | 1.75E+06 | 1.48E-03 | 8.48E-10 | 7.8 |
| mAb11006 | 350.2±1.2 | 92 | 6.28E+05 | 1.48E - 02 | 2.35E-08 | 0.8 |
| mAb11008 | 289.4±2.7 | 38 | 1.42E+05 | 1.51E-03 | 1.06E-08 | 7.6 |
| mAb11010 | 286.3±0.5 | 96 | 1.67E+05 | 1.45E - 02 | 8.71E-08 | 0.8 |
| mAb1932 | 265.3±1.4 | 5 | NB | NB | NB | NB |

[0469] 表31: SARS-COV-2 RBD-mFc与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在25℃结合的结合动力学参数。

[0470]

| 所捕获的 mAb (mAb#) | mAb 捕获水平 (RU) | 所结合的 30nM Ag (RU) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) | $t_{1/2}$ (分钟) |
|--------------------|---------------|----------------------|--------------|-------------|----------|----------------|
| mAb10913 | 107 + 0.4 | 65 | 5.00E+06 | 2.77E-04 | 5.53E-11 | 41.7 |
| mAb10914 | 116 + 0.8 | 44 | 2.59E+05 | 1.40E-04 | 5.40E-10 | 82.5 |
| mAb10915 | 103 + 0.2 | 41 | 2.83E+05 | 9.13E-06 | 3.23E-11 | 1265.1 |
| mAb10920 | 116 + 0.9 | 69 | 5.08E+06 | 2.55E-04 | 5.02E-11 | 45.3 |
| mAb10921 | 104 + 0.2 | 39 | 2.66E+05 | 3.34E-05 | 1.25E-10 | 345.8 |
| mAb10922 | 111.4 ± 0.8 | 80 | 3.20E+06 | 5.64E-05 | 1.76E-11 | 204.8 |
| mAb10923 | 110 + 1.0 | 71 | 3.69E+06 | 1.35E-04 | 3.67E-11 | 85.6 |
| mAb10924 | 121 + 0.5 | 74 | 8.09E+05 | 7.63E-05 | 9.43E-11 | 151.4 |
| mAb10930 | 104.2 ± 0.9 | 61 | 9.43E+05 | 1.71E-04 | 1.81E-10 | 67.5 |
| mAb10932 | 121 + 0.8 | 60 | 2.95E+05 | 2.85E-05 | 9.67E-11 | 405.3 |
| mAb10933 | 108 + 0.5 | 72 | 6.16E+06 | 6.10E-05 | 9.89E-12 | 189.3 |
| mAb10934 | 113 + 0.5 | 70 | 1.12E+07 | 1.56E-04 | 1.39E-11 | 74.0 |
| mAb10935 | 128 + 0.8 | 88 | 1.35E+06 | 1.07E-04 | 7.94E-11 | 107.9 |

| | | | | | | | |
|--------|----------|-------------|----|----------|----------|----------|-------|
| [0471] | mAb10936 | 117 + 0.4 | 74 | 1.78E+06 | 5.04E-05 | 2.83E-11 | 229.2 |
| | mAb10937 | 106 + 0.3 | 67 | 1.78E+06 | 5.40E-05 | 3.04E-11 | 213.9 |
| | mAb10938 | 128 + 1.5 | 47 | 2.42E+05 | 1.69E-05 | 7.02E-11 | 683.4 |
| | mAb10939 | 127 + 0.8 | 67 | 7.22E+05 | 8.74E-05 | 1.21E-10 | 132.2 |
| | mAb10940 | 102 + 0.4 | 67 | 3.72E+06 | 4.66E-05 | 1.25E-11 | 247.9 |
| | mAb10941 | 125 + 0.2 | 68 | 3.70E+05 | 3.48E-05 | 9.43E-11 | 331.9 |
| | mAb10954 | 108.8 ± 1 | 86 | 2.35E+06 | 4.78E-05 | 2.03E-11 | 241.6 |
| | mAb10955 | 109.8 ± 0.8 | 76 | 1.20E+06 | 9.22E-05 | 7.71E-11 | 125.3 |
| | mAb10956 | 104.1 ± 0.5 | 74 | 1.46E+06 | 1.30E-04 | 8.87E-11 | 88.8 |
| | mAb10957 | 104.7 ± 0.5 | 77 | 1.02E+06 | 3.35E-05 | 3.27E-11 | 344.8 |
| | mAb10964 | 93.3 ± 0.3 | 70 | 9.30E+06 | 3.69E-05 | 3.97E-12 | 313.0 |
| | mAb10965 | 94.2 ± 0.8 | 63 | 6.94E+05 | 1.56E-04 | 2.25E-10 | 74.0 |
| | mAb10966 | 100.2 ± 0.4 | 73 | 1.50E+06 | 3.37E-05 | 2.24E-11 | 342.7 |
| | mAb10967 | 93.3 ± 0.2 | 60 | 6.64E+05 | 1.35E-05 | 2.03E-11 | 855.6 |
| | mAb10969 | 111.4 ± 0.8 | 80 | 4.64E+05 | 1.00E-04 | 2.16E-10 | 115.5 |
| | mAb10970 | 113.4 ± 0.7 | 85 | 2.19E+06 | 4.05E-04 | 1.85E-10 | 28.5 |
| | mAb10971 | 99 ± 0.5 | 72 | 1.40E+06 | 4.09E-05 | 2.92E-11 | 282.4 |
| | mAb10977 | 109.1 ± 0.4 | 73 | 1.82E+06 | 2.29E-05 | 1.26E-11 | 504.4 |
| | mAb10982 | 94.8 ± 0.1 | 59 | 9.10E+05 | 8.06E-05 | 8.86E-11 | 143.3 |
| | mAb10984 | 121 ± 0.6 | 89 | 1.39E+06 | 3.97E-05 | 2.86E-11 | 290.9 |
| | mAb10985 | 112.7 ± 0.3 | 77 | 8.09E+06 | 8.51E-05 | 1.05E-11 | 135.7 |
| | mAb10986 | 94.2 ± 0.5 | 66 | 2.70E+06 | 2.40E-05 | 8.88E-12 | 481.3 |
| | mAb10987 | 98 ± 0.7 | 73 | 3.19E+06 | 4.24E-04 | 1.33E-10 | 27.2 |
| | mAb10988 | 101.6 ± 0.6 | 69 | 4.96E+06 | 5.08E-04 | 1.02E-10 | 22.7 |
| | mAb10989 | 112.1 ± 0.4 | 77 | 1.08E+07 | 9.63E-05 | 8.95E-12 | 119.9 |
| | mAb10996 | 104.2 ± 0.9 | 61 | 5.62E+05 | 8.02E-04 | 1.43E-09 | 14.4 |
| | mAb10998 | 94.8 ± 0.1 | 59 | 1.47E+06 | 3.58E-03 | 2.44E-09 | 3.2 |
| | mAb11000 | 112.7 ± 0.3 | 77 | 1.11E+06 | 1.27E-04 | 1.15E-10 | 90.9 |
| | mAb11002 | 121 ± 0.6 | 89 | 5.54E+05 | 2.47E-03 | 4.46E-09 | 4.7 |
| | mAb11004 | 94.2 ± 0.5 | 66 | 6.95E+05 | 6.40E-05 | 9.21E-11 | 180.5 |
| | mAb11006 | 98 ± 0.7 | 73 | 3.30E+05 | 5.21E-05 | 1.58E-10 | 221.7 |
| | mAb11008 | 101.6 ± 0.6 | 69 | 3.90E+05 | 1.92E-04 | 4.92E-10 | 60.2 |
| | mAb11010 | 112.1 ± 0.4 | 77 | 1.14E+06 | 8.99E-05 | 7.89E-11 | 128.5 |
| | mAb1932 | 97.8 ± 0.2 | 3 | NB | NB | NB | NB |

[0472] 表32: SARS-COV-2RBD-mFc与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在37℃结合的结合动力学参数

| 所捕获的 mAb (mAb#) | mAb 捕获水平 (RU) | 所结合的 30nM Ag (RU) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) | $t_{1/2}$ (分钟) | |
|--------------------|---------------|----------------------|--------------|-------------|----------|----------------|-------|
| [0473] | mAb10913 | 147 + 0.8 | 75 | 6.32E+06 | 1.73E-03 | 2.74E-10 | 6.7 |
| | mAb10914 | 163 + 1.2 | 70 | 6.91E+05 | 2.20E-04 | 3.18E-10 | 52.5 |
| | mAb10915 | 141 + 0.6 | 63 | 4.41E+05 | 6.89E-05 | 1.56E-10 | 167.6 |
| | mAb10920 | 155 + 1.1 | 83 | 6.31E+06 | 7.53E-04 | 1.19E-10 | 15.3 |

| | | | | | | |
|-----------------|-------------|-----|----------|------------|----------|-------|
| mAb10921 | 135 + 0.3 | 62 | 4.58E+05 | 1.25E-04 | 2.73E-10 | 92.4 |
| mAb10922 | 149.1 ± 1 | 97 | 4.60E+06 | 1.60E-04 | 3.49E-11 | 72.2 |
| mAb10923 | 144 + 0.8 | 88 | 5.53E+06 | 1.85E-04 | 3.36E-11 | 62.4 |
| mAb10924 | 160 + 1.1 | 98 | 1.17E+06 | 1.31E-04 | 1.12E-10 | 88.2 |
| mAb10930 | 142.9 ± 0.4 | 72 | 1.49E+06 | 5.97E-04 | 3.99E-10 | 19.3 |
| mAb10932 | 164 + 1.5 | 89 | 4.48E+05 | 6.86E-05 | 1.53E-10 | 168.4 |
| mAb10933 | 152+ 0.9 | 89 | 7.30E+06 | 7.94E-05 | 1.09E-11 | 145.5 |
| mAb10934 | 151 + 0.7 | 87 | 1.36E+07 | 2.93E-04 | 2.16E-11 | 39.4 |
| mAb10935 | 171 + 0.8 | 101 | 5.68E+06 | 4.94E-04 | 8.69E-11 | 23.4 |
| mAb10936 | 161+ 1.0 | 94 | 3.81E+06 | 6.75E-05 | 1.77E-11 | 171.1 |
| mAb10937 | 141 + 0.6 | 85 | 4.47E+06 | 5.74E-05 | 1.29E-11 | 201.2 |
| mAb10938 | 172 + 1.2 | 76 | 3.78E+05 | 6.56E-05 | 1.73E-10 | 176.1 |
| mAb10939 | 169 + 0.6 | 92 | 1.06E+06 | 1.65E-04 | 1.55E-10 | 70.0 |
| mAb10940 | 136 + 0.6 | 85 | 5.54E+06 | 5.04E-05 | 9.10E-12 | 229.2 |
| mAb10941 | 164 + 0.8 | 100 | 8.02E+05 | 8.01E-05 | 1.00E-10 | 144.2 |
| mAb10954 | 142.4 ± 0.8 | 105 | 3.02E+06 | 1.12E-04 | 3.69E-11 | 103.1 |
| mAb10955 | 146.8 ± 0.7 | 91 | 1.92E+06 | 3.88E-04 | 2.02E-10 | 29.8 |
| mAb10956 | 136.6 ± 0.4 | 91 | 2.17E+06 | 3.42E-04 | 1.58E-10 | 33.8 |
| mAb10957 | 137.7 ± 1.2 | 100 | 1.55E+06 | 7.19E-05 | 4.63E-11 | 160.6 |
| mAb10964 | 122.5 ± 0.3 | 84 | 1.05E+07 | 1.26E-04 | 1.20E-11 | 91.7 |
| mAb10965 | 125.7 ± 1 | 81 | 1.42E+06 | 3.38E-04 | 2.37E-10 | 34.2 |
| [0474] mAb10966 | 137.3 ± 1.1 | 92 | 2.45E+06 | 9.93E-05 | 4.05E-11 | 116.3 |
| mAb10967 | 123.3 ± 0.9 | 81 | 1.45E+06 | 3.33E-05 | 2.29E-11 | 346.8 |
| mAb10969 | 149.1 ± 1 | 97 | 8.11E+05 | 1.41E-04 | 1.74E-10 | 81.9 |
| mAb10970 | 149.9 ± 0.6 | 102 | 2.18E+06 | 4.20E-04 | 1.92E-10 | 27.5 |
| mAb10971 | 136.1 ± 0.8 | 90 | 2.37E+06 | 9.41E-05 | 3.97E-11 | 122.7 |
| mAb10977 | 145.8 ± 0.7 | 93 | 2.50E+06 | 1.07E-04 | 4.28E-11 | 107.9 |
| mAb10982 | 125.5 ± 0.8 | 74 | 1.23E+06 | 2.58E-04 | 2.10E-10 | 44.8 |
| mAb10984 | 158.4 ± 0.7 | 110 | 2.07E+06 | 8.36E-05 | 4.04E-11 | 138.2 |
| mAb10985 | 151.8 ± 0.7 | 87 | 9.36E+06 | 3.75E-04 | 4.01E-11 | 30.8 |
| mAb10986 | 125 ± 0.7 | 83 | 4.59E+06 | 5.79E-05 | 1.26E-11 | 199.5 |
| mAb10987 | 131.5 ± 0.7 | 87 | 5.04E+06 | 3.90E-04 | 7.75E-11 | 29.6 |
| mAb10988 | 138.6 ± 0.5 | 82 | 8.34E+06 | 7.90E-04 | 9.47E-11 | 14.6 |
| mAb10989 | 146.1 ± 0.6 | 92 | 1.38E+07 | 3.65E-04 | 2.65E-11 | 31.6 |
| mAb10996 | 142.9 ± 0.4 | 72 | 9.35E+05 | 2.47E-03 | 2.64E-09 | 4.7 |
| mAb10998 | 125.5 ± 0.8 | 74 | 8.79E+05 | 1.97E - 02 | 2.24E-08 | 0.6 |
| mAb11000 | 151.8 ± 0.7 | 87 | 1.63E+06 | 2.71E-04 | 1.66E-10 | 42.6 |
| mAb11002 | 158.4 ± 0.7 | 110 | 5.06E+05 | 1.65E - 02 | 3.26E-08 | 0.7 |
| mAb11004 | 125 ± 0.7 | 83 | 1.01E+06 | 1.18E-04 | 1.17E-10 | 97.9 |
| mAb11006 | 131.5 ± 0.7 | 87 | 3.88E+05 | 7.65E-05 | 1.97E-10 | 151.0 |
| mAb11008 | 138.6 ± 0.5 | 82 | 4.64E+05 | 4.05E-04 | 8.72E-10 | 28.5 |
| mAb11010 | 146.1 ± 0.6 | 92 | 1.59E+06 | 8.02E-05 | 5.05E-11 | 144.0 |
| mAb1932 | 128 ± 0.3 | 5 | NB | NB | NB | NB |

[0475] 表33: SARS-CoV-2纤突ECD折叠子与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在25℃结合的结合动力学参数

| | 所捕获的 mAb (mAb#) | mAb 捕获水 平 (RU) | 所结合的 30nM Ag (RU) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) | $t_{1/2}$ (分 钟) |
|--------|--------------------|-------------------|----------------------|--------------|-------------|----------|--------------------|
| [0476] | mAb10933 | 54.9 ± 0.5 | 34.3 | 1.32E+06 | 6.05E-05 | 4.58E-11 | 190.9 |
| | mAb10934 | 48.8 ± 0.6 | 34.6 | 2.21E+06 | 1.36E-04 | 6.14E-11 | 84.9 |
| | mAb10987 | 56.3 ± 0.4 | 23.7 | 8.92E+05 | 4.16E-05 | 4.67E-11 | 277.6 |
| | mAb10989 | 58.6 ± 0.6 | 39.7 | 1.75E+06 | 9.19E-05 | 5.24E-11 | 125.7 |
| | mAb1932 | 41.7 ± 0.3 | 0.7 | NB | NB | NB | NB |

[0477] 表34: SARS-CoV-2纤突ECD折叠子与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在37℃的结合动力学参数

| | 所捕获的 mAb (mAb#) | mAb 捕获水 平 (RU) | 所结合的 30nM Ag (RU) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) | $t_{1/2}$ (分 钟) |
|--------|--------------------|-------------------|----------------------|--------------|-------------|----------|--------------------|
| [0478] | mAb10933 | 83.7 ± 0.8 | 52.8 | 1.90E+06 | 7.90E-05 | 4.17E-11 | 146.2 |
| | mAb10934 | 79.7 ± 0.7 | 40.1 | 2.85E+06 | 1.06E-04 | 3.71E-11 | 109.0 |
| | mAb10987 | 82.5 ± 0.5 | 46.1 | 1.34E+06 | 5.74E-05 | 4.28E-11 | 201.2 |
| | mAb10989 | 88.0 ± 0.9 | 57.5 | 2.38E+06 | 9.82E-05 | 4.12E-11 | 117.6 |
| | mAb1932 | 64.4 ± 1.5 | 0.6 | NB | NB | NB | NB |

[0479] 实施例15: 在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定中表征抗SARS-CoV-2-S mAb

[0480] 使用从3个供体纯化的NK细胞和与抗体结合的靶细胞测量靶向SARS-CoV-2的纤突蛋白的抗体与Fc γ R3a(一种在自然杀伤(NK)细胞上显著表达的Fc-受体)相互作用并诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。在该测定中,效应细胞是从分离自3个不同供体的LeukoPaks分离的NK细胞。靶细胞是单独或与全长SARS-CoV-2纤突蛋白组合表达人CD20的工程化的Jurkat T细胞(用作靶向CD20的人IgG1抗体的阳性对照)。将NK细胞与靶细胞一起温育并且Fc γ R3a经由与靶细胞结合的人IgG1抗体的Fc结构域的接合导致NK细胞的活化和靶细胞死亡。通过评估驱动发光增加的死亡细胞蛋白酶活性来测量细胞杀伤,并将其用作测定读数。

[0481] 将Jurkat T细胞工程化以组成型表达全长人CD20(NCBI登录号NP_690605.1的氨基酸M1-P297)。将Jurkat/hCD20细胞染色用于CD20表达并维持在RPMI+10% FBS+P/S/G+250 μ g/ml潮霉素生长培养基中。这些细胞未经进一步修饰,用作阴性对照,称为Jurkat/hCD20细胞。

[0482] 然后将上述细胞工程化以组成型表达全长SARS-CoV-2纤突蛋白(NCBI登录号YP_009724390.1的氨基酸M1-T1273)。然后将这些细胞分选以用于纤突蛋白的高表达,并保持在RPMI+10% FBS+P/S/G+1 μ g/ml嘌呤霉素+250 μ g/ml潮霉素生长培养基中,并称为Jurkat/hCD20/SARS-CoV-2纤突细胞。

[0483] 按照制造商的方案,使用Stem Cell Technologies RosetteSep Human NK细胞富集试剂盒从供体LeukoPaks中分离NK细胞。

[0484] 在测定前一天, Jurkat/hCD20和Jurkat/hCD20/SARS-CoV-2纤突细胞在它们各自的生长培养基中分裂为 5×10^5 个细胞/ml。在测定当天,根据制造商的说明书,使用NK RosetteSep Human NK细胞富集混合物(Stem Cell Technologies)和SepMate管(Stem Cell Technologies),通过密度梯度离心从富集白细胞的全血中分离出未受刺激的人NK细胞。NK细胞富集通过荧光团缀合抗体(抗CD56、抗CD3、抗CD19和抗CD14)的血细胞表型混合物进行确认。

[0485] 将Jurkat/hCD20或Jurkat/hCD20/SARS-CoV-2纤突细胞重悬于测定培养基(补充有1% BSA、100U/ml青霉素、100µg/ml链霉素和292µg/ml L-谷氨酰胺的RPMI)中,并以 5×10^3 个细胞/孔的浓度一式三份添加到不透明的白色96孔平底板中。将四种抗SARS-CoV-2纤突抗体和一种阴性同种型匹配的对照抗体在测定培养基中以1:4的系列稀释度进行滴定,最终浓度为191fM至200nM。在每次滴定中包括无抗体对照(提供背景信号,例如在NK细胞存在下靶细胞的非特异性裂解)。ADCC的阳性对照抗体(抗CD20)以1:4系列稀释度进行滴定,最终浓度为9.5fM至10nM。将人NK细胞在测定培养基中稀释,并以 2.5×10^4 个细胞/孔的最终浓度添加到测定板中。为了评估自发裂解,将单独的未经处理Jurkat细胞(靶细胞)和单独的NK细胞(效应细胞)在单独的孔中温育。将板在37°C、5% CO₂处温育3.5小时。温育后,将板平衡至室温10分钟,然后向孔中添加CytoTox Glo试剂(Promega)并振摇15分钟。使用ENVISION读板器测量发光信号作为细胞毒性读数。

[0486] 如下计算细胞毒性反应:

$$[0487] \text{细胞毒性}(\%) = (\text{实验信号} - \text{SBS}_{(\text{靶细胞})} - \text{SBS}_{(\text{效应细胞})}) / (\text{Max信号}_{(\text{靶细胞w/毛地黄皂苷})} - \text{SBS}_{(\text{靶细胞})}) \times 100,$$

[0488] 其中SBS表示自发背景信号。从该值中减去背景:(值)-(无抗体对照的平均值)。

[0489] 对于EC₅₀测定,使用GraphPad Prism在12点剂量反应曲线(包括无抗体对照)上使用4参数逻辑方程分析%细胞毒性。该实验用3个供体一式三份进行。

[0490] 不同供体的EC₅₀值和最大(Max)%细胞毒性范围总结于表35中。

[0491] 用Jurkat/hCD20/SARS-CoV-2纤突靶细胞,所有四种SARS-CoV-2纤突抗体与IgG1对照抗体相比均显示出更大的最大百分比细胞毒性。SARS-CoV-2纤突抗体的EC₅₀值范围为20.0pM至25.1nM,并且最大(%细胞毒性)值范围为6.1%至19.8%。阳性CD20对照抗体在三个供体NK细胞中显示出最大(%细胞毒性)范围为27.5%至44.6%,EC₅₀值范围为16.9pM至38.6pM。

[0492] 对于Jurkat/hCD20(阴性对照)靶细胞,所有四种SARS-CoV-2纤突抗体表现均类似于阴性对照抗体,显示出最小的活性。而阳性CD₂₀对照抗体在三个供体NK细胞中显示出最大(%细胞毒性)范围为24.5%至26.4%,EC₅₀值范围为16.3pM至32.9pM。

[0493] 表35:ADCC活性

| | | NK 供体 1-3 | | | |
|--------|----------------|---------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|
| | | Jurkat/hCD20 | | Jurkat/hCD20/SARS-CoV2 纤突蛋白 | |
| | | EC50 (M) 范围 | 最大 (%细胞 毒性) 范围 | EC50 (M) 范围 | 最大 (%细胞 毒性) 范围 |
| [0494] | mAb10933 | ND | 1.1 至 4.9 | 1.24E-10 至 2.00E-11 ^b | 11.4 至 17.5 |
| | mAb10987 | ND | 1.9 至 3.1 | 1.12E-10 至 3.32E-10 | 17.1 至 19.8 |
| | mAb10989 | ND | 1.9 至 2.6 | 1.56E-10 ^a | 8.4 至 10.6 |
| | mAb10934 | ND | 0 至 4.6 | 2.51E-08 至 2.17E-11 | 6.1 至 11.6 |
| | IgG1 对照 | ND | 0 至 4.2 | ND ^b | 1.8 至 7.2 |
| | 抗 CD20 IgG1 | 1.63E-11 至 3.29E-11 | 24.5 至 26.4 | 1.69E-11 至 3.86E-11 | 27.5 至 44.6 |

[0495] EC₅₀和最大(%细胞毒性)是来自3个供体的值的范围。

[0496] 最大(%细胞毒性)是测试剂量范围内的最高平均%细胞毒性。

[0497] a对于两个供体,观察到剂量依赖性反应,但不能计算出EC50 (NC)。

[0498] b对于一个供体,观察到剂量依赖性反应,但不能计算出EC50 (NC)。

[0499] ND=未确定。未观察到剂量依赖性反应。

[0500] 实施例16:在抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)测定中表征抗SARS-CoV-2-S mAb

[0501] 评估了靶向SARS-CoV-2纤突蛋白的抗体诱导被工程化以表达SARS-CoV-2全长纤突蛋白的Jurkat细胞的吞噬作用的能力。在抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)测定中,将在巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)存在下从单核细胞分化的巨噬细胞用作效应细胞。平行评估作为阴性对照的IgG1同种型。通过使用Opera Phenix高含量筛选系统测量与荧光标记的巨噬细胞共定位的荧光标记的靶细胞的数量来评估吞噬作用。

[0502] 为了产生Jurkat/hCD20靶细胞,将Jurkat T细胞工程化以组成型表达全长人CD20(登录号NP_690605.1的氨基酸M1-P297)。将Jurkat/hCD20细胞染色用于CD20表达并维持在RPMI+10% FBS+P/S/G+250 μ g/ml潮霉素生长培养基中。这些细胞用作阴性对照。

[0503] 为了产生Jurkat/hCD20/SARS-CoV-2纤突靶细胞,将Jurkat/hCD20 T细胞工程化以组成型表达全长SARS-CoV-2纤突蛋白(登录号YP_009724390.1的氨基酸M1-T1273)。对Jurkat/hCD20/SARS-CoV-2纤突细胞进行分选以获得纤突蛋白的高表达,并维持在RPMI+10% FBS+P/S/G+1 μ g/ml嘌呤霉素+250 μ g/ml潮霉素生长培养基中。

[0504] 为了产生效应细胞,在M-CSF存在下从单核细胞中分化出巨噬细胞。将冷冻的CD14+单核细胞(Lonza)解冻,重悬于补充有100ng/ml M-CSF的测定培养基(补充有10% FBS、100U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素和292 μ g/ml L-谷氨酰胺、NaPyr、HEPES、NEAA和10 μ M BME的RPMI1640)中,并以 5.5×10^4 个细胞/孔铺板于透明底的胶原包被的96孔板中,用于在7天内分化成巨噬细胞。在第4天添加新鲜的M-CSF(100ng/ml)。

[0505] 在测定前一天, Jurkat靶细胞在它们各自的生长培养基中分裂为 5×10^5 个细胞/ml。在实验当天,将靶细胞和单核细胞来源的巨噬细胞分别在补充有CellTrace CFSE染料或CellTrace Violet染料的PBS中在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂处温育15分钟。洗涤CFSE-标记的靶细胞并重悬于测定培养基(补充有10% FBS、100U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素和292 μ g/ml L-谷氨酰胺、NaPyr、HEPES、NEAA和10 μ M BME的RPMI 1640)中,并以 6×10^4 个细胞/孔的密度一式两份添加到96孔U型底板中。4抗SARS-CoV-2纤突蛋白和IgG1对照抗体在测定培养基中以1:5连续稀释度进行滴定,最终浓度为51fM至20nM,并添加到板中。零抗体点在GraphPad Prism中用10fM表示。

[0506] 在冰上温育15分钟后,将含有或不含滴定抗体的靶细胞混合物转移至含有紫色标记的巨噬细胞的板中,并将板在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂处温育30分钟。将孔用PBS洗涤三次,然后添加补充有2.5 μ M DRAQ5的4.21%甲醛的PBS溶液中。

[0507] 温育20分钟后,用PBS洗涤孔并使用Opera Phenix高含量筛选系统在488nm(CFSE标记的靶细胞)和375nm(紫色标记的巨噬细胞)激发通道中成像。在Harmony软件中进行图像分析。使用375nm激发通道中的图像分割来鉴定巨噬细胞群。使用488nm激发通道中的图像分割来鉴定靶细胞。通过鉴定其中含有靶细胞的巨噬细胞群来定量吞噬作用。

[0508] 通过比较进行吞噬作用的巨噬细胞数与总巨噬细胞数来计算吞噬作用百分比。从该值减去背景以得到%ADCP:(值)-(无抗体的平均值=背景吞噬作用)。对于EC50测定,使用GraphPad Prism在10点剂量反应曲线(包括无抗体对照)上使用4参数逻辑方程分析%

ADCP。最大(Max) %ADCP被确定为在测试剂量范围内测量的最高平均%ADCP值。对两个供体一式两份进行测定,并显示一个代表性供体的结果。

[0509] EC_{50} 值和最大(Max) %ADCP总结于表36中。当在Jurkat/hCD20/SARS-CoV-2纤突细胞中测试时,所有四种抗SARS-CoV-2纤突抗体与IgG1对照抗体相比均显示出更高的最大值%ADCP。抗SARS-CoV-2纤突抗体的 EC_{50} 值范围为2.72pM至6.33pM,并且最大值%ADCP范围为40.1%至56.7%。当在Jurkat/hCD20(阴性对照)靶细胞中进行测试时,所有四种抗SARS-CoV-2纤突抗体表现均类似于阴性对照抗体并且具有最小活性。

[0510] 表36:ADCP活性

| mAb# | Jurkat/hCD20 细胞 | | Jurkat/hCD20/SARS-CoV-2 纤突细胞 | |
|-----------------|-----------------|------------|------------------------------|------------|
| | EC_{50} [M] | 最大 (%ADCP) | EC_{50} [M] | 最大 (%ADCP) |
| [0511] mAb10933 | ND | 3.67 | 5.79E-12 | 53.4 |
| mAb10987 | ND | 5.60 | 6.33E-12 | 56.7 |
| mAb10989 | ND | 3.52 | 4.86E-12 | 56.0 |
| mAb10934 | ND | 2.05 | 2.72E-12 | 40.1 |
| IgG1 同种型对照 | ND | 1.97 | ND | 10.4 |

[0512] ND:未确定,因为未观察到浓度依赖性反应

[0513] Max(%ADCP)是测试剂量范围内的最高平均%ADCP值。

[0514] 实施例17:如通过ELISA测定的,抗SARS-CoV-2抗体阻断RBD与hACE2的结合

[0515] 使用基于ELISA的阻断测定以测定抗SARS-CoV-2抗体阻断SARS-COV-2纤突蛋白受体结合结构域(RBD)与其受体、人血管紧张素转化酶2(hACE2)结合的能力。

[0516] 这个测定中使用的SARS-CoV-2蛋白包含在c端处用人IgG1的Fc部分表达的SARS-CoV-2纤突蛋白(氨基酸Arg319-Phe541)的受体结合结构域(RBD)部分(SARS-CoV-2RBD-hFc)。实验中使用的人ACE2蛋白购自R&D系统公司并由具有c端10X组氨酸标签的氨基酸Gln18-Ser740组成(hACE2-His;NCBI登录号Q9BYF1)。

[0517] 使用以下程序进行实验。将单克隆抗五-His抗体(凯杰公司)在PBS中以1 μ g/ml在4 $^{\circ}$ C下涂覆在96孔微量滴定板上过夜。将hACE2-His受体以0.2 μ g/ml添加到PBS中并在室温(RT)下结合两小时。随后使用0.5%(w/v)的含BSA的PBS的溶液阻断非特异性结合位点。在其他微量滴定板中,将恒定量的100pM的SARS-CoV-2RBD-hFc蛋白与抗SARS-COV-2抗体和同种型IgG1抗体对照在PBS+0.5%BSA中以0.0008nM到50nM的稀释度结合。温育一小时后,将混合物溶液转移到微量滴定板涂覆的hACE2-His。在室温下温育1.5小时后,将孔洗涤,并用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗人IgG抗体(杰克森)检测板结合的SARS-COV2。然后根据制造商的建议使用TMB底物溶液(BD生物科学公司,#555214)对板进行显影,并在Victor X5读板仪上测量450nm处的吸光度。

[0518] 使用PrismTM软件(GraphPad)内的S形剂量应答模型分析结合数据。计算出的IC50值被定义为阻断50%的SARS-CoV-2RBD-hFc与板涂覆的hACE2-His结合所需的抗体浓度,将其用作阻断效力的指标。阻断百分比是基于使用这个公式测试的最高抗体浓度下观察到的背景校正结合信号定义的,并且针对所有测试的抗体进行了报告:

$$[0519] \text{ 阻断\%} = 100 - \left(\frac{[\text{实验信号}_{(\text{最高Ab浓度})} - \text{背景信号}_{(\text{缓冲液})}]}{[\text{最大信号}_{(\text{单独的hBGF, mFc})} - \text{背景信号}_{(\text{缓冲液})}]} \right) \times 100$$

[0520] 在最高测试浓度下阻断小于或等于50%的结合的抗体被分类为非阻断剂,并且未报告那些抗体的IC50值。

[0521] 使用阻断ELISA评估抗SARS-CoV-2抗体阻断SARS-CoV-2RBD与人ACE2结合的能力。在这个测定中,用各种浓度的抗SARS-CoV-2-S抗体滴定100pM SARS-COV-2RBD-hFc,并且评估了抗体的存在对RBD与hACE2-His结合的抑制。用HRP缀合的抗-hFc抗体检测板结合的RBD-hFc。

[0522] 抗SARS-CoV-2-S抗体在最高测试浓度下的阻断IC50和最大阻断汇总于表37中,并且阻断曲线在图2-9中示出。在所测试的46种抗体中,44种抗体显示出对RBD.hFc与hACE-2结合的抗体浓度依赖性阻断。在最高测试抗体浓度下,IC50值的范围为41pM到4.5nM,并且最大阻断范围为55%到约100%。在所测试的46种抗体中,两种抗体在测定条件下未示出阻断活性。如所期望的,无关的同种型对照抗体未示出阻断活性。

[0523] 表37:抗SAR-COV-2抗体对纤突RBD-hFc与固定的人ACE-2结合的阻断效力

| mAb | 测定运行# | 阻断 100pM (RBD).hFc 与 ACE2 IC ₅₀ , M | 阻断 100pM (RBD).hFc 与 ACE2 阻断% |
|-----------------|-------|---|----------------------------------|
| [0524] mAb10913 | 1 | 2.17E-10 | 80 |
| mAb10914 | 1 | 9.80E-10 | 93 |
| mAb10915 | 1 | 3.21E-10 | 99 |
| mAb10920 | 1 | 3.38E-10 | 95 |

| | | | | |
|--------|----------|---|----------|-----|
| | mAb10920 | 3 | 1.39E-10 | 87 |
| | mAb10921 | 1 | 4.33E-10 | 99 |
| | mAb10921 | 3 | 5.07E-10 | 94 |
| | mAb10922 | 2 | 6.65E-11 | 97 |
| | mAb10923 | 1 | 1.49E-10 | 94 |
| | mAb10923 | 3 | 1.84E-10 | 85 |
| | mAb10924 | 1 | 1.63E-10 | 98 |
| | mAb10924 | 2 | 1.27E-10 | 98 |
| | mAb10930 | 2 | 2.82E-10 | 86 |
| | mAb10932 | 1 | 3.73E-10 | 99 |
| | mAb10933 | 1 | 7.07E-11 | 99 |
| | mAb10933 | 3 | 6.53E-11 | 95 |
| | mAb10933 | 2 | 5.22E-11 | 101 |
| | mAb10934 | 1 | 6.60E-11 | 96 |
| | mAb10934 | 3 | 5.97E-11 | 98 |
| | mAb10934 | 2 | 4.80E-11 | 96 |
| | mAb10935 | 1 | 1.02E-10 | 99 |
| | mAb10935 | 2 | 6.94E-11 | 98 |
| | mAb10936 | 1 | 8.75E-11 | 95 |
| | mAb10936 | 2 | 7.10E-11 | 97 |
| | mAb10937 | 1 | 6.49E-11 | 99 |
| | mAb10938 | 1 | 2.75E-10 | 99 |
| | mAb10939 | 1 | 1.75E-10 | 97 |
| [0525] | mAb10939 | 3 | 2.63E-10 | 93 |
| | mAb10940 | 1 | 6.52E-11 | 92 |
| | mAb10941 | 1 | 2.27E-10 | 100 |
| | mAb10941 | 2 | 2.06E-10 | 100 |
| | mAb10954 | 2 | 7.11E-11 | 95 |
| | mAb10955 | 2 | 1.41E-10 | 97 |
| | mAb10956 | 2 | 1.85E-10 | 99 |
| | mAb10957 | 2 | 1.69E-10 | 99 |
| | mAb10964 | 3 | 6.83E-11 | 93 |
| | mAb10964 | 2 | 6.25E-11 | 95 |
| | mAb10965 | 2 | 2.13E-10 | 97 |
| | mAb10966 | 2 | 1.60E-10 | 99 |
| | mAb10967 | 2 | 2.80E-10 | 98 |
| | mAb10969 | 3 | 2.15E-10 | 95 |
| | mAb10970 | 2 | 1.07E-10 | 97 |
| | mAb10971 | 2 | 1.49E-10 | 98 |
| | mAb10977 | 3 | 8.71E-11 | 77 |
| | mAb10977 | 2 | 7.11E-11 | 65 |
| | mAb10982 | 2 | 1.16E-10 | 93 |
| | mAb10984 | 2 | 7.75E-11 | 90 |
| | mAb10985 | 3 | 6.96E-11 | 97 |
| | mAb10985 | 2 | 4.11E-11 | 99 |
| | mAb10986 | 2 | 7.54E-11 | 98 |
| | mAb10987 | 3 | 2.85E-10 | 93 |

| | | | | |
|--------|-------------------|---|----------|-----|
| | mAb10987 | 2 | 1.81E-10 | 95 |
| | mAb10988 | 2 | 8.64E-11 | 95 |
| | mAb10989 | 3 | 5.91E-11 | 96 |
| | mAb10989 | 2 | 4.28E-11 | 98 |
| | mAb10996 | 3 | 6.10E-09 | 71 |
| | mAb10998 | 3 | 4.30E-09 | 55 |
| | mAb11000 | 3 | 4.50E-09 | 75 |
| [0526] | mAb11002 | 3 | NBD | 7 |
| | mAb11004 | 3 | NBD | 9 |
| | mAb11006 | 3 | 2.20E-10 | 85 |
| | mAb11008 | 3 | 1.49E-09 | 93 |
| | mAb11010 | 3 | 1.47E-10 | 83 |
| | mAb193250 IgG1 对照 | 1 | -- | -8 |
| | mAb193250 IgG1 对照 | 3 | -- | -19 |
| | mAb193250 IgG1 对照 | 2 | -- | -15 |

[0527] 注意：将100pM的RBD-hFc用抗SARS-CoV-2-S抗体以从50nM开始的系列稀释度滴定，并将RBD-hFc结合在具有10x组氨酸标签的固定的hACE2上，并用HRP缀合的抗hFc抗体进行检测。NBD；未检测到阻断。

[0528] 实施例18：切割的SARS-CoV-2纤突蛋白的中和和用Fab中和

[0529] 因为含有SARS-CoV-2纤突的假颗粒可以在HEK293T细胞中的生物发生过程中被弗林蛋白酶样蛋白酶在多元S1/S2切割位点预先切割，所以评估了这种切割对mAb中和效力的影响。产生了在S1/S2界面或缺失区域(FurKO)具有一元切割位点(FurMut)的纤突稳定假颗粒(图12A)。在Vero细胞中，相对于野生型(WT)，含有假颗粒的FurMut或FurKO的中和没有观察到差异(图12B)。有趣的是，稳定的假颗粒在Vero细胞中具有与具有WT切割位点的那些相当或更大的感染性，而在Calu-3细胞中观察到显著的感染性损失(图12C)。还观察到S1/S2连接的天然缺失的SARS-CoV-2在Calu-3细胞中具有感染性缺陷，但在Vero细胞中没有，这表明这两种细胞类型之间使用不同的蛋白酶。为了研究中和机制，产生了这些抗体的Fab片段。将IgG抗体与相应的Fab并列比较它们中和假型VSV的能力(图13)。所有Fab的IC50与其亲本IgG相比发生了变化，表明二价结合、交联和空间位阻都可能增强中和。

[0530] 实施例19：抗SARS-CoV-2-S mAb之间的交叉竞争

[0531] 在交叉竞争结合测定中检查了mAb10987、mAb10989、mAb10933和mAb10934(图14)，从而鉴定出几对具有皮摩尔中和效力的非竞争性mAb，其可能潜在地组合以形成抗体混合物，例如mAb10987和mAb0933。

[0532] 抗SARS-CoV-2-S mAb的表位分箱使用具有10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) 吐温-20、pH 7.4、1mg/mL BSA的运行缓冲液的富迪(ForteBio)Octet HTX生物层干涉仪(富迪生物分子装置公司(Molecular Devices ForteBio LLC)，加利福尼亚州菲蒙)以预混合夹心形式进行，所述预混合夹心形式涉及mAb以成对组合方式相互竞争与SARS-CoV-2RBD-MMH蛋白结合。在30°C下以1000rpm连续搅拌进行测定。在运行缓冲液中获得初始基线后，将20μg/mL的抗COVID19 mAb捕获到抗人Fc(AHC)生物传感器尖端300秒。为了阻断AHC生物传感器尖端上剩余的游离不饱和结合位点，将所有传感器暴露于含有100μg/mL无关IgG1的阻断溶液孔240秒。在该过程之后，将生物传感器浸入含有100nM SARS CoV-2RBD-MMH蛋白和600nM第二mAb的抗COVID19 mAb结合位点的预混合溶液的孔中300秒。记录每个步骤的结合

反应,并通过从数据集中减去自阻断mAb竞争对照来归一化特定信号。用使用表位分箱的Octet数据分析HT 10.0软件进行数据分析。

[0533] 将交叉竞争结合测定与上文所描述的HDX-MS结果进行比较深入了解了非竞争性抗体对可以同时结合RBD并且可以因此成为治疗性抗体混合物的理想配体的机制。mAb10987和mAb10933表示此类抗体对。mAb10933靶向ACE2界面的一个边缘上的纤突状环区。在所述区内,显示出最显著受mAb10933 HDX保护的残基面朝上,这表明mAb10933的Fab区从顶部方向与RBD结合,其中mAb10933将与ACE2发生显著碰撞。为了避免与mAb10933竞争,mAb10987仅可从正面或左下侧(在图15中的mAb10987的前视图中)与HDX定义的受保护区结合。这与上文所描述的中和数据一致,因为mAb10987会将其定向成处于极有可能干扰ACE2的位置。

[0534] 实施例20:抗体结合的纤突蛋白的结构测定

[0535] 为了更好地了解mAb10933和mAb10987与纤突蛋白RBD的结合,通过低温电子显微镜(cryoEM)进行了结构分析。使用FabALACTICA试剂盒(Genovis)分离mAb10933和mAb10987的Fab片段。将600 μ g的mAb10933 Fab和600 μ g的mAb10987 Fab与300 μ g的SARS-CoV-2-S RBD混合并在冰上温育~1小时,然后注射到平衡到50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl的Superdex 200增加凝胶过滤柱中。收集含有mAb10933 Fab-mAb10987 Fab-RBD复合物的峰级分,并将其使用10kDa MWC0离心过滤器浓缩。对于cryoEM网格制备,将蛋白质样品稀释到1.5mg/mL,并添加0.15% PMAL-C8 amphipol。将3.5 μ L的蛋白质沉积到刚用等离子体清洁的Ultrafoil网格(1.2/1.3,300目)上。使用滤纸将多余溶液吸干,并使用Vitrobot Mark IV将其速冻成液态乙烷。将cryoEM网格转移到配备有K3检测器(加坦公司(Gatan))的Titan Krios(赛默飞世尔公司)。使用EPU(赛默飞世尔公司)以对应于0.85 \AA 的像素大小的105,000倍的放大率收集影片。使用每秒每像素15个电子的剂量速率,并且每个影片为2秒,对应于每 \AA^2 ~40个电子的总剂量。

[0536] 所有cryoEM数据处理均使用cryoSPARC v2.14.2进行。使用补丁运动校正和补丁CTF估计将2,821个影片对齐。基于估计的散焦值和CTF拟合分辨率,选择2,197张对齐的显微照片进行进一步处理。使用斑点拾取器拾取的一组初始颗粒经过2D分类以生成用于模板拾取的模板。通过模板拾取而拾取的989,553个颗粒经过多轮2D分类以去除未结合的fab和含有不完整复合物的颗粒。从头进行三类重建产生含有对应于mAb10933 Fab-mAb10987 Fab-RBD复合物的61,707个颗粒的单个类别。这个类别中的颗粒的异质性细化、然后非均匀细化导致含有用于模型构建的含有48,140个颗粒的3.9 \AA 分辨率(FSC=0.143)图。我们将RBD(获取自PDB代码6M17)和两个Fab(获取自先前的抗体结构,除来自PDB代码5U15的mAb10987的 λ 轻链之外)的模型手动放置到这个图中。然后使用Coot手动重建这些模型,并使用Phenix根据图对实际空间进行细化。

[0537] 确认上文所描述的数据后,SARS-CoV-2纤突RBD与mAb10933和mAb10987的Fab片段结合的复合物的单颗粒cryoEM示出了这个混合物中的两种抗体可以与RBD的不同区同时结合(图16和图17)。复合物的标称分辨率为3.9 \AA 的3D重构图示出了两个Fab片段在RBD的不同表位处结合,从而证实其是非竞争性抗体。mAb10933在RBD的顶部结合,从而与ACE2的结合位点广泛重叠。另一方面,mAb10987的表位位于RBD的一侧,充分远离mAb10933表位,并且

与ACE2结合位点几乎没有重叠。

[0538] 实施例21:针对逃逸突变体的出现的保护

[0539] 由于迅速出现的病毒突变体正成为对抗全球大流行病的斗争中的下一个主要关注点,因此治疗性治疗提供对抗循环变体的覆盖并且不会有助于治疗出现的抗性的发展是很重要的。为此,研究了纤突蛋白的序列多样性,并监测了在自然界中发现或从临床前体外和体内研究以及临床中鉴定的SARS-CoV-2分离株中小病毒变体的出现。非竞争性抗体的组合不仅提供了对循环变体的完全覆盖,而且防止这些变体的出现和它们在临床环境中可能播种到人群中。

[0540] 尽管使用重组病毒的体外逃逸研究强烈地支持使用非竞争性抗体组合来避免抗性的基本原理,但是关于这些发现与真正的SARS-CoV-2病毒、体内感染模型以及最重要的临床环境的相关性仍然存在问题。在该实施例中,针对靶向纤突蛋白的受体结合结构域(RBD)的所有单独的临床阶段抗体快速选择体外逃逸变体,而不依赖于靶向表位或其保守程度,但是通过利用两种非竞争性抗体的非竞争性组合减轻了该风险,并且通过组合三种非竞争性抗体甚至进一步降低了该风险。在感染的仓鼠模型中,在用单独的抗体治疗后,逃逸变体也在体内被有效地选择,不依赖于剂量或治疗环境(预防或治疗),而mAb10933和mAb10987的组合完全防止了这种抗性的发展。重要的是,这些发现在人类中得到了证实:来自正在进行的1-3期试验的1,000名门诊患者或确诊COVID-19住院患者的4,882个样品中整个纤突蛋白的遗传多样性得到了证实。对安慰剂和用mAb10933+mAb10987治疗的患者的基线和治疗后序列多样性的分析表明,非竞争性抗体组合防止选择纤突蛋白抗性变体。

[0541] 随着最近迅速出现的变体的增加,有必要检验这样的假设,即非竞争性抗体组合将随着病毒在人群中传播过程中的进化而保持其效力,并防止在治疗后选择逃逸突变体。通过评估单独的抗体以及mAb10933和mAb10987的组合针对所关注的变体(诸如含有UK B.1.1.7、加利福尼亚B.1.429和E484K的变体,包括南非B.1.351、巴西P.1和世界各地的多种其他谱系诸如纽约B.1.526谱系)的效力来检验此假设。即使在其中一种抗体受到影响的情况下,该组合仍保持完全中和效力,这是最初选择该抗体组合的关键性质(图23A和图23B)。

[0542] 材料与方法

[0543] 体外逃逸研究和中和测定

[0544] 上文和美国专利10,787,501中已经详细描述了假颗粒产生、中和测定和逃逸研究的方法。

[0545] 中和测定

[0546] 将水泡性口炎病毒(VSV)用SARS-CoV-2纤突蛋白假型化,并如前所述用于中和测定。简言之,将HEK293T细胞(ATCC CRL-3216)用编码野生型(Wuhan-Hu-1)或变体纤突蛋白的SARS-CoV-2纤突表达质粒转染。在转染后24小时,用编码报告构建体的修饰VSV代替天然病毒糖蛋白以1的MOI感染细胞。在感染后24小时收集含有假颗粒的上清液,并在使用前在-80°C冷冻。通过用与连续稀释的抗体预温育的SARS-CoV-2假颗粒感染Vero细胞(ATCC:CCL-81)进行中和测定。然后在感染后24小时读出病毒报告信号以确定每种抗体的IC₅₀值。

[0547] 体外逃逸研究

[0548] 用重组VSV纤突病毒进行逃逸研究。抗体从100μg/mL开始以1:5连续稀释。通过筛

选细胞病变效应来监测病毒复制。从具有最高抗体浓度和明显病毒复制的孔中收集上清液。使用TRIzol (Life Technologies) 按照制造商的下一代测序方案从细胞中提取总RNA。对于第二轮选择,使100uL含有病毒的上清液在与之前相同或更大的抗体浓度下通过。再次收集上清液,从具有明显病毒复制的最高抗体浓度的孔中的细胞中提取RNA,并进行RNAseq分析。

[0549] 仓鼠研究

[0550] 在研究中使用了总共80只金色仓鼠,雄性,约9周龄(130-150g)。在研究开始之前对动物称重。在研究期间,每天两次监测动物的COVID-19疾病的征兆(皱纹毛皮、驼背姿势、反应能力、流鼻涕、呼吸困难、口气)。在研究期间每天测量一次体重。通过腹膜内(IP)注射(0.200ml体积)给予抗体。用 1×10^4 PFU的USA-WA1/2020(NR-52281;BEI Resources)通过将总共0.05ml的病毒接种物,0.025ml逐滴施用到每个鼻孔中挑战动物(模拟暴露的动物接受相同体积的无菌PBS)。在治疗和病毒施用之前,使用吸入异氟烷对动物进行镇静。在研究结束时(挑战后第7天),通过吸入CO₂对动物实施安乐死,并无菌收集组织样品用于RNAseq。使用Trizol试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)灭活组织样品。所有动物研究均按照所有相关的地方、州和联邦法规进行,并得到德克萨斯生物医学机构动物护理和使用委员会(IACUC;协议号1739MA)的批准。

[0551] 临床试验设计

[0552] 门诊临床试验

[0553] 这是一项在COVID-19门诊患者中进行的适应性、多中心、随机、双盲、安慰剂对照、无缝1/2/3期临床试验(clinicaltrials.gov:NCT04425629)。将年龄>18岁的非住院患者、SARS-CoV2阳性测试结果<72小时和随机分组前症状发作<10天以1:1:1随机分组,接受安慰剂、2.4g (mAb10933(卡西瑞单抗)和mAb10987(伊德维单抗)各1.2g)或8.0g(卡西瑞单抗和伊德维单抗各4.0g)。主要病毒学终点是从基线(第1天)到第7天病毒载量的时间加权平均每日变化。关键的次要临床终点是到第29天进行1名或更多Covid-19相关医疗护理就诊(MAV)的患者比例。对于本研究,分析了从总共728名患者中取回的3523个鼻咽样品、17个鼻样品和6个唾液样品。

[0554] 住院患者临床试验

[0555] 这是一项在患有Covid-19的住院患者中进行的适应性、多中心、随机、双盲、安慰剂对照、无缝1/2/3期临床试验(clinicaltrials.gov:NCT04426695)。将年龄>18岁的住院患者、SARS-CoV2阳性测试结果<72小时和随机分组前症状发作<7天以1:1:1随机分组,接受安慰剂、2.4g(卡西瑞单抗和伊德维单抗各1.2g)或8.0g(卡西瑞单抗和伊德维单抗各4.0g)。主要临床终点是第29天死亡或需要机械通气的发生率。对于本研究,分析了从总共272名患者中取回的968个鼻咽样品、249个鼻样品和119个唾液样品。

[0556] 病毒RNA、RT-PCR和测序

[0557] 从仓鼠样品和临床试验中收集的样品(Viracor-Eurofins, MO, USA)中提取病毒RNA。对于临床样品,通过定量RT-PCR(Viracor-Eurofins, MO, USA)确定病毒载量的定性和定量测量。通过PureBeads(Roche Sequencing)纯化与25ng人通用参考RNA(Agilent)组合的10ul RNA。使用SuperScript™IV第一链合成系统(Thermal Fisher)按照供应商的方案进行cDNA合成。然后按照供应商的方案,使用Swift Normalase™Amplicon Panel(SNAP)SARS-

CoV-2Panel (Swift Biosciences) 将一半cDNA (10u1) 用于生成文库。在NextSeq (Illumina) 上通过2×150个循环的多重配对读取运行进行测序。生成了总体质量报告,总结了每个样品中的所有读数以及每个碱基对的质量。

[0558] 变体调用分析

[0559] 使用Minimap2 (v2.17) 将Swift扩增子批量RNA-seq读数与SARS-CoV-2参考基因组 Wuhan-Hu-1 (登录号:MN908947) 进行比对。通过读取名称对比进行分类,并且通过互补 Swiftbiosciences primerclip软件 (v0.3.8) (github.com/swiftbiosciences/primerclip) 对引物进行剪切。使用Picard软件包 (<https://github.com/broadinstitute/picard>) 删除重复读数并用自定义脚本总结每个样品的目标覆盖。使用GATK HaplotypeCaller (v4.1.8) 进行单核苷酸多态性 (SNP) 调用。在每个SNP处,从测序读数推断的病毒突变的频率根据samtools (v1.9) 堆积输出计算。如果核苷酸位置被至少10个读数覆盖并且在这些位置的突变读数的频率为至少15%,则标记变体。

[0560] 来自SARS-CoV-2公共基因组的变体调用

[0561] 如Baum等人,科学 (Science) 370 (6520):1110-1115 (2020) 中所述进行SARS-CoV-2公共基因组的变体调用。SARS-CoV-2完整基因组序列于2021年2月4日从GISAID核苷酸数据库 (<https://www.gisaid.org>) 下载。对序列进行整理,并使用定制流水线在高质量基因组序列中评估纤突编码基因的遗传多样性。简而言之,Blastn用于将Wuhan-Hu-1纤突核苷酸序列 (登录号:MN908947) 与每个单独的基因组进行比对。分析结果,并且如果比对长度大于95%,同一性百分比大于70%,则验证基因的存在。提取、翻译并比对同源纤突蛋白序列,以鉴定相对于参考的氨基酸变化。

[0562] 结果

[0563] 如上所示,使用靶向SARS-CoV-2纤突蛋白的非重叠表位的两种抗纤突抗体的联合疗法使在体外用单一疗法观察到的快速病毒逃逸的可能性最小化。在使用VSV-SARS-CoV-2-纤突重组病毒监测对mAb治疗的抗性的这项工作的扩展中,用在紧急使用授权下或在临床试验中批准的几种RBD靶向mAb作为单一疗法以及双重和三重组进行逃逸研究。虽然只有一到两次传代导致对用作单一疗法的所有mAb的完全病毒抗性,但需要连续七次传代才能达到对REGEN-COV组合的完全抗性,需要影响每种抗体的多个同时突变 (图24A和图24B)。用比较抗体COV2-2130、COV2-2196、CB6和COV555鉴定的逃逸变体与之前的报告一致。与mAb10933+mAb10987 (也称为REGEN-COV) 组合类似,COV2-2130和COV2-2196混合物也能抵抗快速逃逸 (图24A)。

[0564] 在单一疗法环境中观察到的快速逃逸与靶表位或其序列保守性无关;实际上,针对靶向泛冠状病毒表位的抗体VIR-7831快速选择逃逸变体 (图24A和图24B)。所有VIR-7831逃逸残基映射到已公布的抗体表位,由此产生的逃逸病毒保持其复制能力,表明这些突变对病毒无害。此外,鉴定的逃逸变体可以在公众可获得的基因组序列 (GISAID) 中发现,表明它们被真正的SARS-CoV-2病毒耐受,并且可能在压力下被选择。这些实验突出了用任何抗纤突mAb针对SARS-CoV-2的单一疗法的固有风险,无论靶向表位或其保守性如何。

[0565] 组合三种靶向SARS-CoV-2的RBD的非竞争性中和mAb (mAb10933+mAb10987+mAb10985) 具有潜在的优势。这三种mAb都能够以非重叠方式同时结合纤突蛋白的RBD,并且该组合具有与REGEN-COV相似的中和效力 (图24C和图24D)。添加第三种非竞争性RBD mAb

(mAb10985)进一步增强了对病毒逃逸的保护,在十一次连续传代中没有观察到抗病毒效力损失(图24A和图24B)。这些结果表明,靶向纤突RBD的三种mAb中和非竞争性组合作为SARS-CoV-2治疗剂提供了潜在的进一步优势。

[0566] 为了理解这些体外逃逸发现如何证明mAb组合治疗防止药物抗性发展转化为更生理的环境,在SARS-CoV-2仓鼠挑战模型中,作为单一疗法(mAb10987或mAb0933)和作为REGEN-COV组合施用mAb后,体内评估病毒进化。用SARS-CoV-2(USA-WA1/2020)挑战动物,并用高或低剂量(50mg/kg或5mg/kg)的mAb10987或mAb10933作为单一疗法或用REGEN-COV组合(50mg/kg或5mg/kg)在预防和治疗环境中治疗(图25A)。先前显示这些剂量在该患有REGEN-COV的动物模型中提供部分或完全功效。在挑战后第8天收集感染动物的肺以分离病毒RNA。RNAseq分析用于检测即使在病毒群体中以低频率(>15%)存在的纤突蛋白中的变体。为了鉴定推定的治疗抗性变体,分析集中在纤突RBD,已知REGEN-COV抗体结合在该处,并且定位了针对任一种抗体的所有先前鉴定的抗性变体。对盐水处理的动物中的RBD序列的分析没有揭示任何变体,表明在没有处理的情况下,病毒在该模型中不处于强选择压力下(图25B和图25C)。然而,在用任一单一抗体作为单一疗法治疗的动物中鉴定了RBD中的几种变体(图25B和图25C)。值得注意的是,该分析表明在几乎一半(18/40)的单一疗法治疗的动物中选择了抗性变体,而在使用REGEN-COV合物治疗的动物中没有选择抗性变体(0/20)。在单一疗法处理的动物中鉴定的7种RBD变体中,6种先前已被描述为抗性变体,或定位到与mAb10933或mAb10987的其他抗性变体相同的氨基酸位置(图34)。在体外逃逸研究中鉴定了这些变体中的四种,证实了使用VSV-SARS-CoV-2-纤突重组病毒鉴定SARS-CoV-2逃逸突变的相关性。有趣的是,在预防和治疗环境中,以及在低剂量组和高剂量组中,用单一疗法治疗都发生了变体选择。

[0567] 为了评估REGEN-COV治疗的COVID-19患者中耐药性的出现,在基线和mAb混合物施用后的几个时间点表征分别从272个住院个体和728个非住院个体分离的1,336和3,546个SARS-CoV-2RNA样品的遗传多样性(图30)。在住院和非住院研究组中,患者被随机分配(1:1:1)接受安慰剂、2.4g REGN-COV2或8.0g REGN-COV2,并且在从基线(第1天)到研究终点(第29天)的多个时间点收集患者样品。进行了RNA-seq分析以通过qRT-PCR表征来自SARS-CoV-2RNA阳性的所有拭子的纤突序列的遗传多样性。鉴定了在病毒群体中以至少15%的频率存在的次要变体。在住院患者和非住院患者的所有样品中,总共分别鉴定出244和514个氨基酸变化。对于这两项研究,所有三个治疗组中的变异计数和频率相似,表明REGEN-COV相对于安慰剂没有增加纤突蛋白多样性(图30)。

[0568] 为了确定REGEN-COV治疗是否有助于选择纤突蛋白中的抗性变体,纵向比较了每个患者的所有可用RT-PCR阳性样品的次要变体的频率。在住院组的所有患者样品中,安慰剂、低剂量和高剂量治疗组分别鉴定出总共89、87和108个氨基酸变化。这些突变均匀地分布在纤突蛋白序列上(图26A和图26B)。在来自用REGEN-COV治疗的患者的样品中发现的RBD变体数量较少,这进一步表明相对于安慰剂缺乏治疗紧急选择(安慰剂组中15个RBD变体与REGEN-COV治疗组中12个低剂量/12个高剂量)。在多于一个时间点,在至少一个患者中仅观察到17%(42/244)的所有氨基酸变化(图26B),表明大多数变体随时间丢失,可能是由于缺乏适应性或人口瓶颈。仅在REGEN-COV治疗组的RBD中发现了这些变体中的三种(S477N、N501T和K537R)。S477N变体在多个时间点存在于7个REGEN-COV治疗的患者中,包括

基线(图31A和31B)。S477N是一种常见的SARS-CoV-2变体,其存在频率>5%的世界范围内传播的病毒(来源:GISAID)。在1个接受治疗的患者中鉴定出K537R,它是一种罕见突变,迄今为止仅在全球<10种病毒分离株中发现该突变(图27A和图27B,来源:GISAID)。在该研究中,在3个接受治疗的患者中观察到N501T(图27A和图27B)。值得注意的是,在所有患者中,在基线或最早时间点(REGEN-COV治疗后<5天)鉴定出三种变体,并且在早期与晚期时间点之间没有观察到其频率的显著增加,表明缺乏治疗相关的选择。

[0569] 在来自非住院组的1,215个安慰剂、1,203个低剂量和1,128个高剂量REGEN-COV治疗的患者样品中分别鉴定出总共216、248和212个氨基酸变化,分布在整个纤突蛋白序列中(图28A和28B)。RBD分别含有23、27和31个氨基酸变化,其中在至少一个REGEN-COV治疗的患者中在多于一个时间点鉴定出S477N和仅2个其他变体(S494P和G446V)(图28B)。S477N变体在多个时间点存在于3个REGEN-COV和5个安慰剂治疗的患者中,包括基线(图32A和32B)。S494P是仅在2个REGEN-COV治疗的患者中在多个时间点(包括基线)发现的罕见循环突变(约0.15% GISAID)。G446V是在4个REGEN-COV治疗的患者和2个安慰剂患者中鉴定出的罕见变体(约0.02% GISAID)(图29A、图29B-1和图29B-2)。这些患者中的一个(图29B-1-患者B4)表示该变体的相对频率的持续晚期增加的唯一示例;虽然这可以代表该患者的治疗选择,但是应当指出,没有证据表明变体的绝对频率随时间增加,因为病毒水平随时间显著下降。对于所有G446V患者,包括患者B4,变体的频率在最近的时间点降低到无法检测到,表明药物介导的选择是不太可能的。

[0570] 为了确定在REGEN-COV治疗的患者中在多个时间点鉴定的RBD变体的功能影响,评估了单独的抗体和组合对G446V、S494P、S477N和K537R变体的中和效力(图33A和图33B)。针对G446V变体的mAb10987(135倍)和针对S494P变体的mAb10933(4.5倍)观察到中和效力降低,而针对S477N或K537R变体的mAb均未观察到影响。未评估N501T变体,但另选替代N501Y对任一抗体或REGEN-COV组合未显示任何影响。重要的是,在所有情况下,REGEN-COV组合都保留了完全中和效力,从而在治疗的个体中提供了完全抗病毒活性并限制了抗性变体的任何潜在选择。

[0571] *****

[0572] 本文引用的所有参考文献均通过引用并入,达到如同每个单独的出版物、数据库条目(例如,Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利被专门且单独地指示通过引用并入的相同程度。申请人意图通过引用将这一并入声明与每一个单独的出版物、数据库条目(例如,Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或所标识的专利相关联,即使这样的引用不直接与通过引用并入的专用声明相邻。在说明书中包含通过引用并入的专有说明(如果有的话)并不以任何方式削弱通过引用并入的一般性声明。本文引用参考文献并非旨在承认所述参考文献是相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文献的内容或日期的任何承认。

| 在纤突蛋白中的位置 | 74 | 79 | 259 | 444 | 445 | 450 | 453 | 484 | 486 | 655 | 682 | 685 | 687 | 769 | 779 | 1128 |
|---------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 原始残基 | N | F | T | K | V | N | Y | E | F | H | R | R | V | G | Q | V |
| 突变残基 | K | I | K | Q | A | D | F | K | V | Y | Q | S | G | E | K | A |
| mAb10989 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mAb10987 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mAb10933 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mAb10934 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mAb10987 + mAb10933 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mAb10989 + mAb10934 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IgG1同种型对照 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 仅病毒对照 | | | | | | | | | | | | | | | | |

图1

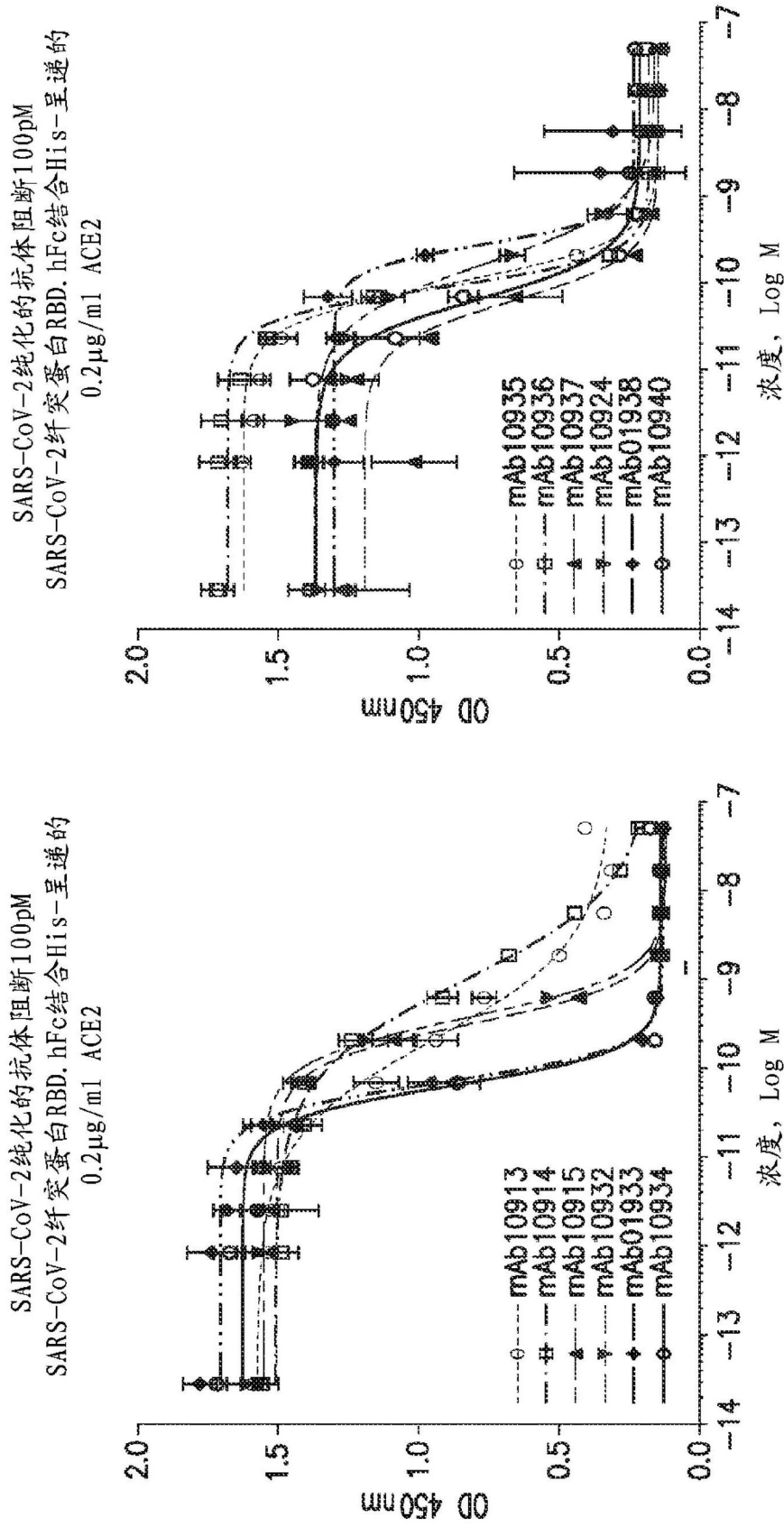


图2

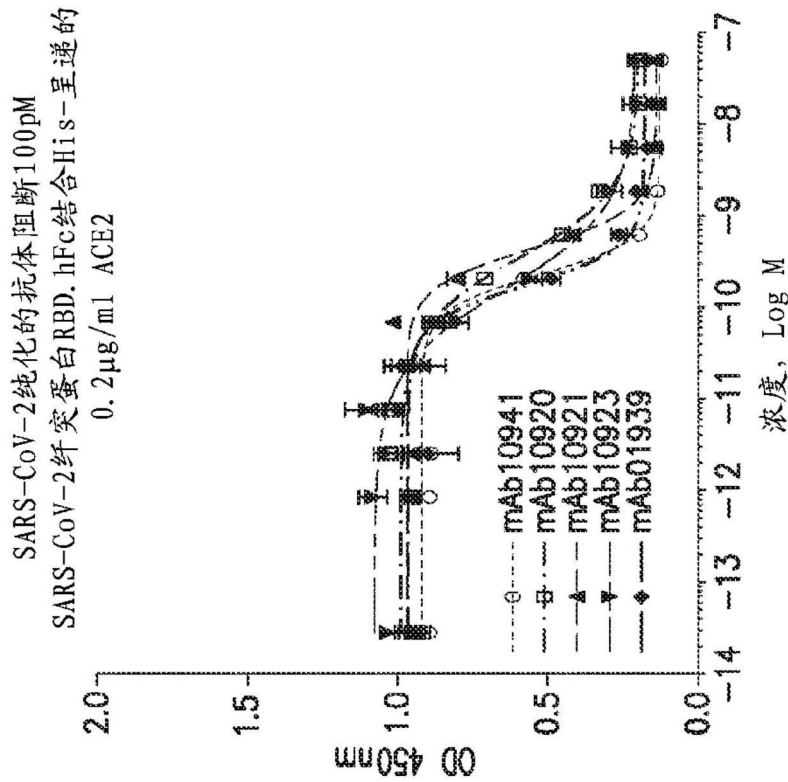
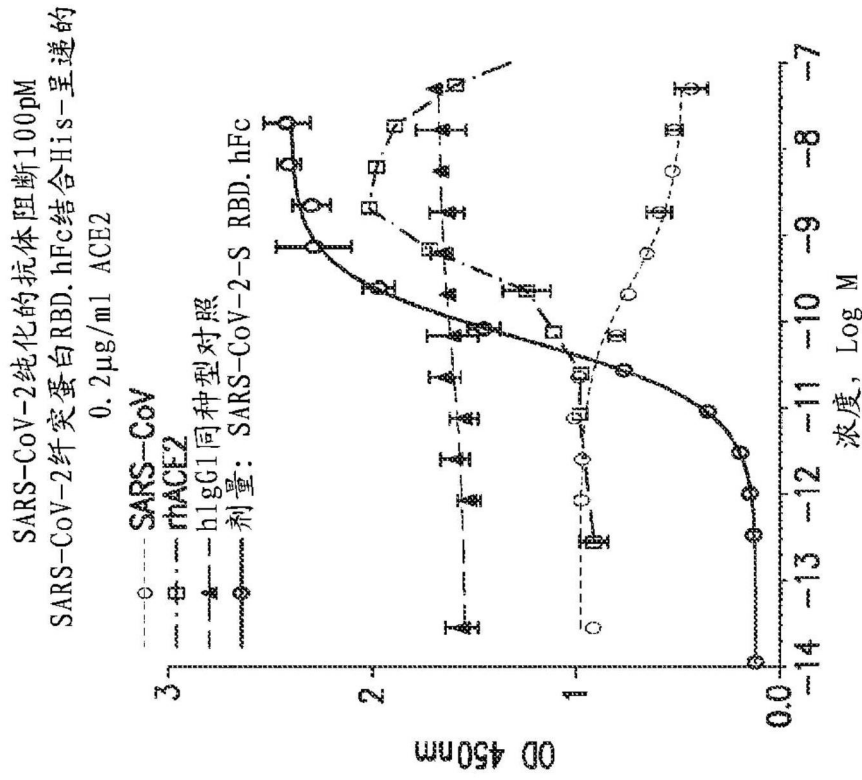


图3

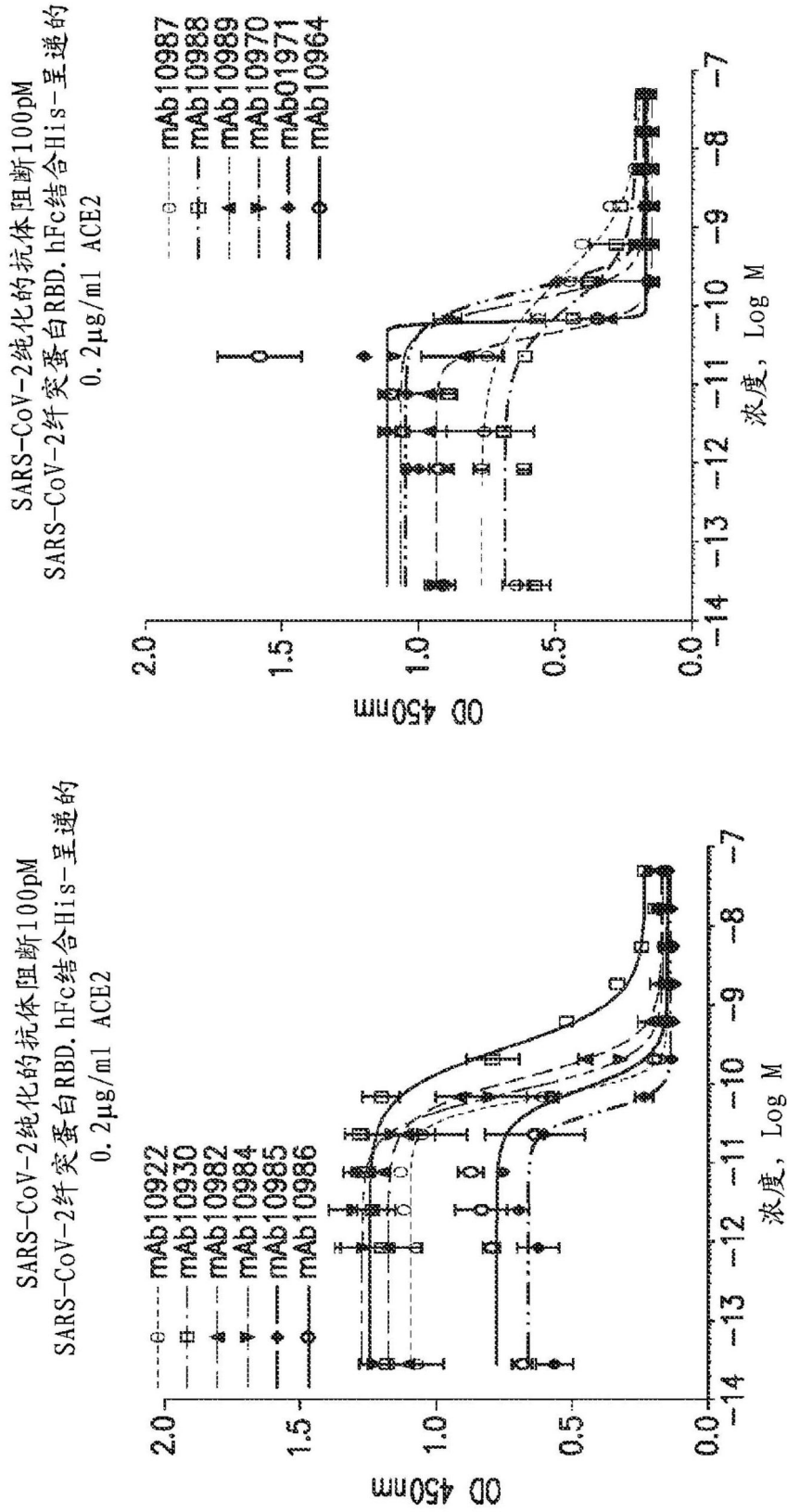


图4

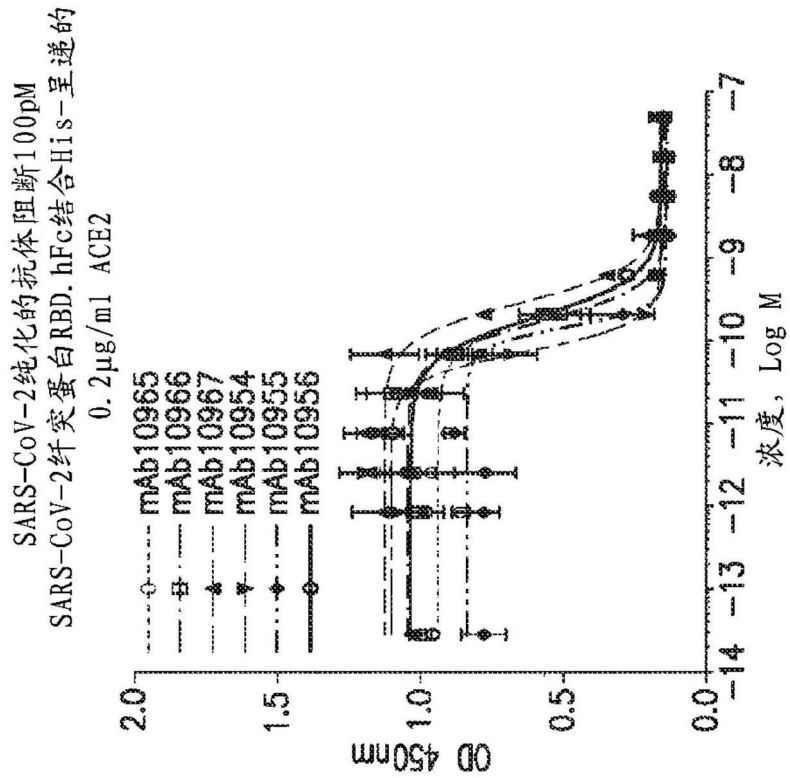
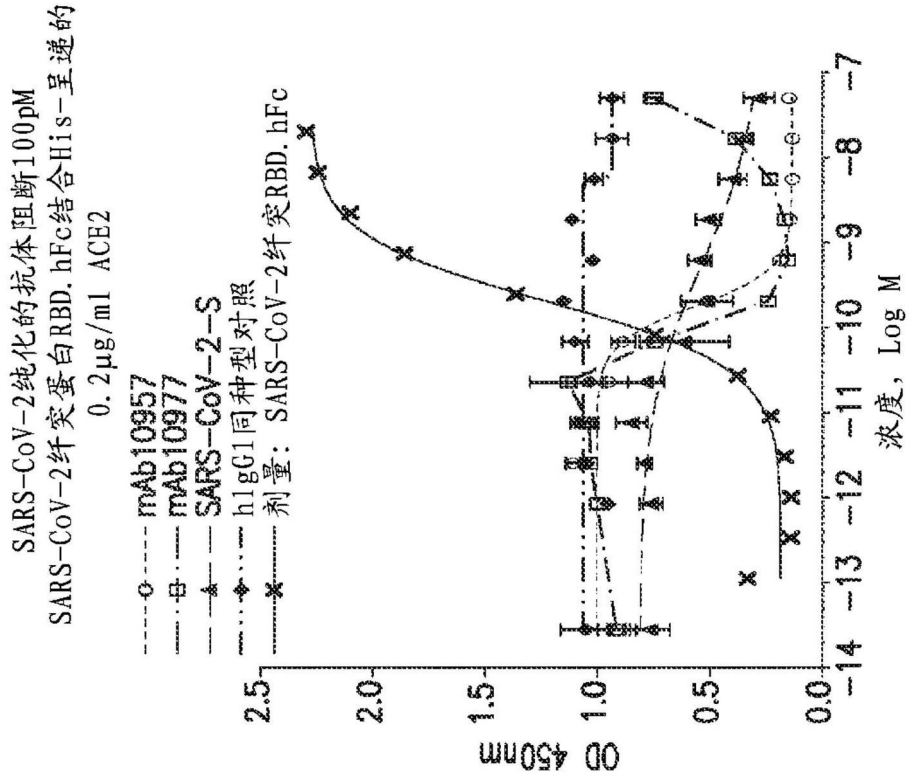


图5

SARS-CoV-2纯化的抗体阻断100pM
SARS-CoV-2纤突蛋白RBD. hFc结合His-呈递的
0.2μg/ml ACE2

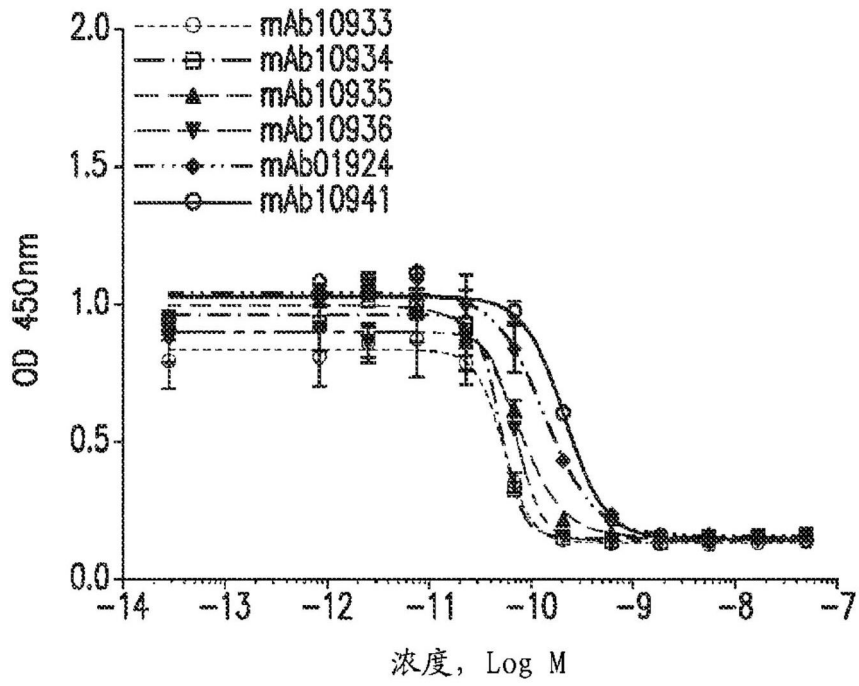


图6

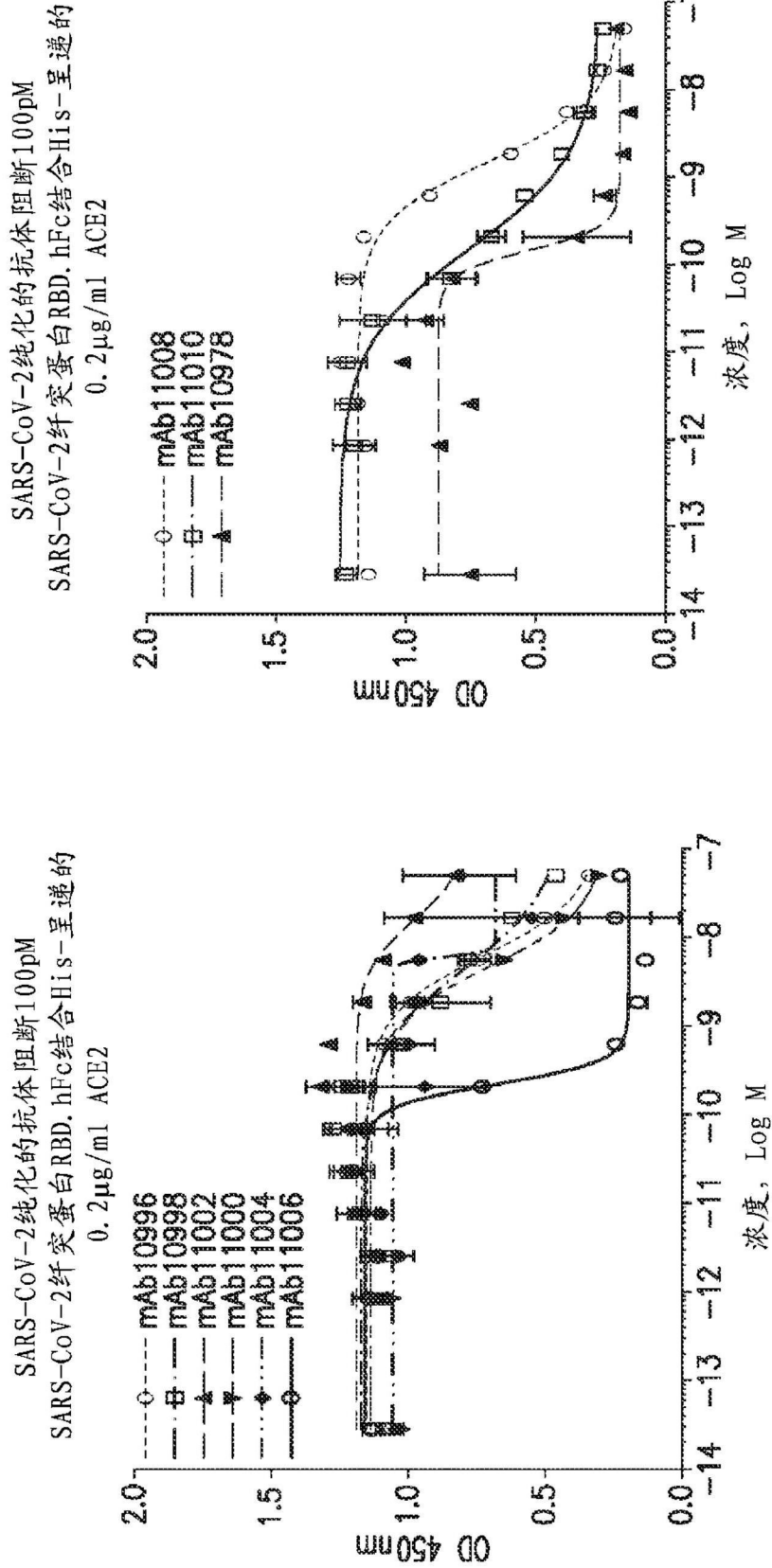


图7

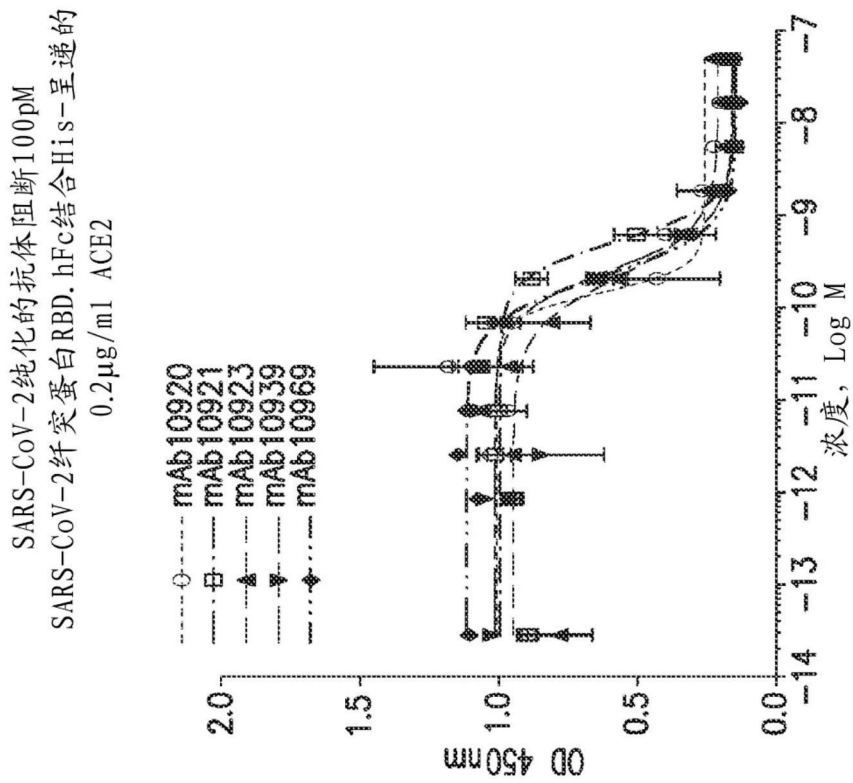
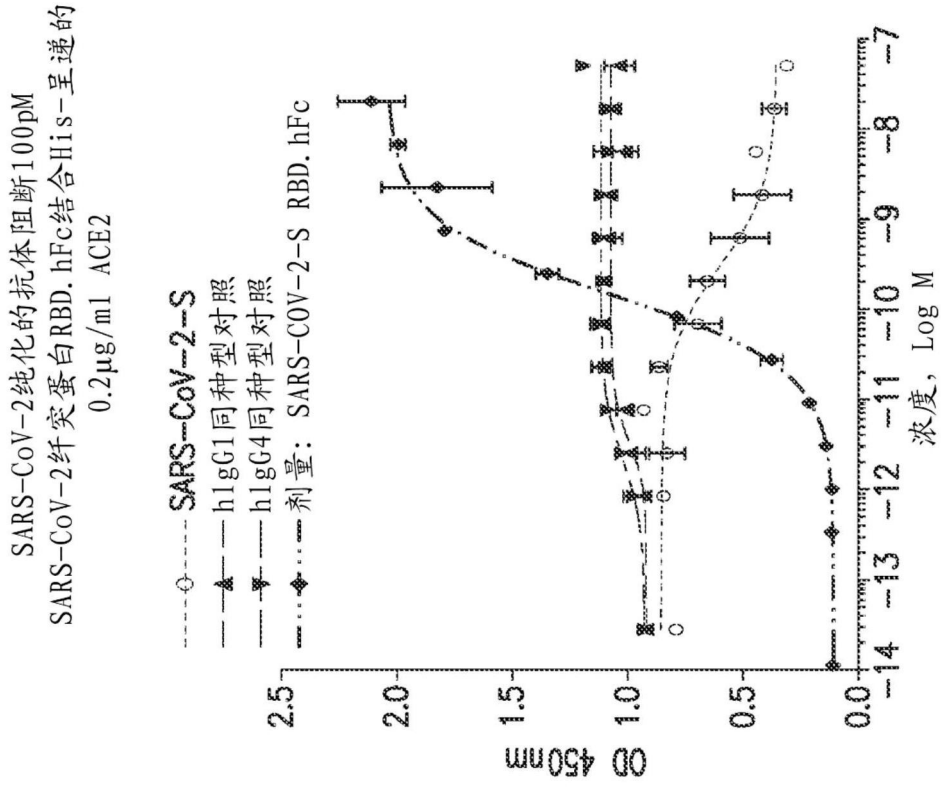


图8

SARS-CoV-2纯化的抗体阻断100pM
SARS-CoV-2纤突蛋白RBD. hFc结合His-呈递的
0.2μg/ml ACE2

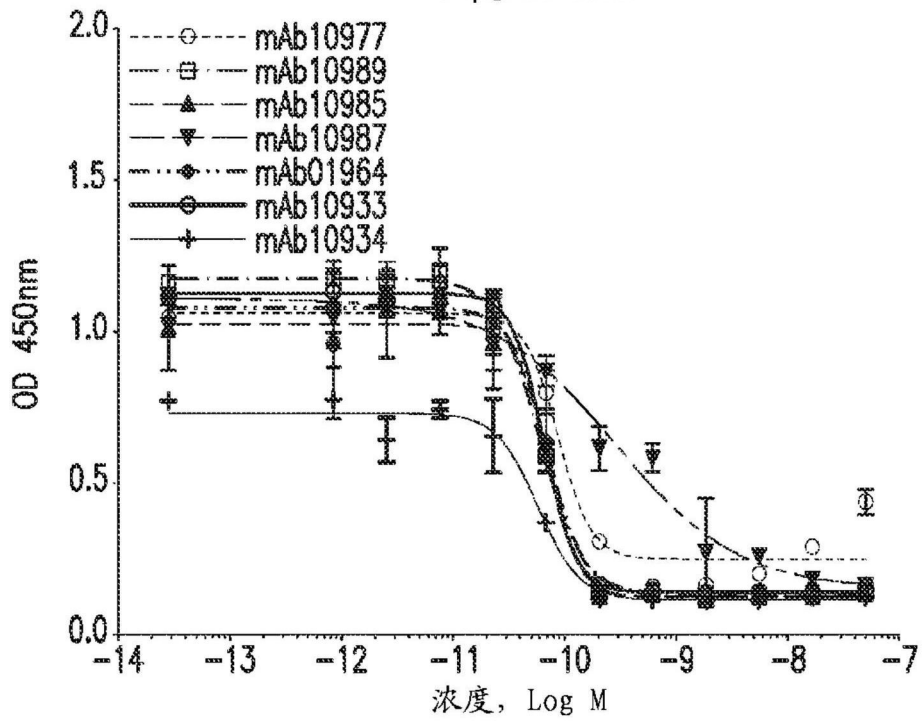


图9

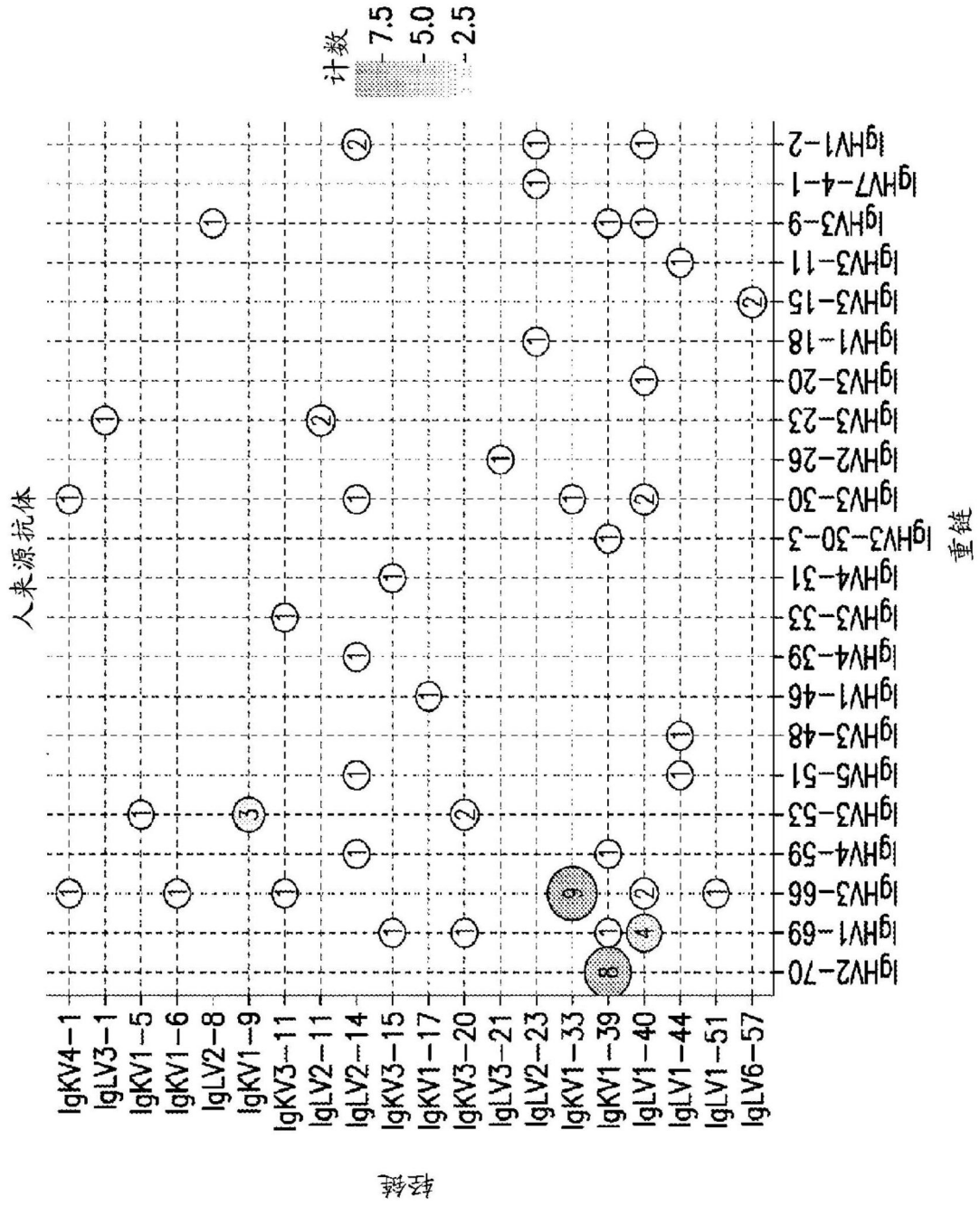


图10B

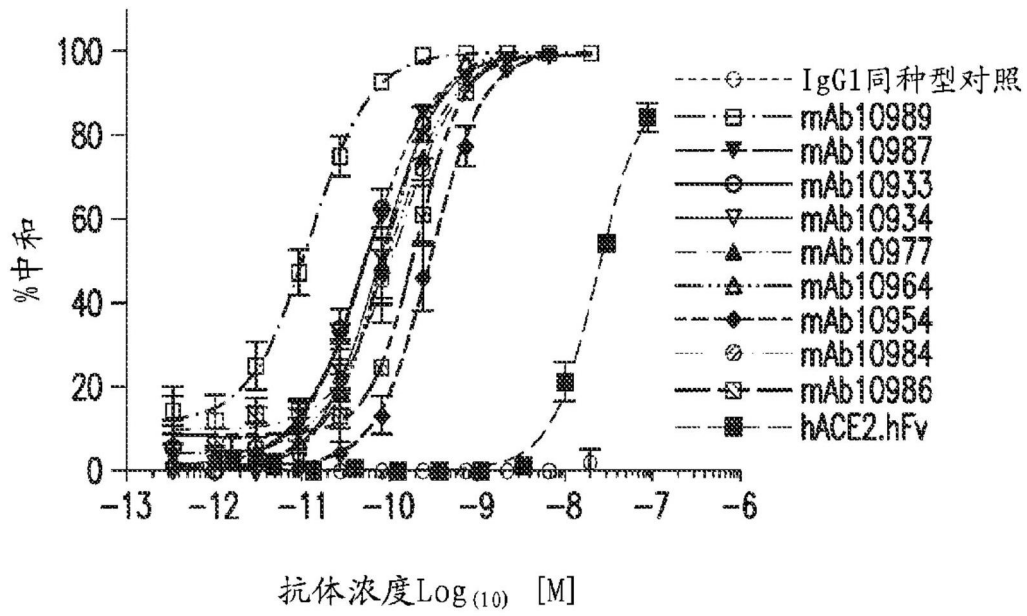


图11A

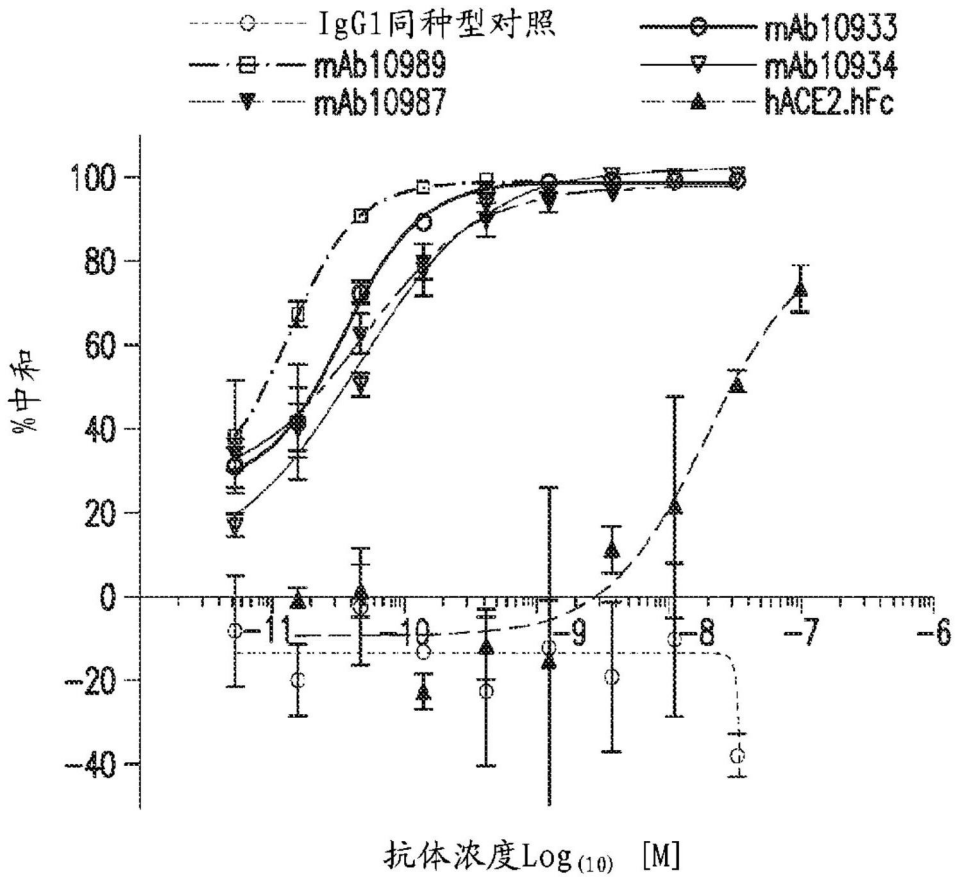


图11B

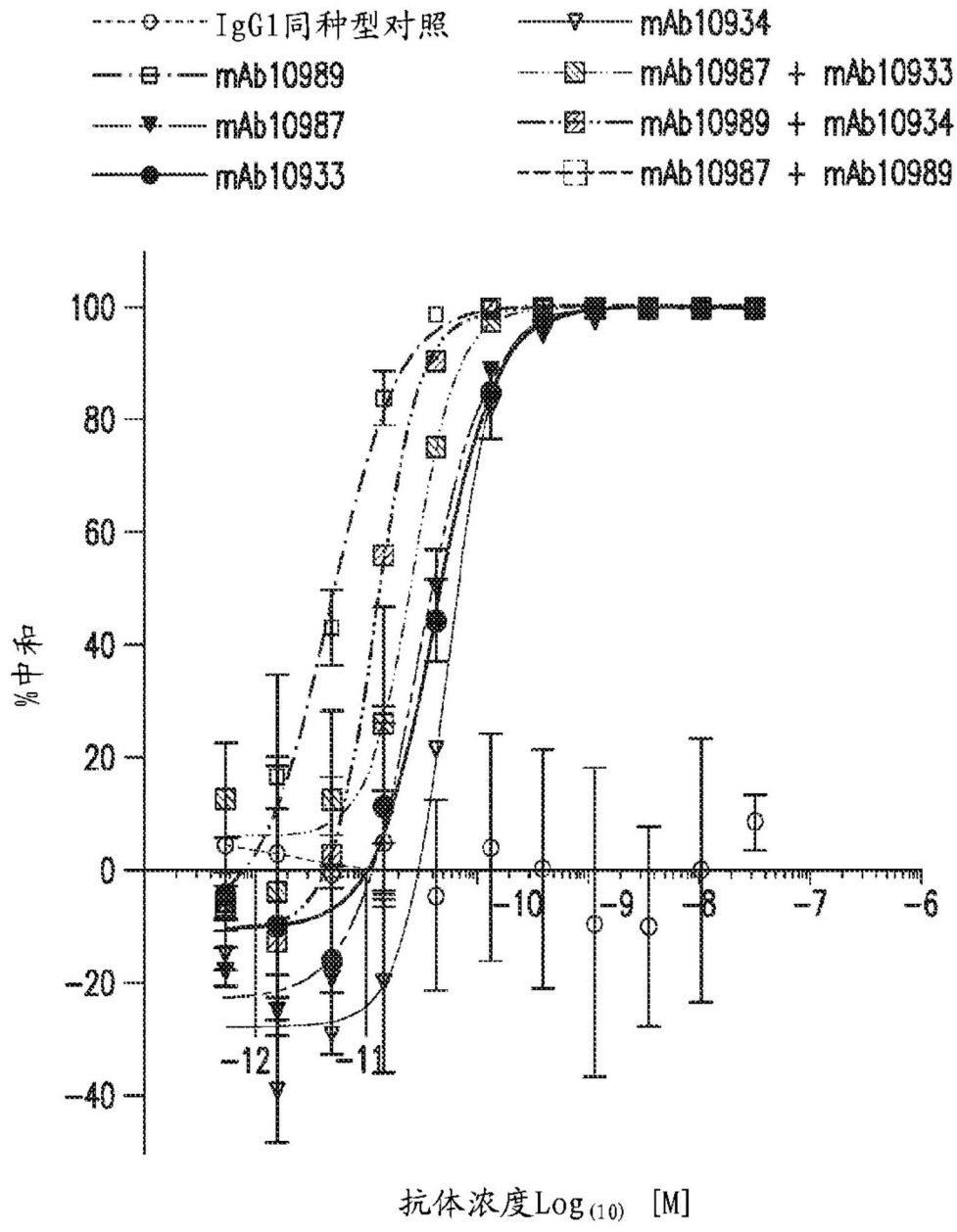


图11C

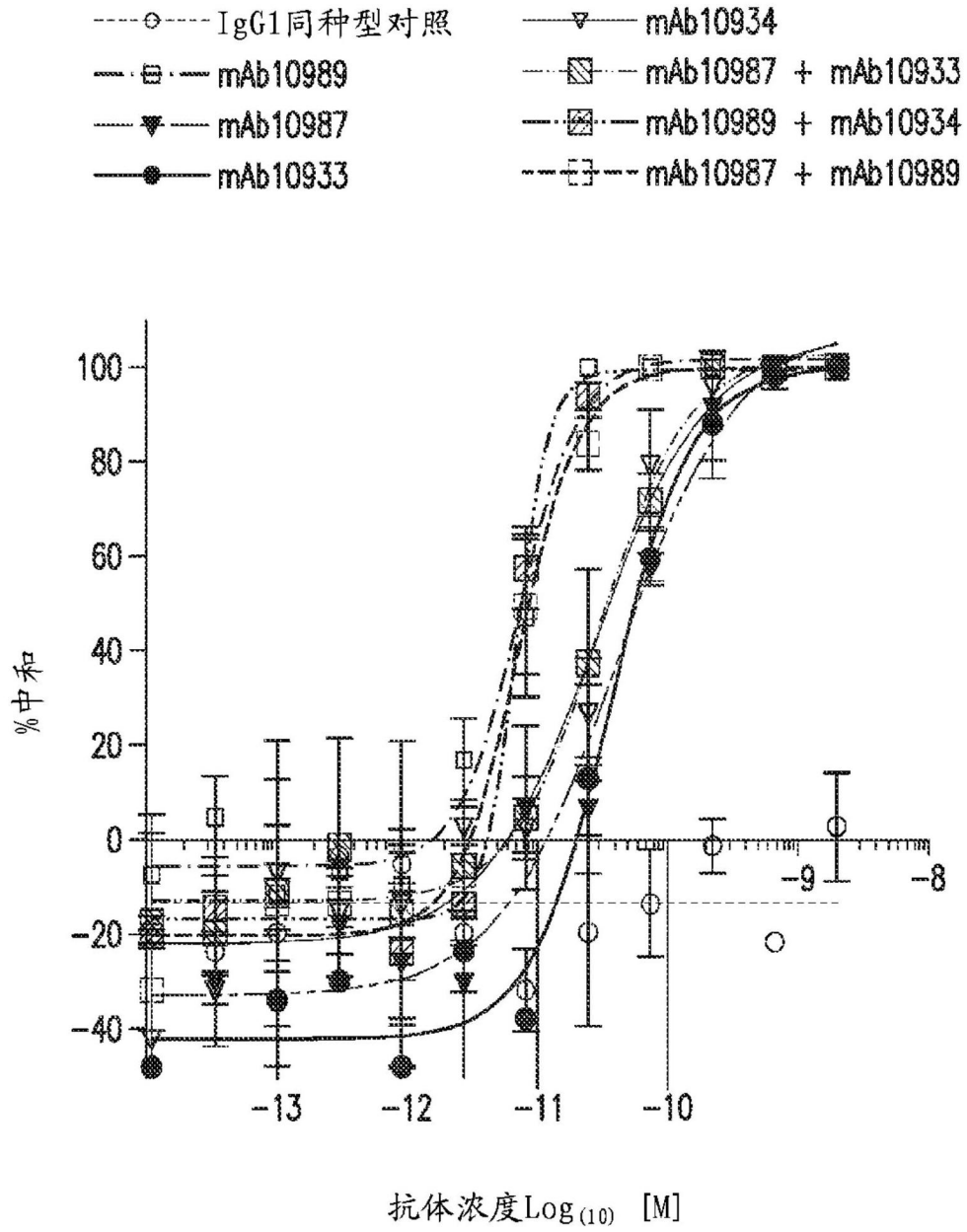


图11D

| 毒株 | 切割位点序列 | 切割位点类型 |
|---------------------|---|--------|
| SARS-CoV-2 S WT | Q ₆₇₇ TNSPRRAR SV ₆₈₇ | 多元 |
| SARS-CoV-2 S FurMut | Q ₆₇₇ TILR SV ₆₈₇ | 一元 |
| SARS-CoV-2 S FurKO | Q ₆₇₇ TNSPGSASSV ₆₈₇ | KO |

图12A

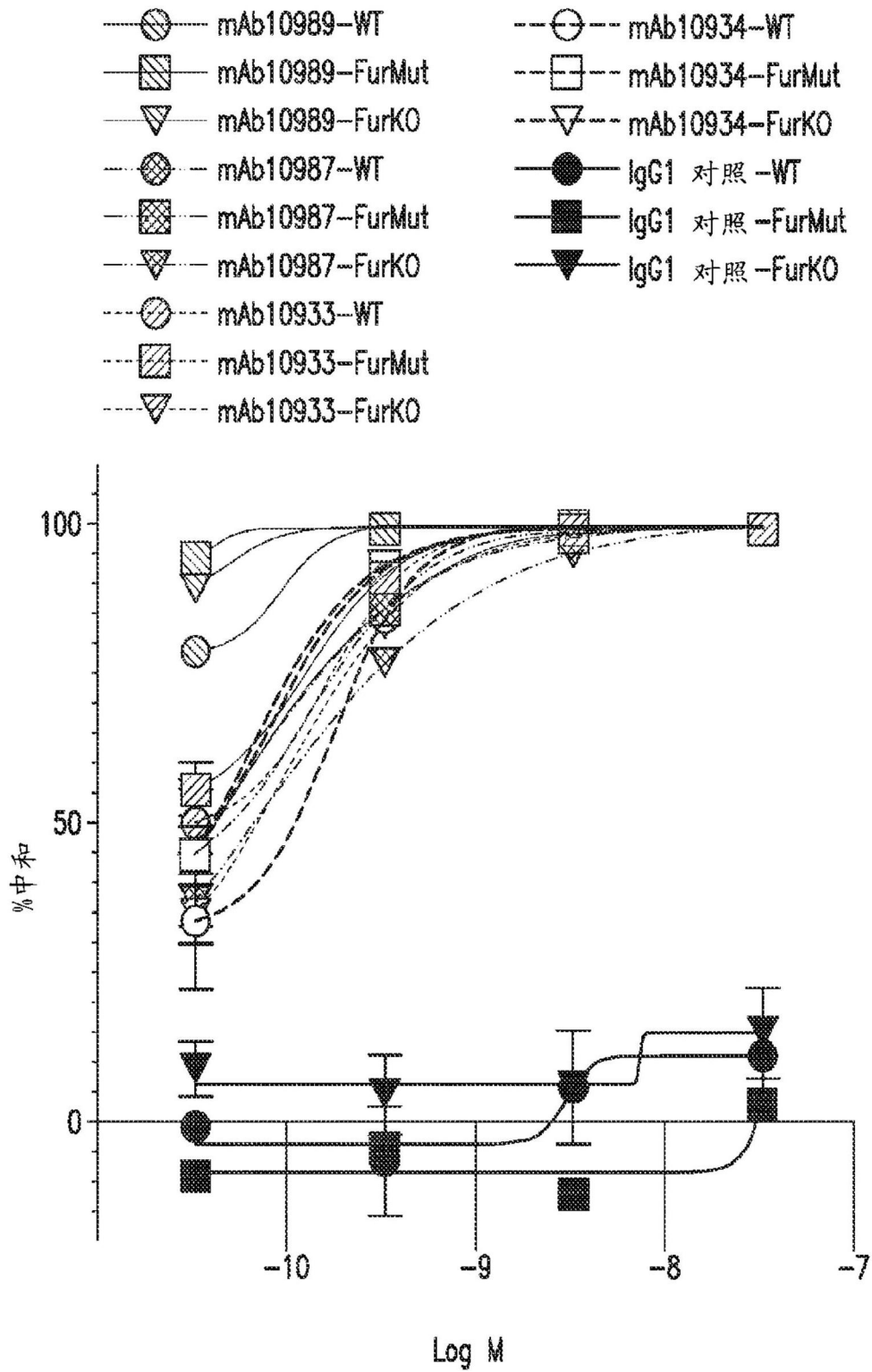


图12B

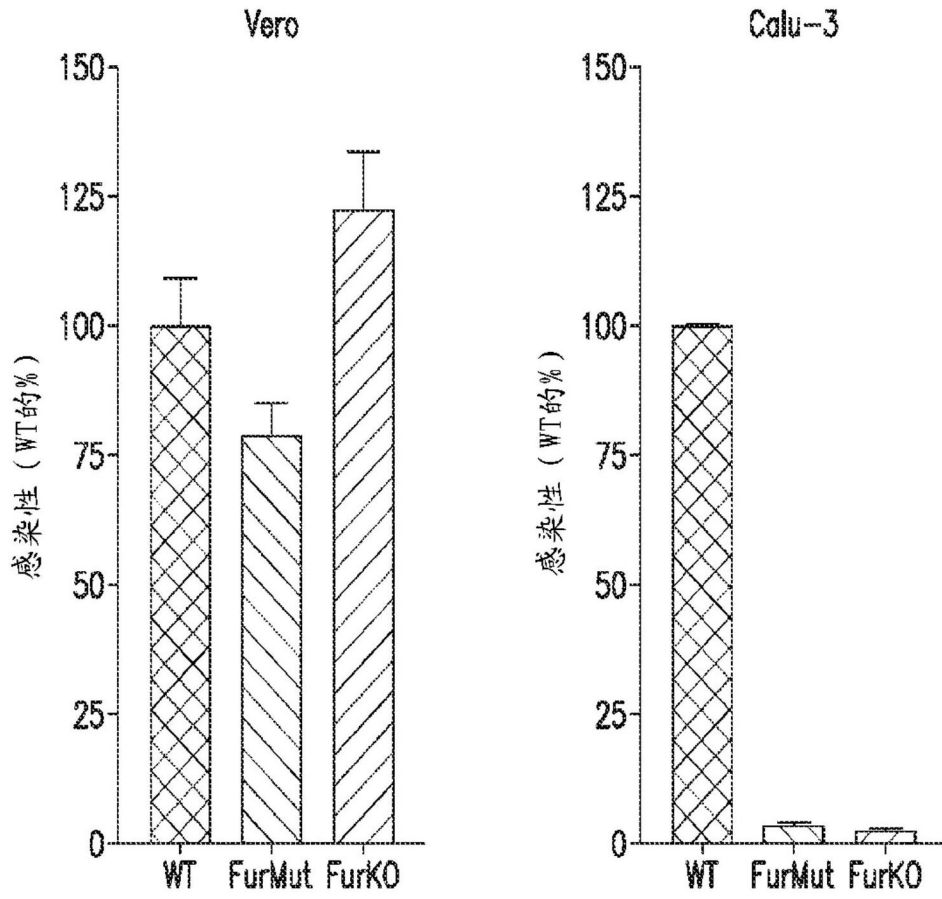


图12C

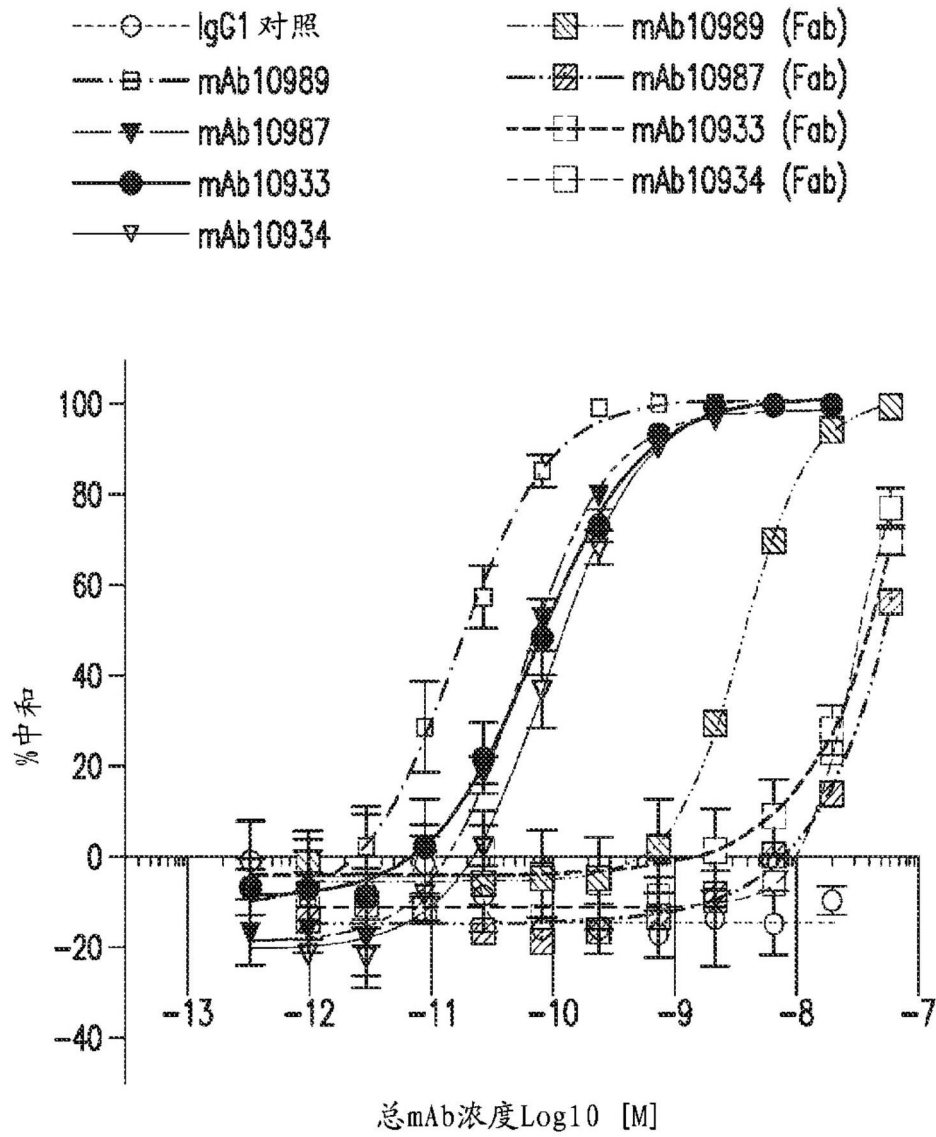


图13

| 抗SARS-CoV-2 mAb 之间的预混合竞争 | | III期, 100nM SARS CoV-2RBD-MMH复合 600nM的mAb2结合位点的反应 (nm) | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--|--|
| I期 | 测量捕获的 mAb1 | 预混合竞争 | | | | | | | | | | |
| mAb | nm 捕获的mAb | mAb10977 | mAb10989 | mAb10933 | mAb10964 | mAb10984 | mAb10986 | mAb10954 | mAb10934 | mAb10987 | | |
| mAb10977 | 1.69 ± 0.05 | 0.00 | -0.03 | -0.01 | -0.04 | -0.02 | 0.46 | 0.33 | 0.00 | 0.96 | | |
| mAb10989 | 1.95 ± 0.03 | 0.07 | 0.00 | -0.04 | -0.03 | -0.04 | 0.03 | -0.01 | -0.07 | 0.30 | | |
| mAb10933 | 1.73 ± 0.06 | 0.10 | 0.04 | 0.00 | -0.01 | -0.01 | 0.04 | 0.00 | 0.25 | 1.52 | | |
| mAb10964 | 1.90 ± 0.03 | 0.04 | 0.02 | 0.04 | 0.00 | -0.01 | 0.05 | 0.04 | 0.38 | 1.37 | | |
| mAb10984 | 1.88 ± 0.04 | 0.11 | 0.03 | 0.15 | 0.02 | 0.00 | 0.08 | 0.06 | 0.55 | 1.13 | | |
| mAb10986 | 1.73 ± 0.04 | 1.09 | 0.14 | 0.32 | -0.03 | -0.06 | 0.00 | -0.04 | 0.86 | 1.21 | | |
| mAb10954 | 1.83 ± 0.04 | 0.85 | 0.03 | 0.53 | -0.01 | -0.04 | 0.02 | 0.00 | 1.12 | 1.16 | | |
| mAb10934 | 1.78 ± 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.03 | -0.03 | -0.04 | 1.23 | 1.60 | 0.00 | 0.31 | | |
| mAb10987 | 1.83 ± 0.04 | 1.29 | 0.06 | 0.76 | 0.85 | 1.03 | 1.05 | 1.07 | -0.08 | 0.00 | | |
| II期测量 IgG阻断 mAb (nm) | | nm mAb结合 | | | | | | | | | | |
| | | 0.27 ± 0.08 | | | | | | | | | | |

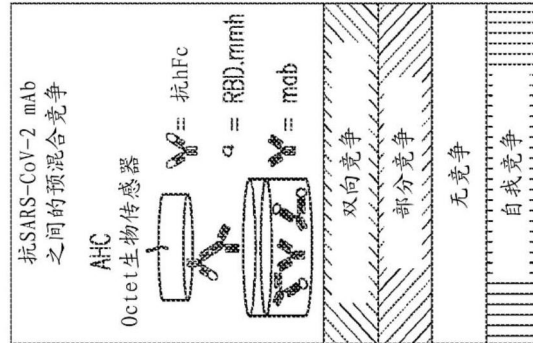


图14

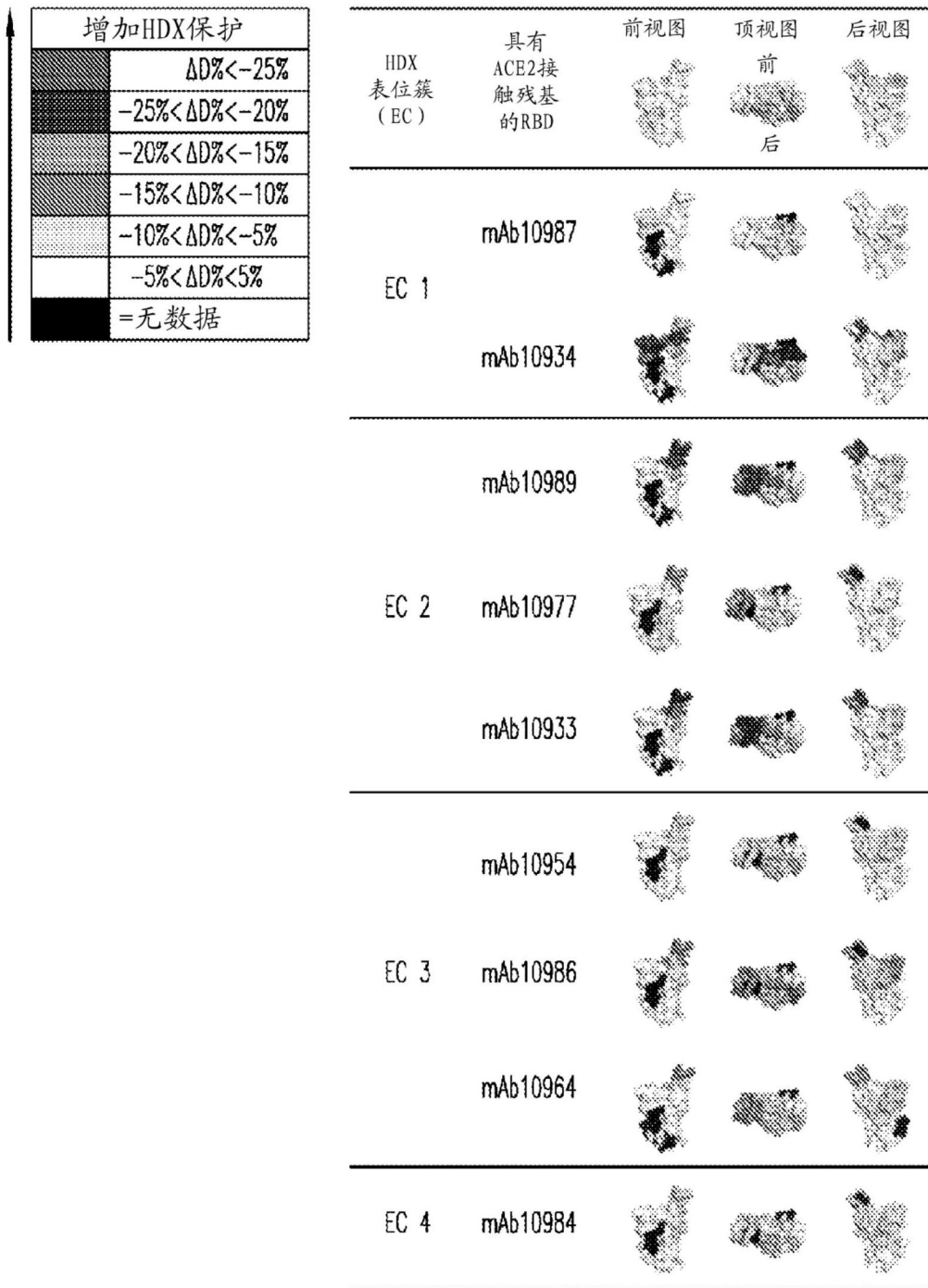


图15

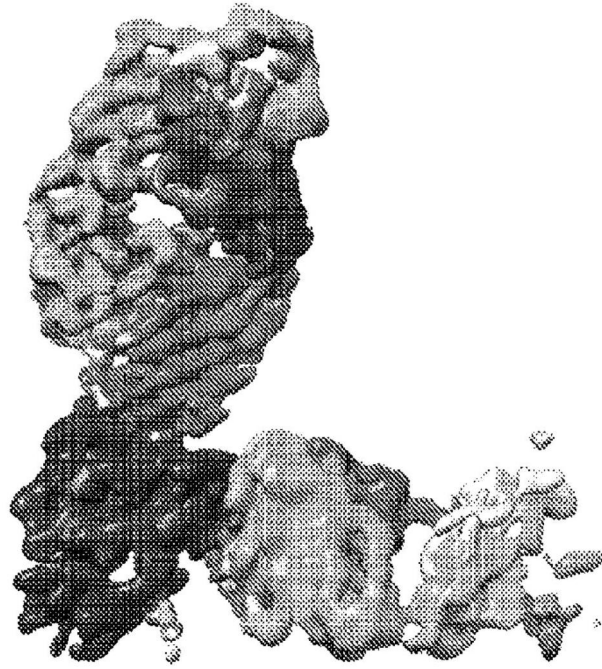


图16A

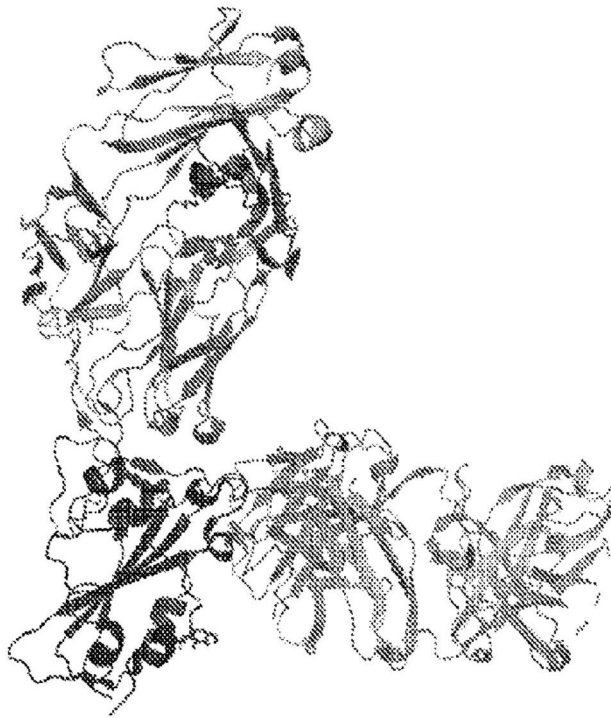


图16B

| SARS-CoV-2 RBD : mAb10933 : mAb10987 复合物 | |
|--|---------|
| 数据收集和处理 | |
| 放大 | 105,000 |
| 电压 (kV) | 300 |
| 电子暴露 ($e^-/\text{\AA}^2$) | 40 |
| 离焦范围 (μm) | 1.6-3.0 |
| 像素大小 (\AA) | 0.85 |
| 强加对称性 | C1 |
| 初始颗粒数 | 989,553 |
| 最终选定颗粒 | 61,707 |
| 图分辨率 (\AA) | 3.9 |
| FSC阈值 | 0.143 |
| 细化 | |
| 图锐化B因子 (\AA^2) | -122 |
| 模型组成 (原子数量) | 7979 |
| 模型与图相关系数 | 0.64 |
| 均方根偏差 | |
| 键长 (\AA) | 0.02 |
| 键角 ($^\circ$) | 1.12 |
| 验证 | |
| MolProbity评分 | 2.7 |
| 旋转异构离群值 (%) | 1.0 |
| 拉氏图 | |
| 有利 (%) | 83.0 |
| 允许 (%) | 16.3 |
| 不允许 (%) | 0.7 |

图17

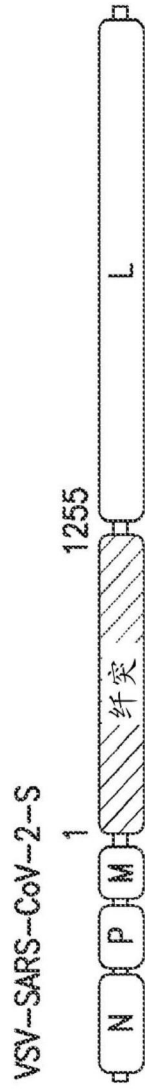


图18A

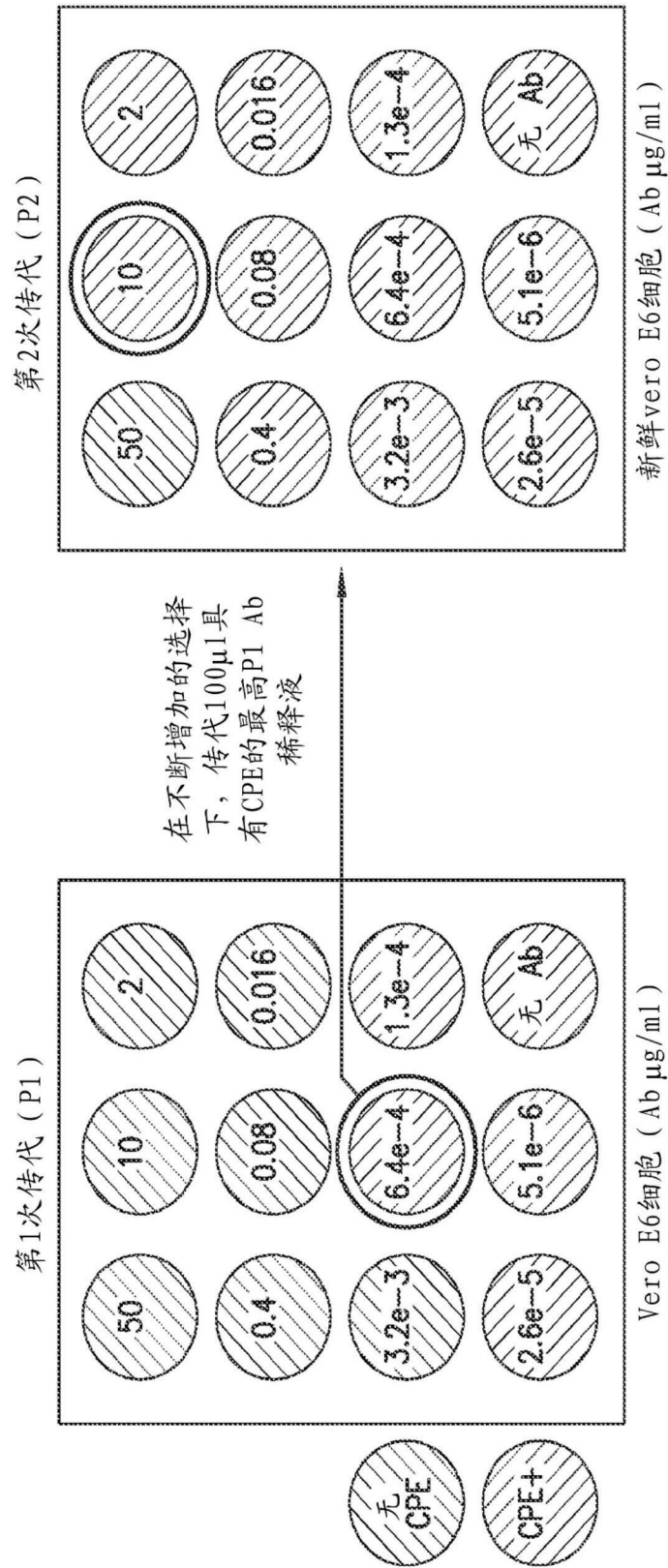


图18B

| 传代 | | 抗体浓度 $\mu\text{g/ml}$ | | | | | | | | | | No Ab |
|----------|---------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 50 | 10 | 2 | 0.4 | 0.08 | 0.016 | 0.016 | 0.08 | 0.016 | No Ab | |
| P1 | mAb10933 | 15% | 30% | 30% | 30% | 30% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| | mAb10934 | 0% | 15% | 50% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| | mAb10987 | 0% | 0% | 5% | 20% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| | mAb10989 | 2-5% | 2-5% | 30% | 50% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| | mAb10987 + mAb10933 | 0% | 0% | 0% | 0% | 20% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| P2 | mAb10933 | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| | mAb10934 | 0% | 40% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| | mAb10987 | 70% | 80% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| | mAb10989 | 80% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| IgG同种型对照 | mAb10987 + mAb10933 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | > 90% |
| | mAb10989 + mAb10934 | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |
| | mAb10989 + mAb10987 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | > 90% |
| | IgG同种型对照 | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% | > 90% |

图18C

抗SARS-COV-2纤突单克隆抗体

| 逃逸 突变体 | mAb10989 | | mAb10987 | | mAb10933 | | mAb10934 | | mAb10933/ mAb10987 | | mAb10989/ mAb10934 | | mAb10989/ mAb10987 | |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|
| | 7.27E-12 | 3.65E-11 | 3.10E-11 | 5.57E-11 | 5.99E-11 | 2.70E-11 | 3.28E-11 | 4.15E-11 | 8.27E-12 | 2.64E-11 | 4.19E-11 | 4.08E-11 | 6.04E-11 | 1.22E-11 |
| 野生型 | 2.49E-11 | 3.10E-11 | 8.33E-9 | 7.81E-11 | 5.38E-9 | 1.23E-10 | 4.19E-11 | 2.72E-11 | 2.49E-11 | 3.10E-11 | 8.33E-9 | 7.81E-11 | 5.38E-9 | 1.23E-10 |
| K417E | 2.47E-11 | NC | NC | 8.82E-11 | 1.42E-10 | 1.54E-10 | 4.08E-11 | 5.74E-11 | 2.65E-11 | NC | 1.20E-9 | 1.04E-10 | 3.87E-11 | 6.25E-11 |
| K444Q | 2.65E-11 | NC | NC | 7.60E-11 | NC | 1.88E-10 | 6.04E-11 | 5.37E-11 | 4.10E-11 | 1.20E-9 | 1.04E-10 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC |
| V445A | 4.10E-11 | 1.20E-9 | 1.04E-10 | NC | 2.17E-10 | 1.15E-10 | 3.52E-11 | 2.41E-11 | 2.77E-11 | 1.04E-10 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC | 1.77E-11 |
| N450D | 2.77E-11 | 1.04E-10 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC | 1.13E-9 | 1.19E-10 | 4.58E-11 | 1.77E-11 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC | 1.77E-11 | 1.70E-11 |
| Y453F | 1.77E-11 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC | 4.47E-11 | 4.71E-11 | 1.29E-10 | 6.96E-11 | 1.77E-11 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC | 1.77E-11 | 1.70E-11 |
| L455F | NC | 6.25E-11 | NC | 1.13E-9 | NC | 6.19E-11 | NC | 1.88E-10 | 1.77E-11 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC | 1.77E-11 | 1.70E-11 |
| E484K | NC | 2.34E-11 | 2.05E-10 | 2.05E-10 | 4.47E-11 | 4.71E-11 | 1.29E-10 | 6.96E-11 | 1.77E-11 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC | 1.77E-11 | 1.70E-11 |
| G485D | NC | 3.16E-11 | NC | NC | 3.50E-11 | 8.8E-11 | 1.29E-10 | 6.96E-11 | 1.77E-11 | 3.87E-11 | 6.25E-11 | NC | 1.77E-11 | 1.70E-11 |
| F486V | 6.76E-10 | 3.75E-11 | 8.65E-11 | 8.65E-11 | NC | 5.41E-11 | 2.55E-9 | 6.82E-11 | 6.76E-10 | 3.75E-11 | 8.65E-11 | 8.65E-11 | 2.55E-9 | 6.82E-11 |
| F490P | NC | 4.19E-11 | NC | NC | 3.46E-11 | 3.24E-11 | 4.55E-10 | 5.94E-11 | NC | 4.19E-11 | NC | 4.19E-11 | 4.55E-10 | 5.94E-11 |
| Q493K | NC | 4.19E-11 | NC | NC | 3.46E-11 | 3.24E-11 | 4.55E-10 | 5.94E-11 | NC | 4.19E-11 | NC | 4.19E-11 | 4.55E-10 | 5.94E-11 |

图20

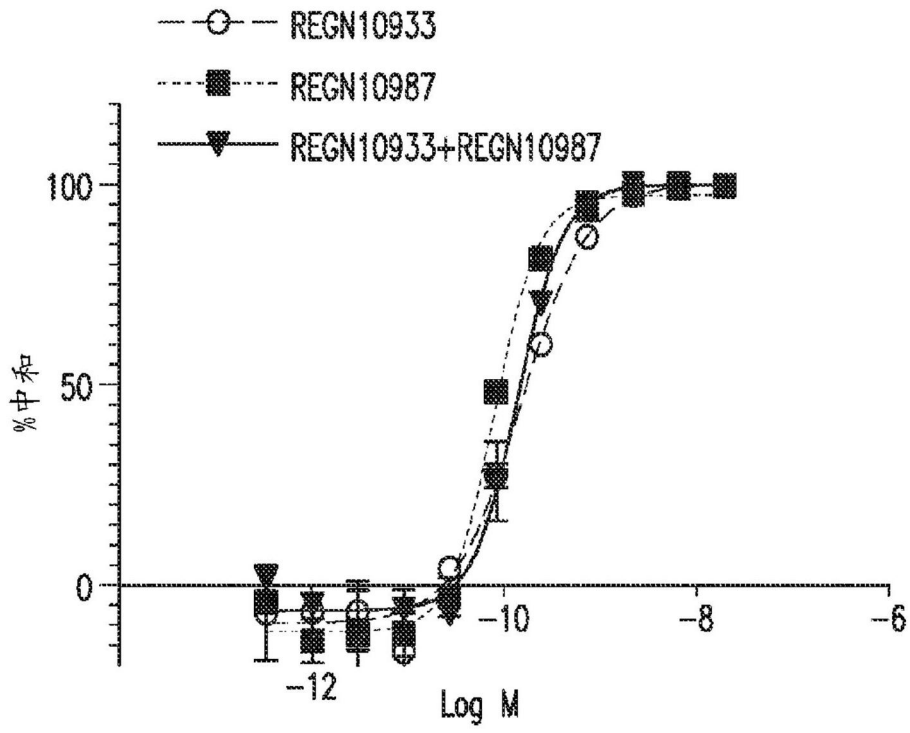


图21

| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 | P10 | P11 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| REGN10933 | | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 |
| REGN10985 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 | 完全逃逸 |
| REGN10987 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 | 部分逃逸 |
| REGN10987+REGN10933 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 | 无逃逸 |
| REGN10987+REGN10933+REGN10985 | | | | | | | | | | | |

图22

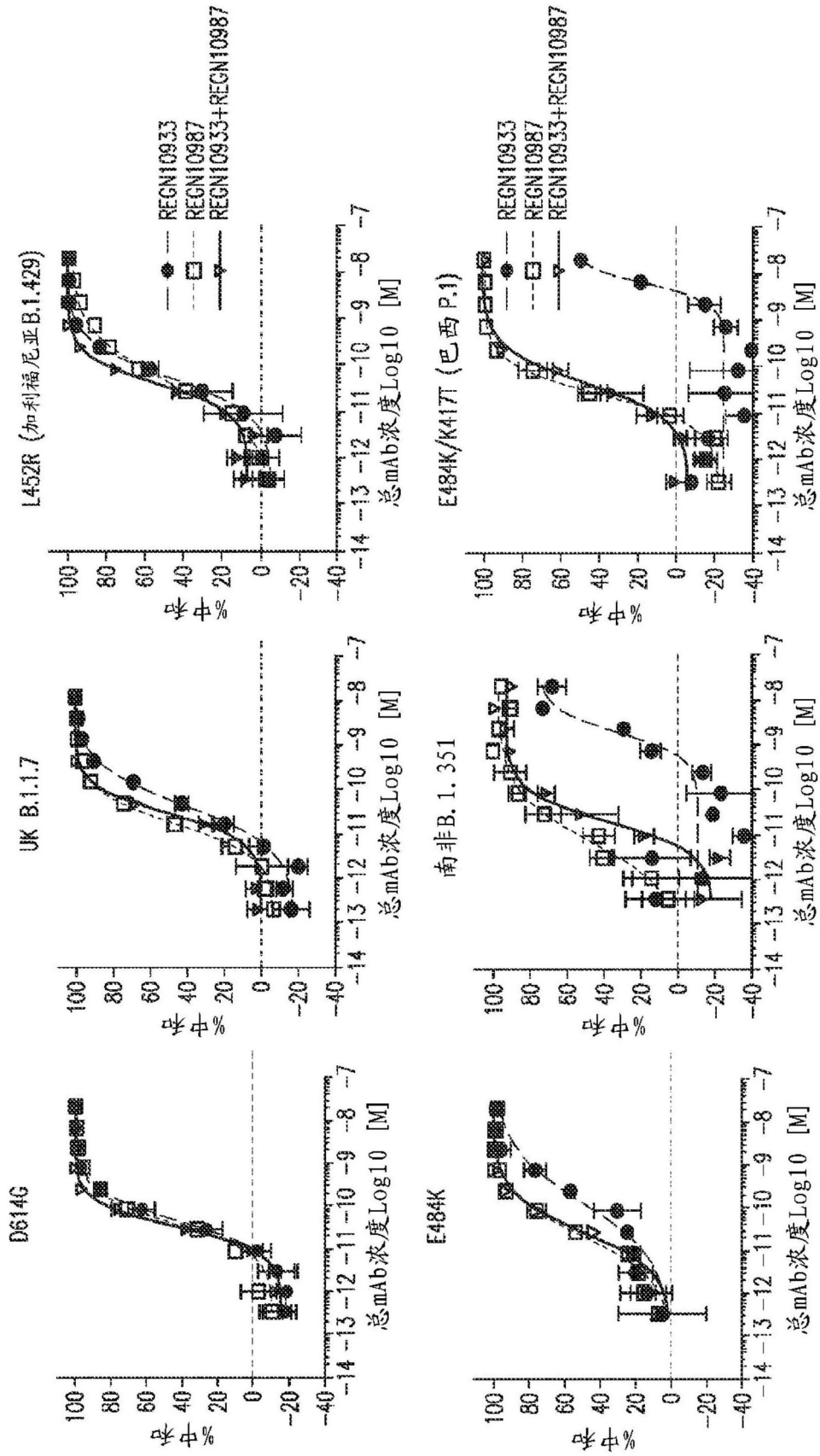


图23A

相对于参考 (D614G) 假病毒的 IC50 倍数降低

| 变体 | REGN10933 | REGN10987 | REGN10933+ REGN10987 |
|-----------------------|-----------|-----------|-------------------------|
| UK B.1.1.7 | 1.2 | 0.7 | 0.9 |
| L452R (加利福尼亚 B.1.429) | 1.29 | 1.07 | 1.23 |
| E484K | 15.0 | 1.2 | 1.6 |
| 南非 B.1.351 | 44.66 | 0.18 | 0.60 |
| E484K/K417T (巴西 P.1) | 142.85 | 0.66 | 1.43 |

图23B

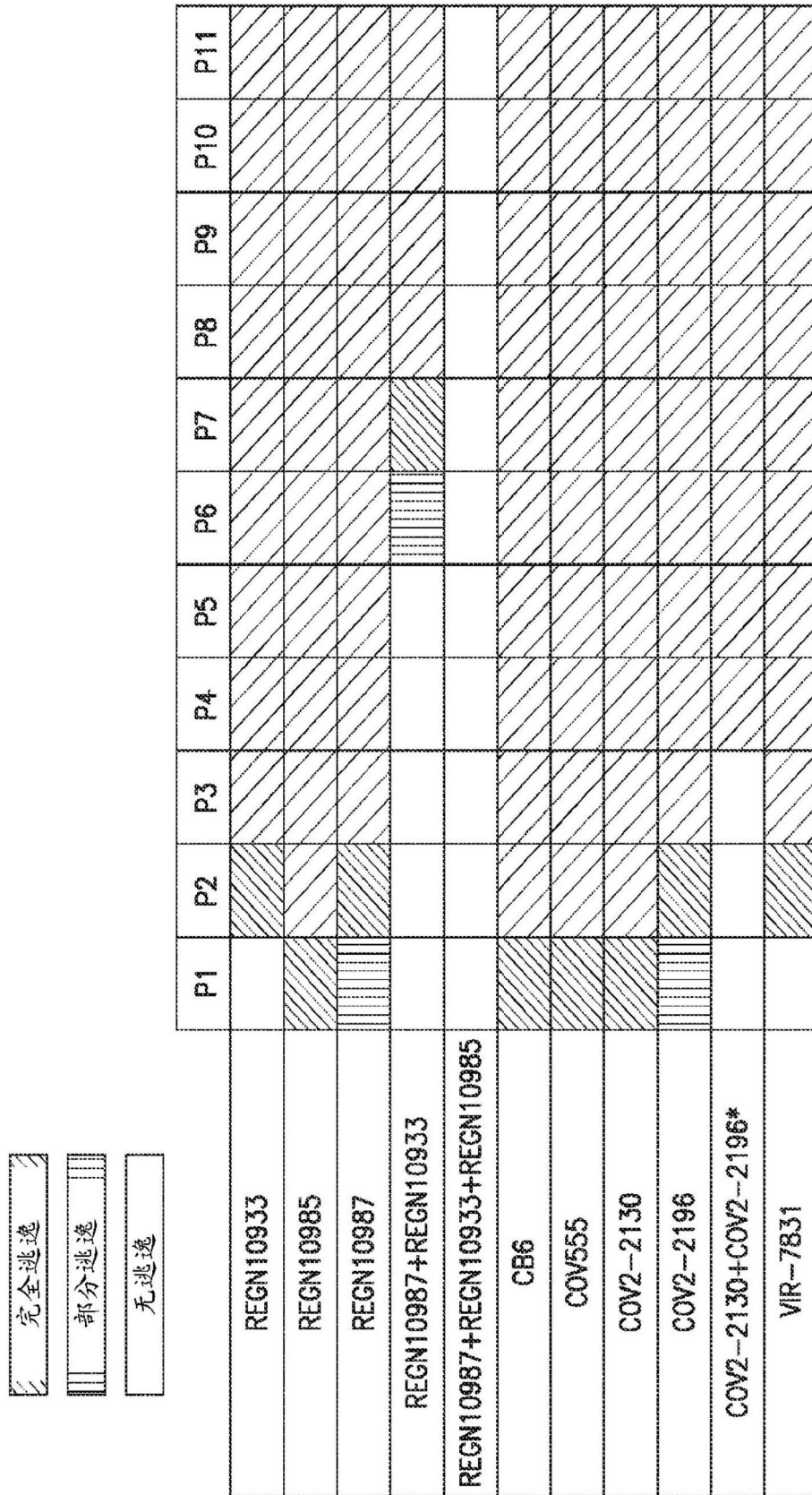


图24A

| 抗体 | 与逃逸相关的突变 (>15%频率) | 鉴定逃逸突变体所处的传代 |
|-------------------------------|---|--------------|
| REGN10933 | F486V (87.7%) | 2 |
| REGN10985 | R408I (39.7%) G504D(40.4%) | 1 |
| REGN10987 | K444Q(44.2%) V445A(39.9%) | 2 |
| REGN10933+REGN10987 | K417R(99.6%) K444Q(99.7%) G476S(90.0%) | 7 |
| REGN10933+REGN10987+REGN10985 | 没有 | 传代至P11 |
| CB6 | K417N(99.7%) | 1 |
| COV555 | E484K(38.1%) Q493R(55.6%) | 1 |
| COV2-2130 | K444Q(85.1%) | 1 |
| COV2-2196 | G476D(81.4%) N487D(18.2%) | 2 |
| COV2-2130+COV2-2196* | 没有 | 传代至P3 |
| VIR-7831 | P337L (15.56%) E340D (19.02%) T345P (69.3%) | 2 |

图24B

D614G

- REGN10933
- ◊ REGN10985
- ◻ REGN10987
- REGN10933+REGN10987+REGN10985
- ▼ REGN10933+REGN10987

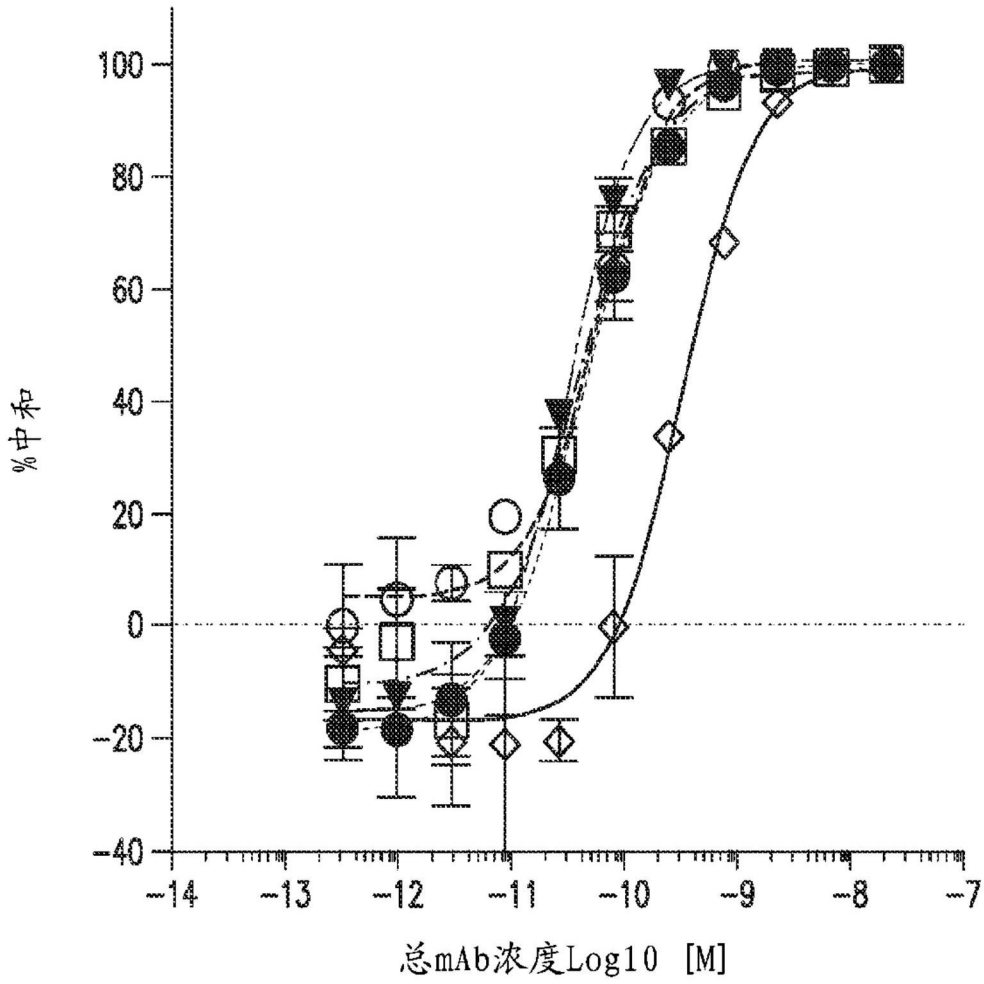


图24C

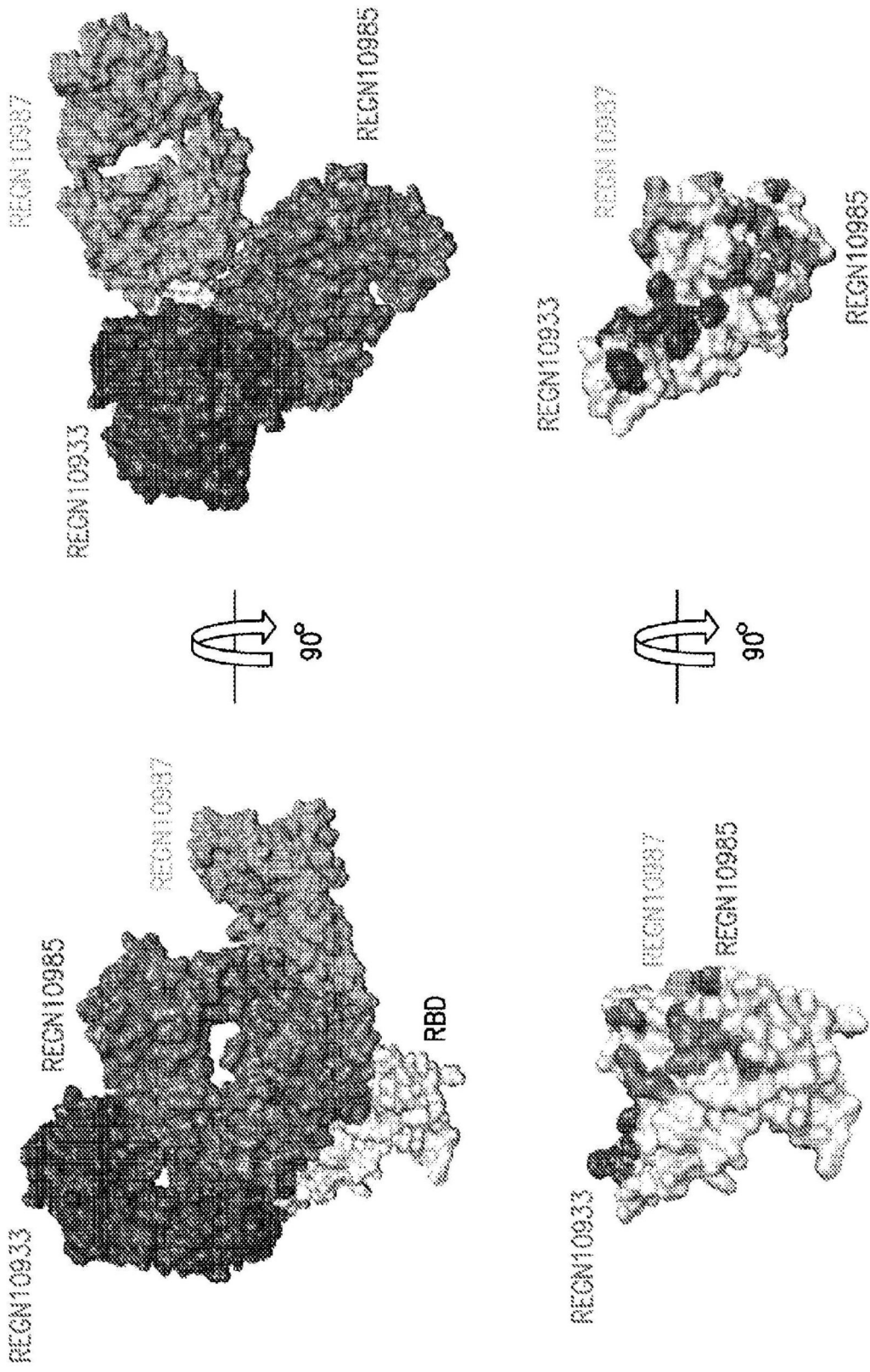


图24D

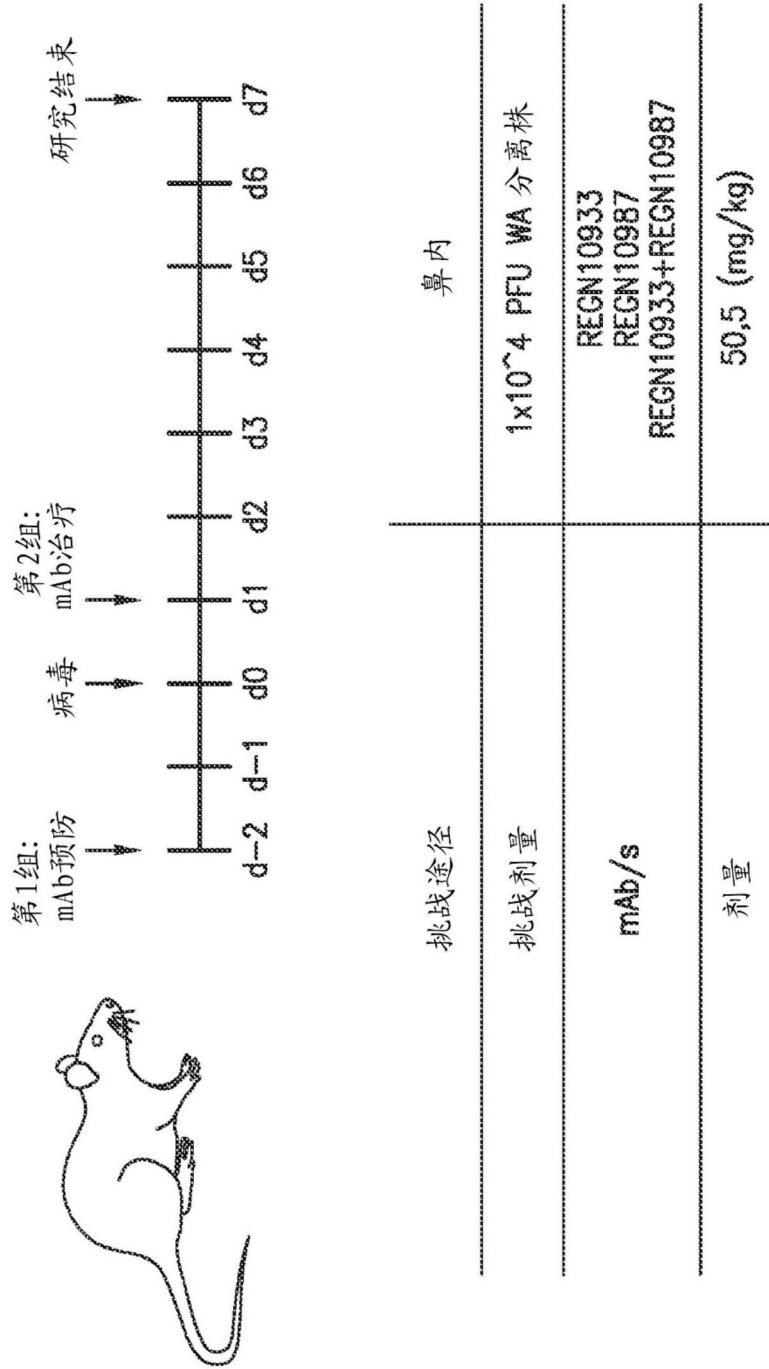


图25A

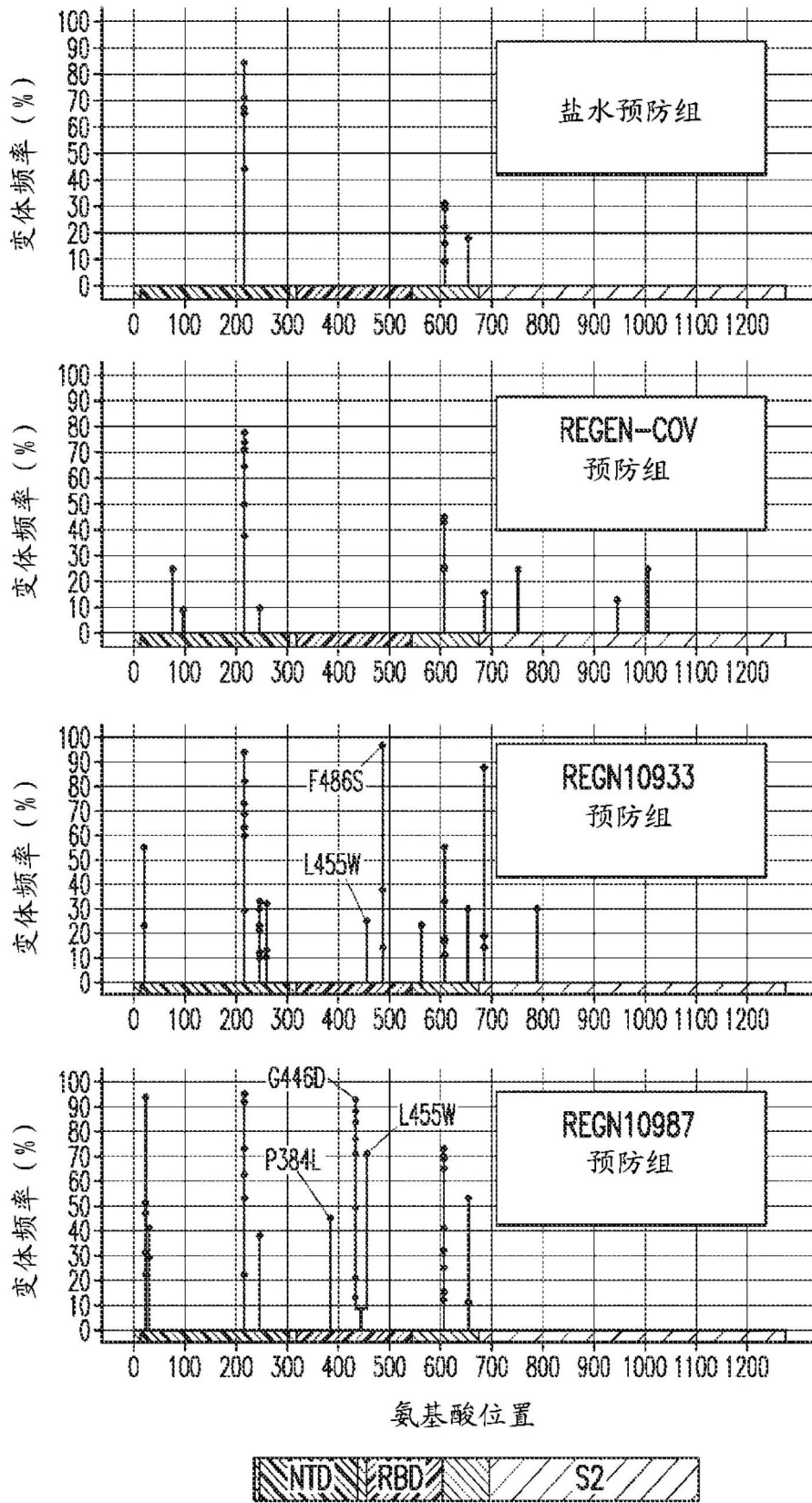


图25B

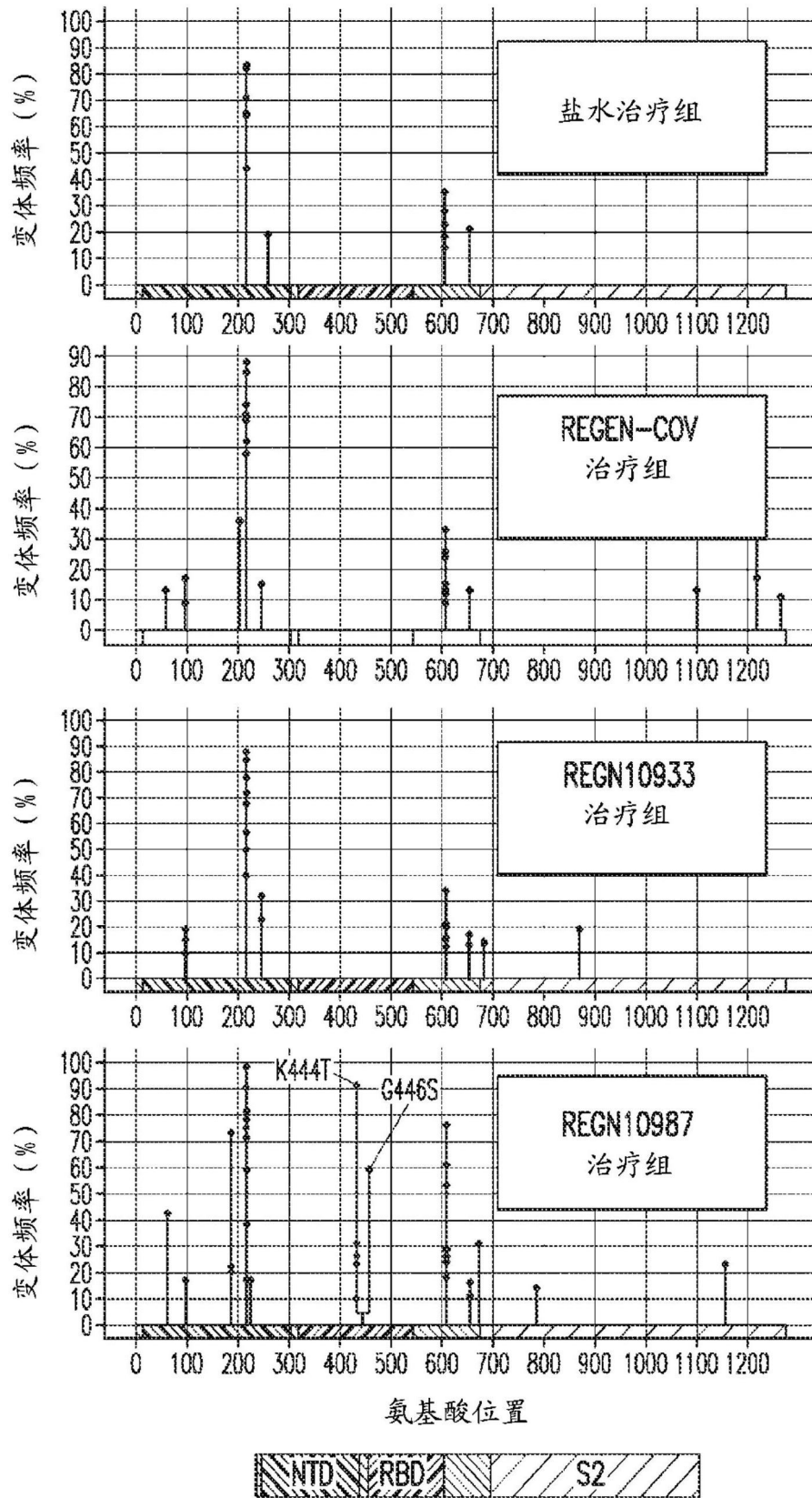


图25C

在至少1个患者的1个样品中鉴定出的变体

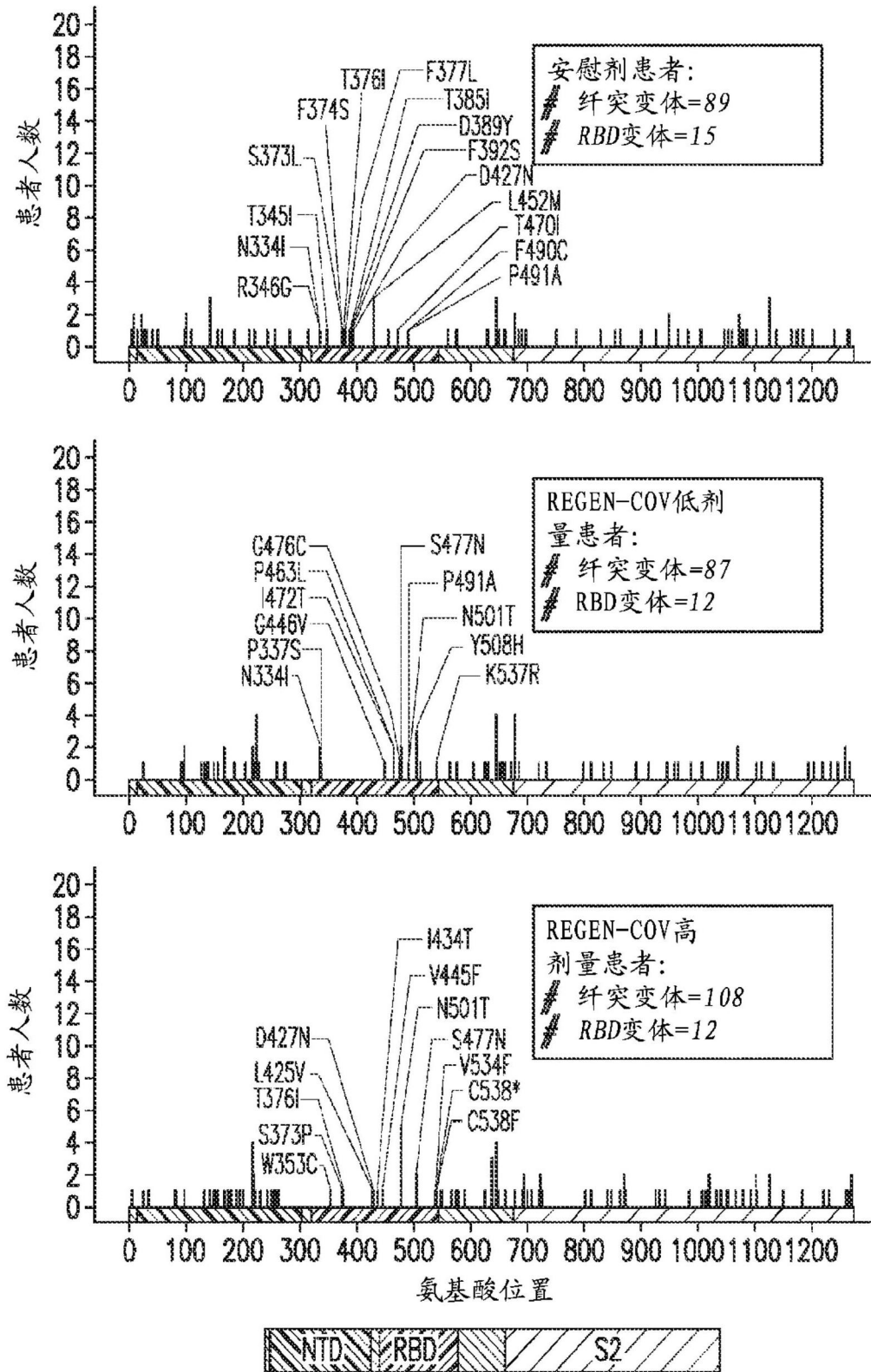


图26A

在至少1个患者的2个样品中鉴定出的变体

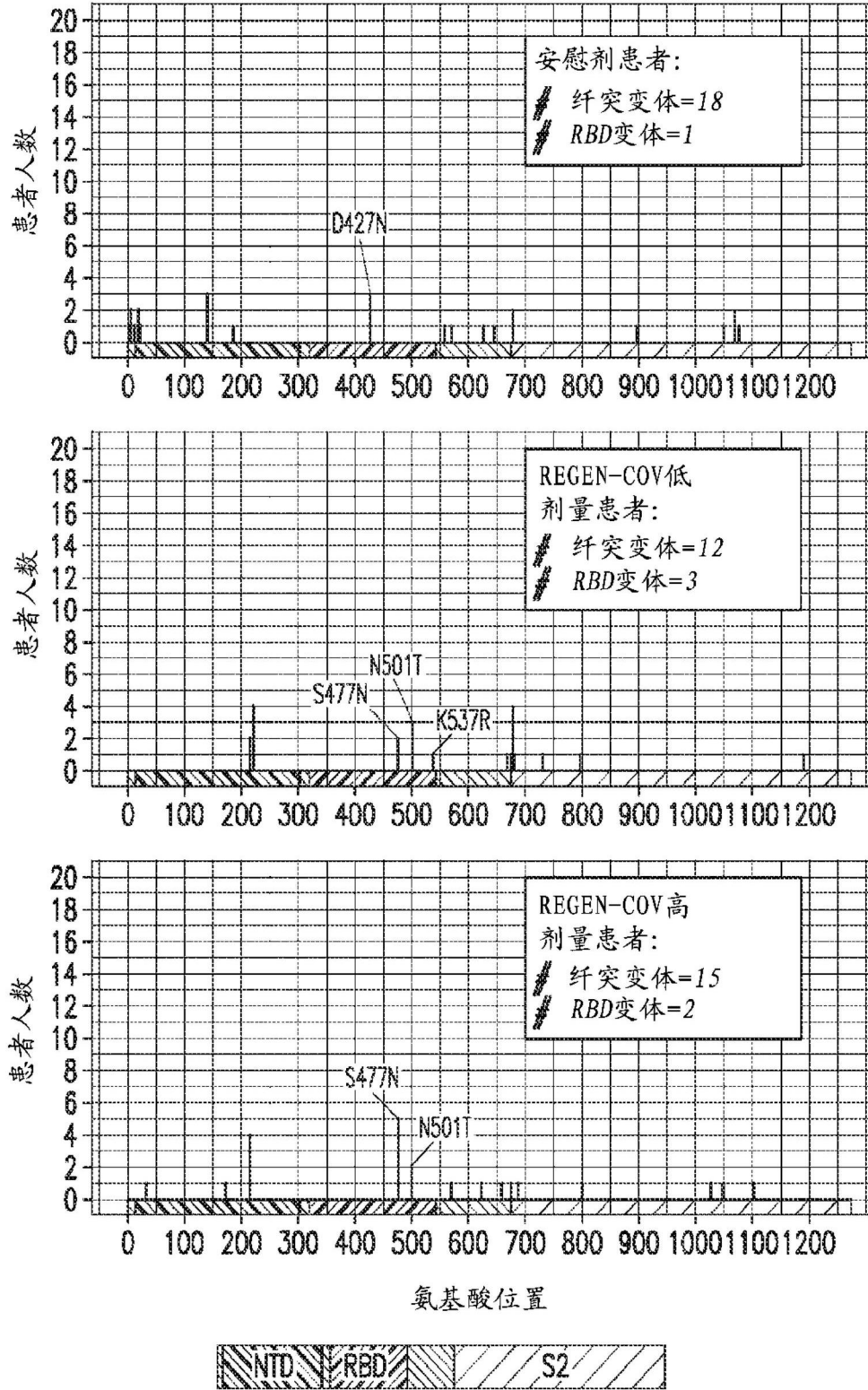


图26B

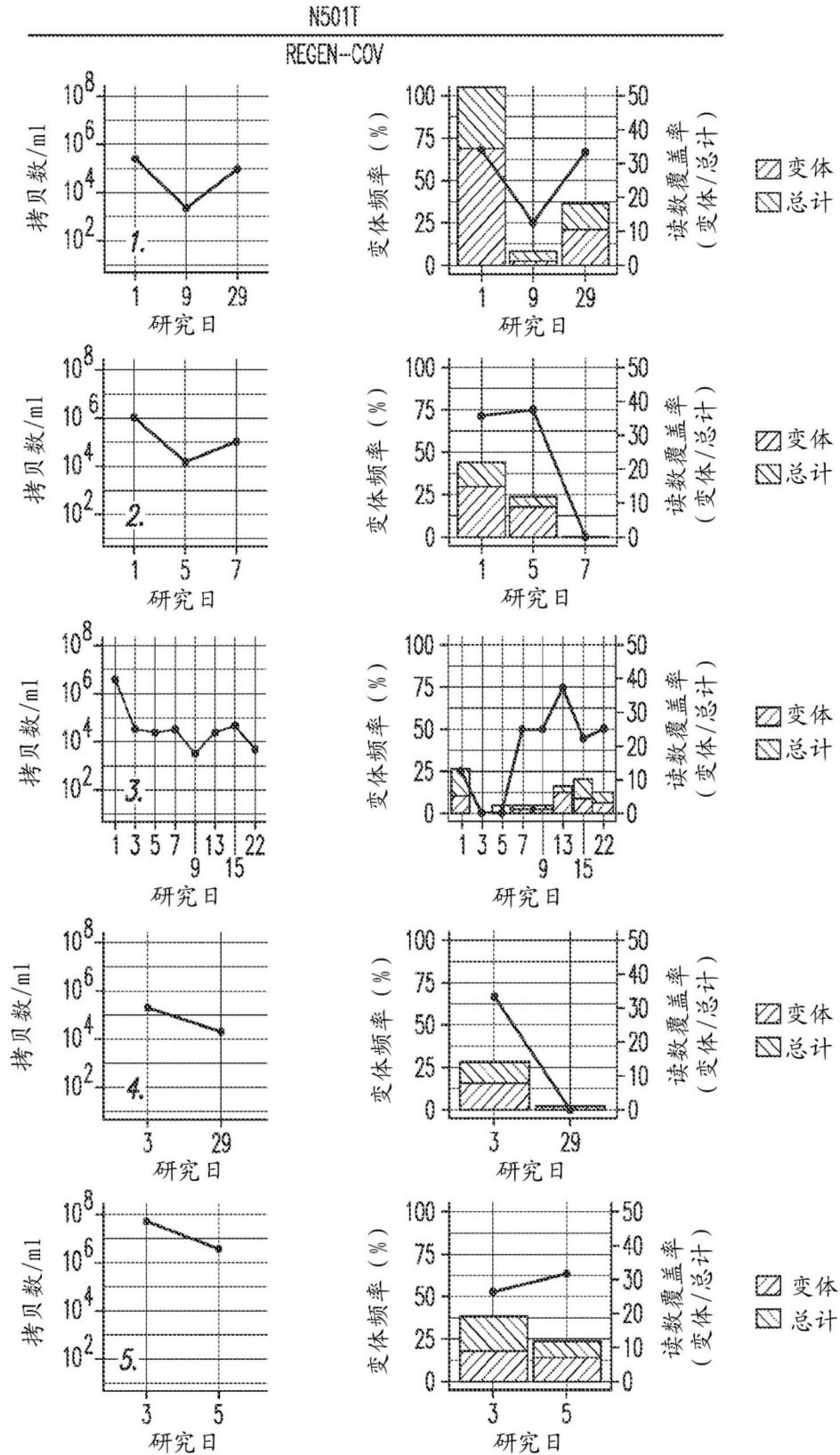


图27A

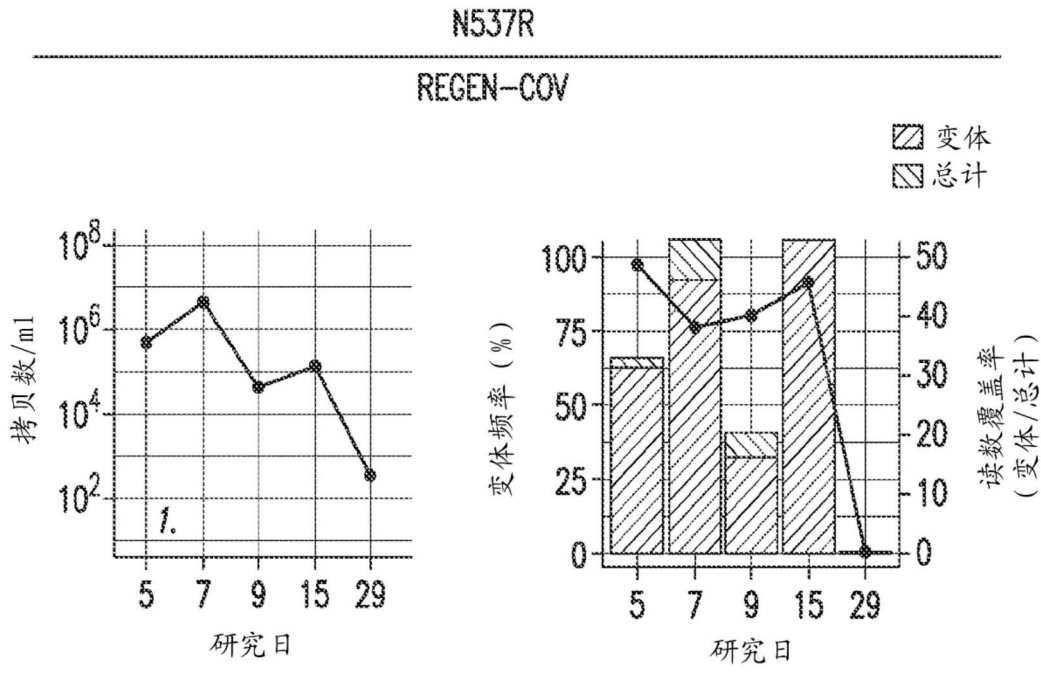


图27B

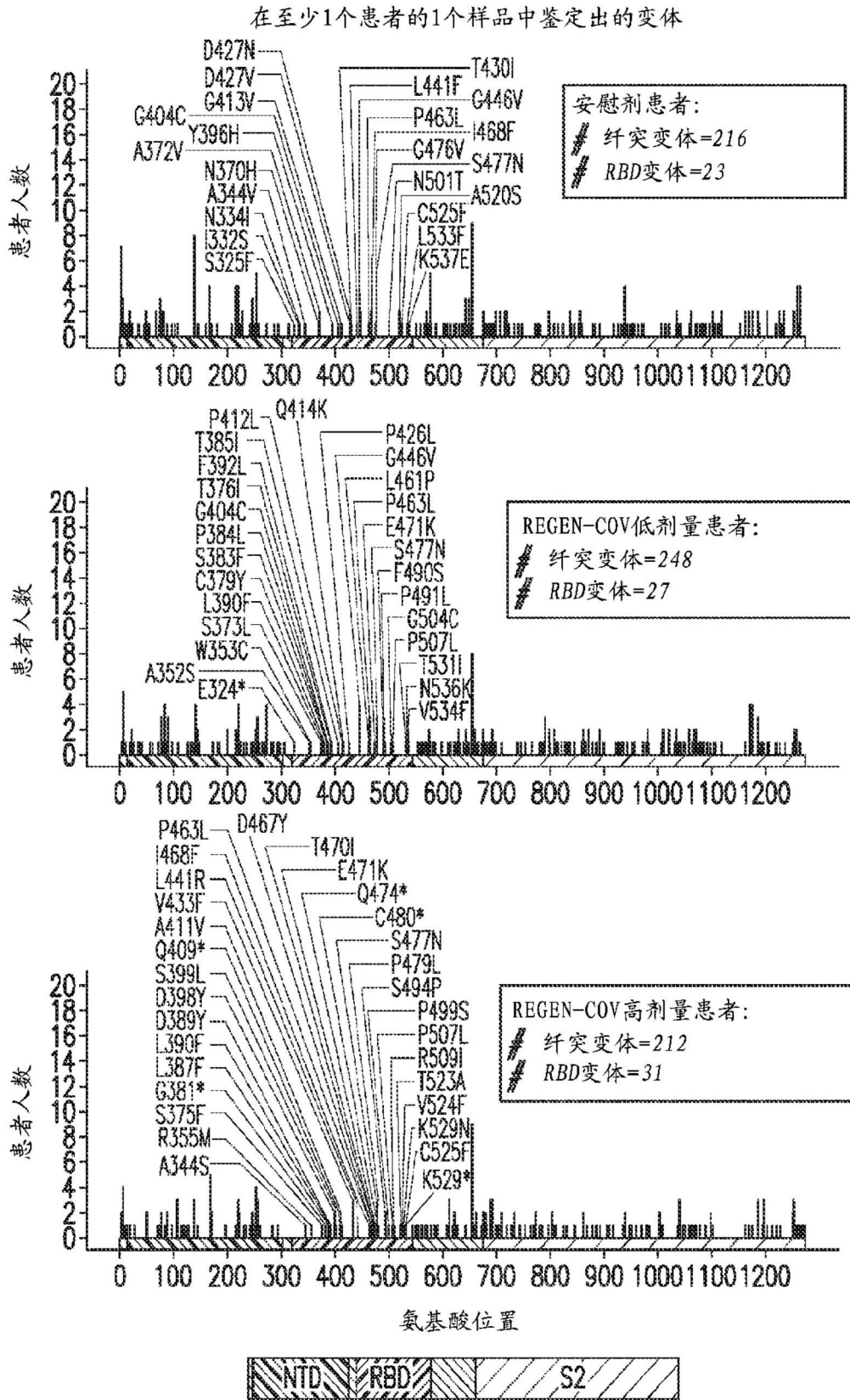


图28A

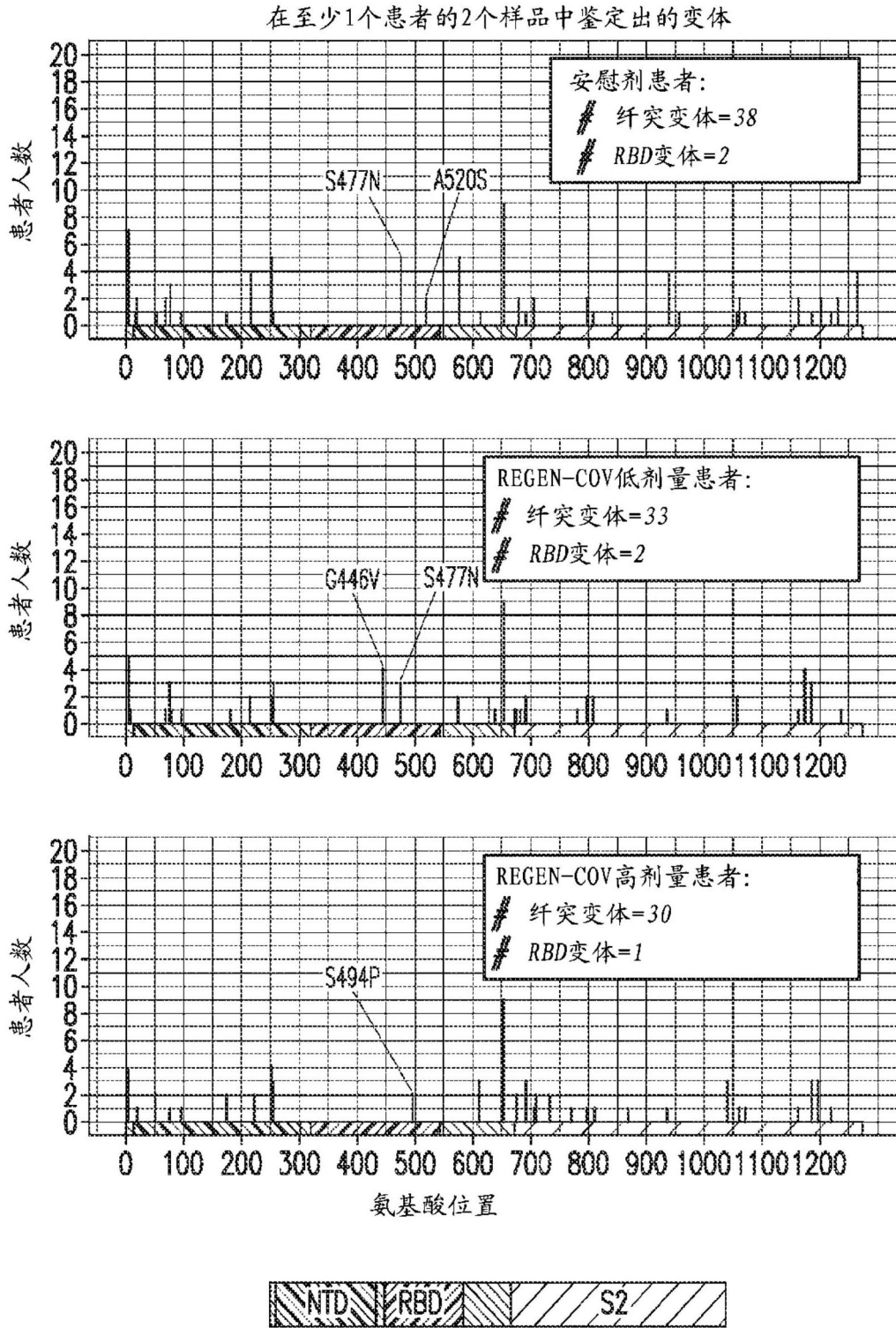


图28B

S494P

REGEN-COV

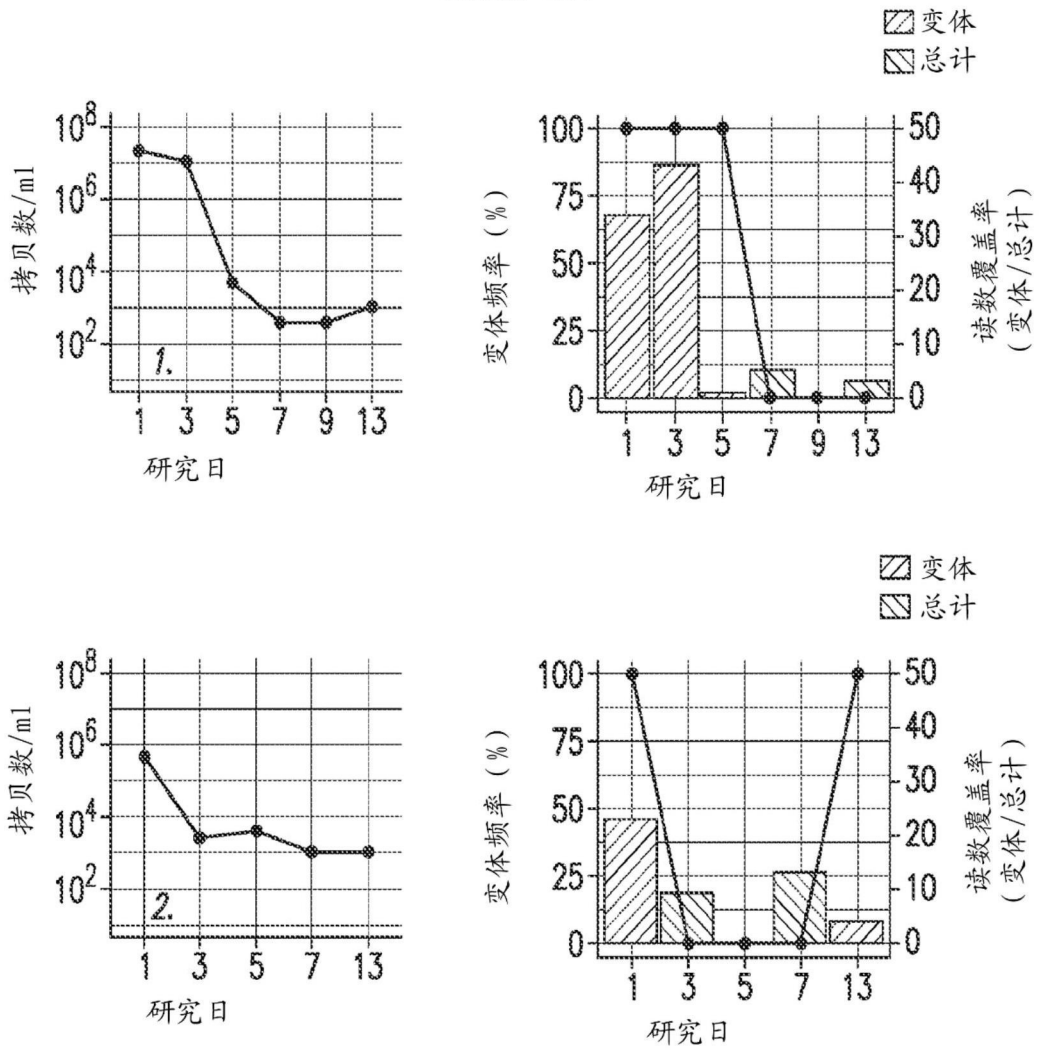


图29A

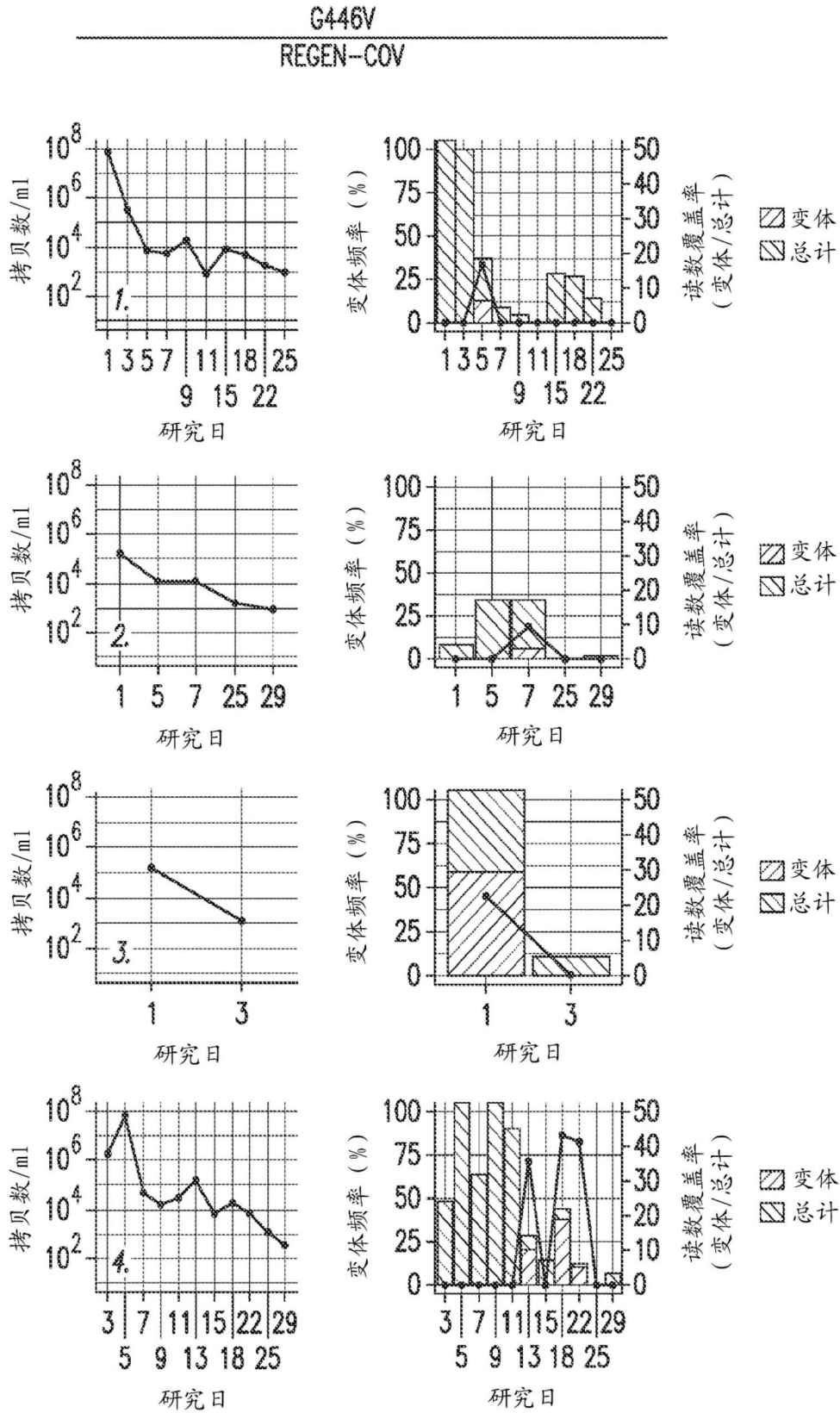


图29B-1

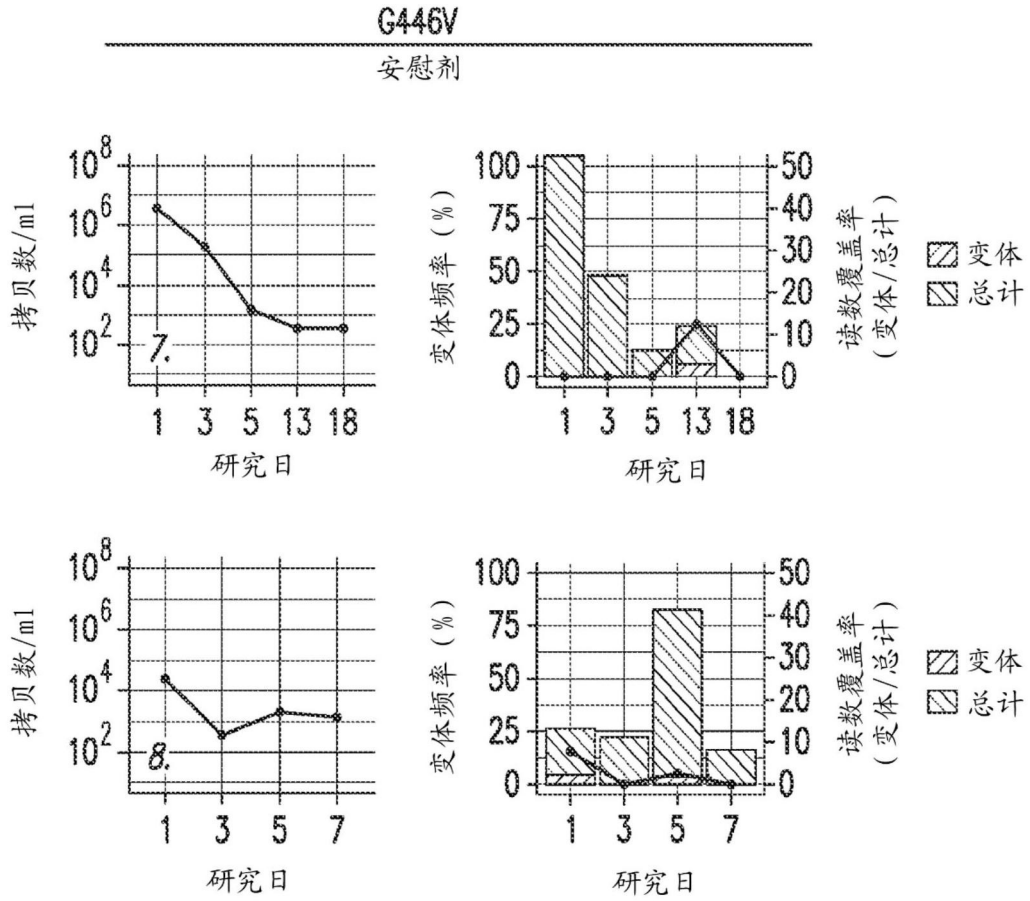


图29B-2

来自研究20666和2067的每个临床组的测序数据的统计。

| | 研究2066 | | | 研究2067 | | |
|--------|--------|---------------|------------------|--------|---------------|------------------|
| | 患者人数 | 样品数量 不同时间点 | 变体数量 (每样品变体数) | 患者人数 | 样品数量 不同时间点 | 变体数量 (每样品变体数) |
| 总计 | 272 | 1,336 | 244 (0.18) | 728 | 3,546 | 514 (0.14) |
| 安慰剂 | 91 | 472 | 90 (0.19) | 243 | 1,215 | 216 (0.18) |
| 全部治疗 | 181 | 864 | 184 (0.21) | 485 | 2,331 | 399 (0.17) |
| 低剂量治疗* | 88 | 423 | 88 (0.21) | 247 | 1,203 | 248 (0.21) |
| 高剂量治疗* | 93 | 441 | 109 (0.25) | 238 | 1,128 | 212 (0.19) |

*低剂量 = 2.4g IV
高剂量 = 8.0g IV

图30

S477N

REGEN-COV-住院患者

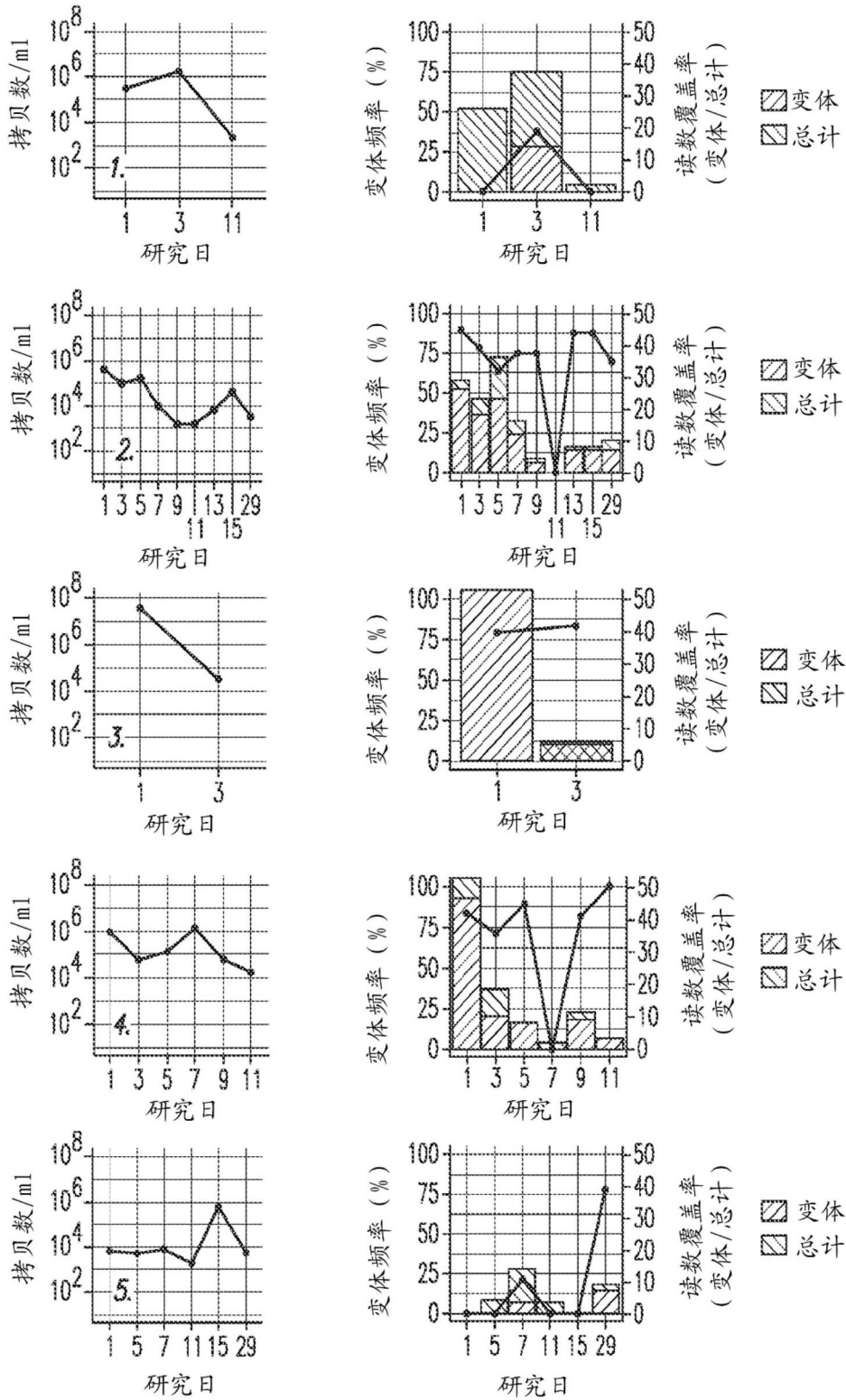


图31A

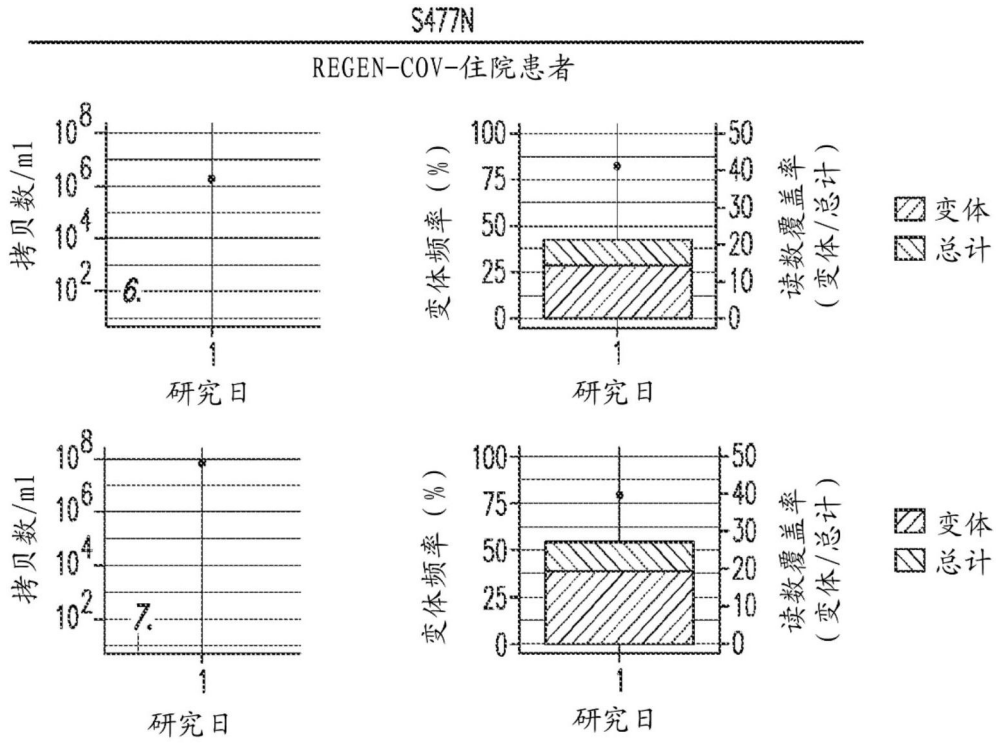


图31B

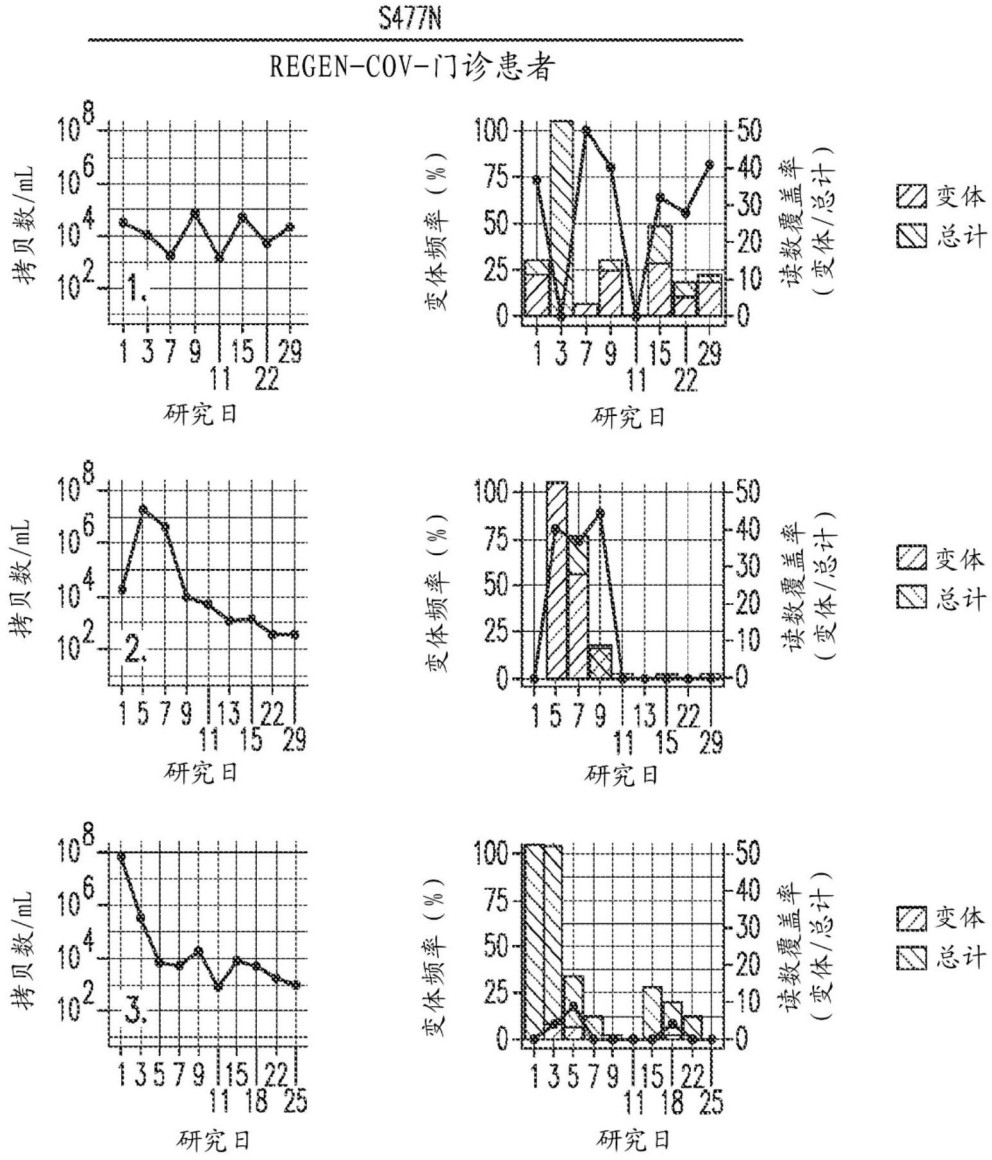


图32A

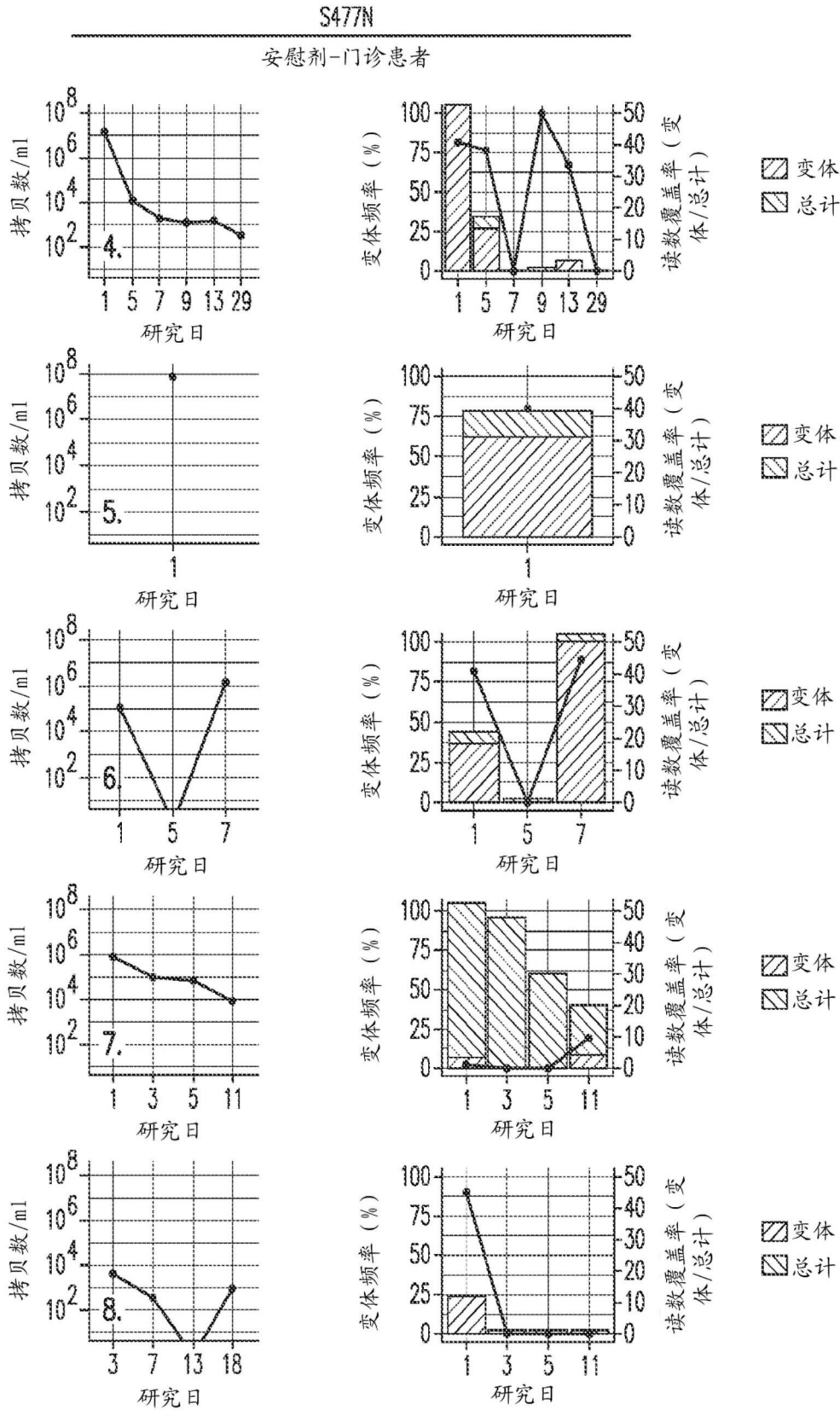


图32B

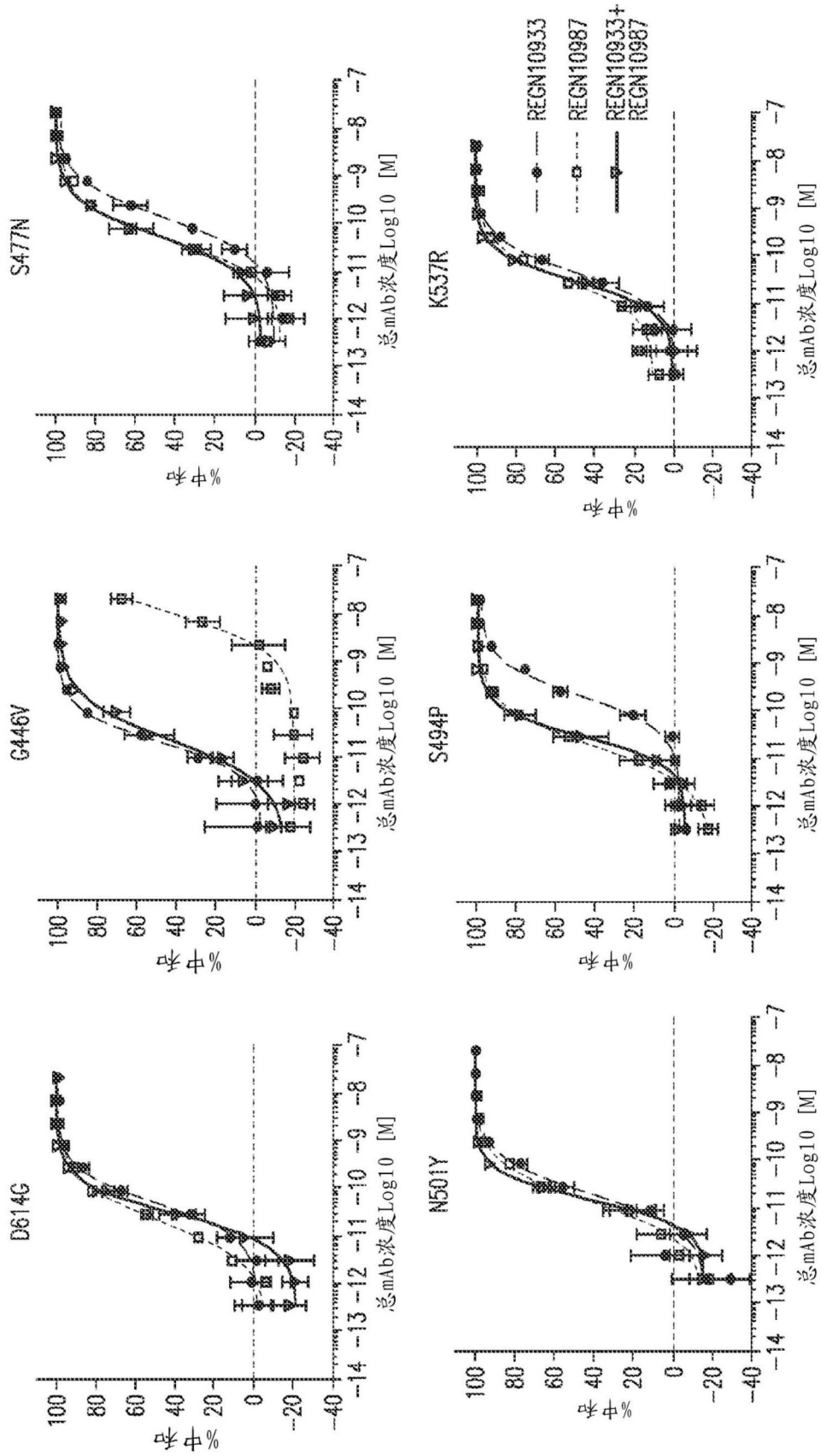


图33A

相对于参考 (D614G) 假病毒的 IC50 倍数降低

| 变体 | REGN10933 | REGN10987 | REGN10933+ REGN10987 |
|--------|-----------|-----------|-------------------------|
| G446V | 0.4 | 135.00 | 0.48 |
| S477N | 2.85 | 2.28 | 1.92 |
| S494P | 4.48 | 0.98 | 1.06 |
| N501Y* | 0.9 | 0.5 | 1.1 |
| K537R | 1.06 | 0.82 | 0.98 |

图33B

| 变体 | mAb治疗 | REGN10933 | REGN10987 | REGN-COV2 |
|--------|-------|-----------------|-----------|-----------|
| | | 相对于参考假病毒的IC50降低 | | |
| P384L | 10987 | 1.91 | 1.29 | 1.65 |
| K444T | 10987 | 1.98 | 1032.52 | 6.42 |
| V445A | 10987 | 1.93 | 548.10 | 4.69 |
| G446S | 10987 | 不适用 | 不适用 | 不适用 |
| G446D | 10987 | 不适用 | 不适用 | 不适用 |
| G446V* | 不适用 | 0.40 | 134.97 | 0.48 |
| L455W | 10933 | 不适用 | 不适用 | 不适用 |
| L455F* | 不适用 | 79.54 | 1.06 | 1.79 |
| F486S | 10933 | 不适用 | 不适用 | 不适用 |
| F486L* | 不适用 | 61.44 | 0.87 | 1.49 |
| F486V* | 不适用 | 437.54 | 0.87 | 2.68 |

图34