



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2021.01} C07K 16/10; G01N 33/577; G01N 33/569; A61K 39/00 (13) B



1-0051670

- (21) 1-2022-06776 (22) 25/03/2021
(86) PCT/US2021/024215 25/03/2021 (87) WO2021/195418 30/09/2021
(30) 63/000,299 26/03/2020 US; 63/002,896 31/03/2020 US; 63/003,716 01/04/2020 US;
63/023,545 12/05/2020 US; 63/024,204 13/05/2020 US; 63/024,248 13/05/2020 US;
63/027,173 19/05/2020 US; 63/037,984 11/06/2020 US; 63/040,224 17/06/2020 US;
63/040,246 17/06/2020 US; 63/142,196 27/01/2021 US; 63/161,890 16/03/2021 US
(45) 25/09/2025 450 (43) 26/06/2023 423A
(73) VANDERBILT UNIVERSITY (US)
305 Kirkland Hall 2201 West End Avenue Nashville, Tennessee 37240, United
States of America
(72) CROWE, James E., Jr. (US); ZOST, Seth (US); CARNAHAN, Robert (US);
GILCHUK, Pavlo (US).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

- (54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI PROTEIN GAI BÈ MẶT CORONAVIRUS 2
(SARS-COV-2) GÂY HỘI CHỨNG HÔ HẤP CẤP TÍNH NẶNG VÀ ĐƯỢC
PHÂN CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-06776

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với và trung hòa coronavirus có tên là SARS-CoV-2 và phương pháp sử dụng chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến lĩnh vực y học, bệnh truyền nhiễm, và miễn dịch học. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể người liên kết với coronavirus mới được đặt tên là SARS-CoV-2 và phương pháp sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đại dịch coronavirus mới (SARS-CoV-2) ảnh hưởng đến Trung Quốc đại lục, cùng với các ca bệnh ở 179 quốc gia và vùng lãnh thổ khác. Nó được nhận dạng ở Vũ Hán, thủ phủ của tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc, sau khi 41 người phát triển bệnh viêm phổi không rõ nguyên nhân. Virut, mà gây ra bệnh hô hấp cấp tính được đặt tên là bệnh coronavirus 2019 (COVID-19), có khả năng lây lan từ người sang người. Thời gian ủ bệnh (thời gian từ khi phơi nhiễm đến khi khởi phát triệu chứng) nằm trong khoảng từ 0 đến 24 ngày, với trung bình là 3-5 ngày, nhưng nó có thể lây lan trong khoảng thời gian này và sau khi hồi phục. Các triệu chứng bao gồm sốt, ho và khó thở. Ước tính tỉ lệ tử vong vào tháng 2 năm 2020 là 2% số ca được xác nhận, cao hơn trong số những người phải nhập viện.

Vào ngày 10 tháng 2 năm 2020, 40,627 ca bệnh đã được xác nhận (6,495 ca nặng), bao gồm ở mọi đơn vị hành chính cấp tỉnh của Trung Quốc. Số lượng người lớn hơn có thể đã bị nhiễm, nhưng không được phát hiện (đặc biệt là các ca bệnh nhẹ). Vào ngày 10 tháng 2 năm 2020, 910 ca tử vong được quy cho virut vì ca tử vong được xác nhận đầu tiên vào ngày 9 tháng 1, với 3,323 ca hồi phục. Sự truyền bệnh địa phương lần đầu tiên bên ngoài Trung Quốc xảy ra ở Việt Nam giữa các thành viên gia đình, trong khi sự truyền bệnh quốc tế đầu tiên không bao gồm gia đình xảy ra ở Đức vào ngày 22 tháng 1. Ca tử vong đầu tiên bên ngoài Trung Quốc là ở Philippin, nơi người đàn ông về từ Vũ Hán chết vào ngày 1 tháng 2. Vào ngày 10 tháng 2 năm 2020, số ca tử vong do virut này đã vượt qua sự bùng phát SARS toàn cầu năm 2003.

Vào đầu tháng 2 năm 2020, không có vắc xin được cấp phép và không có phương pháp điều trị đặc hiệu, mặc dù một vài hướng tiếp cận vắc xin và thuốc kháng

virut đang được nghiên cứu. Sự bùng phát này đã được tuyên bố là Tình Trạng Khẩn Cấp Y Tế Công Cộng Quốc Tế (Public Health Emergency of International Concern - PHEIC) bởi Tổ Chức Y Tế Thế Giới (World Health Organization - WHO), dựa trên các ảnh hưởng có thể có của virut nếu nó lây lan sang các quốc gia có hệ thống chăm sóc sức khỏe yếu kém hơn. Do đó, có nhu cầu khẩn cấp để nghiên cứu sinh học và bệnh học của SARS-CoV-2 và cũng như là đáp ứng miễn dịch của người đối với virut này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, theo sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự nhiễm COVID-19 với SARS-CoV-2 ở đối tượng bao gồm bước (a) cho mẫu từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4; và (b) phát hiện SARS-CoV-2 trong mẫu này bằng sự liên kết của kháng thể hoặc mảnh kháng thể này với kháng nguyên SARS-CoV-2 trong mẫu này. Mẫu có thể là dịch cơ thể, chẳng hạn như máu, đờm, nước mắt, nước bọt, dịch nhầy hoặc huyết thanh, tinh dịch, dịch tiết cổ tử cung hoặc âm đạo, nước ối, mô nhau, nước tiểu, dịch rì, dịch thấm, mảnh nạo mô hoặc phân. Sự phát hiện có thể có chứa ELISA, RIA, thử nghiệm dòng chảy bên hoặc thẩm tách western. Phương pháp này có thể còn bao gồm việc thực hiện các bước (a) và (b) lần thứ hai và xác định sự thay đổi của hàm lượng kháng nguyên SARS-CoV-2 khi so với thử nghiệm thứ nhất. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1, hoặc bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng 100% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, hoặc các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2. Mảnh kháng thể có thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, hoặc mảnh Fv.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng bị nhiễm SARS-CoV-2 hoặc làm giảm khả năng xảy ra của sự nhiễm của đối tượng có nguy cơ nhiễm SARS-CoV-2, bao gồm bước phân phối cho đối tượng này kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1, hoặc bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng 100% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, hoặc các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Mảnh kháng thể có thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Kháng thể có thể là kháng thể khảm hoặc kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể có thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể liên kết với kháng nguyên SARS-CoV-2 chẳng hạn như protein gai bề mặt. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được dùng trước khi lây nhiễm hoặc sau khi lây nhiễm. Đối tượng có thể là 60 tuổi hoặc già hơn, có thể bị thỏa hiệp miễn dịch, hoặc có thể mắc rối loạn hô hấp và/hoặc tim mạch. Việc phân phối có thể có chứa việc dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, hoặc việc phân phối di truyền với trình tự hoặc vectơ ARN hoặc ADN mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể đặc trưng bởi các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu

trong Bảng 1, hoặc bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng 100% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, hoặc các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Mảnh kháng thể có thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Kháng thể có thể là kháng thể khảm, là kháng thể đặc hiệu kép, hoặc là intrabody. Kháng thể có thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2.

Tế bào lai hoặc tế bào được thiết kế mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể đặc trưng bởi các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1, hoặc bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng 100% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, hoặc các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Mảnh kháng thể có thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Kháng thể có thể là kháng thể khảm, kháng thể đặc hiệu kép, hoặc intrabody. Kháng thể có thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297,

GASD/ALIE, DHS, YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm vắc xin có chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh kháng thể đặc trưng bởi các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Ít nhất là một trong số các kháng thể hoặc mảnh kháng thể này có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1, bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1, hoặc bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Ít nhất là một trong số kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, hoặc có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Ít nhất là một trong số các mảnh kháng thể này là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, hoặc mảnh Fv. Ít nhất là một trong số kháng thể này có thể là kháng thể khảm, kháng thể đặc hiệu kép hoặc intrabody. Kháng thể có thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể liên kết với protein gai bề mặt kháng nguyên SARS-CoV-2.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vắc xin có chứa một hoặc nhiều vector biểu hiện mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất như được mô tả trong bản mô tả này. (Các) vector biểu hiện có thể là (các) vector virus Sindbis hoặc VEE. Vắc xin có thể được tạo chế phẩm để phân phối bằng cách tiêm bằng kim,

phun tia, hoặc đục lỗ điện. Chế phẩm vắc xin có thể còn chứa một hoặc nhiều vector biểu hiện mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai, chẳng hạn như kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác biệt theo các điểm 26-34.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp bảo vệ sức khỏe của đối tượng 60 tuổi hoặc già hơn, đối tượng bị thỏa hiệp miễn dịch, hoặc đối tượng mắc rối loạn hô hấp và/hoặc tim mạch mà bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm SARS-CoV-2 bao gồm bước phân phối cho đối tượng này kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1, hoặc bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng 100% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, hoặc các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Mảnh kháng thể có thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Kháng thể có thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Kháng thể có thể là kháng thể khảm hoặc kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể này có thể được dùng trước khi lây nhiễm hoặc sau khi lây nhiễm. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể liên kết với kháng nguyên SARS-CoV-2 chẳng hạn như protein gai bề mặt. Việc phân phối có thể có chứa việc dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, hoặc việc phân phối di truyền với trình tự hoặc vector ARN hoặc ADN mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể cải thiện sự hô hấp của đối tượng khi so với đối chứng không được điều trị và/hoặc có thể làm giảm tải lượng virus khi so với đối chứng không được điều trị.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp xác định tính toàn vẹn kháng nguyên, cấu hình đúng và/hoặc trình tự đúng của protein gai bề mặt SARS-CoV-2 có chứa (a) cho mẫu có chứa kháng nguyên tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4; và (b) xác định tính toàn vẹn kháng nguyên, cấu hình đúng và/hoặc trình tự đúng của kháng nguyên bằng sự liên kết có thể phát hiện được của kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất với kháng nguyên. Mẫu có thể có chứa kháng nguyên hoặc chế phẩm vắc xin hoặc mẻ sản xuất vắc xin được sản xuất tái tổ hợp. Sự phát hiện có thể có chứa ELISA, RIA, thẩm tách western, cảm biến sinh học sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc phép đo cản trở lớp sinh học, hoặc nhuộm màu đếm tế bào theo dòng. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1, bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1, hoặc bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80% hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, hoặc có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Mảnh kháng thể thứ nhất có thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, hoặc mảnh Fv. Phương pháp này có thể còn bao gồm việc thực hiện các bước (a) và (b) lần thứ hai để xác định độ ổn định kháng nguyên của kháng nguyên theo thời gian.

Phương pháp này có thể còn bao gồm bước (c) cho mẫu có chứa kháng nguyên tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4; và (d) xác định tính toàn vẹn kháng nguyên của kháng nguyên bằng sự liên kết có thể phát hiện được của kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai với kháng nguyên. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai có thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1, bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng

1, hoặc bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80% hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2, hoặc có thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Mảnh kháng thể thứ nhất thứ hai có thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Phương pháp này có thể còn bao gồm việc thực hiện các bước (c) và (d) lần thứ hai để xác định độ ổn định kháng nguyên của kháng nguyên theo thời gian.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể đơn dòng người, hoặc tế bào lai hoặc tế bào được thiết kế sản xuất ra chúng, trong đó kháng thể liên kết với protein gai bề mặt kháng nguyên SARS-CoV-2.

Theo một khía cạnh (A1) được đề xuất trong bản mô tả này, phương pháp phát hiện sự nhiễm COVID-19 với SARS-CoV-2 ở đối tượng bao gồm các bước: (a) cho mẫu từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4; và (b) phát hiện SARS-CoV-2 trong mẫu này bằng sự liên kết của kháng thể hoặc mảnh kháng thể này với kháng nguyên SARS-CoV-2 trong mẫu này. Theo một khía cạnh (A2) của A1, mẫu là dịch cơ thể. Theo một khía cạnh (A3) của A1 hoặc A2, mẫu là máu, đờm, nước mắt, nước bọt, dịch nhầy hoặc huyết thanh, tinh dịch, dịch tiết cổ tử cung hoặc âm đạo, nước ối, mô nhau, nước tiểu, dịch rỉ, dịch thấm, mảnh nạo mô hoặc phân. Theo một khía cạnh (A4) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A3, sự phát hiện có chứa ELISA, RIA, thử nghiệm dòng chảy bên hoặc thấm tách western. Theo một khía cạnh (A5) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A4, phương pháp này còn bao gồm bước thực hiện các bước (a) và (b) lần thứ hai và xác định sự thay đổi của hàm lượng kháng nguyên SARS-CoV-2 khi so với thử nghiệm thứ nhất. Theo một khía cạnh (A6) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A5, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A7) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A5, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi

nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A8) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A5, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng 100% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A9) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A5, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A10) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A5, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A11) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A10, kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2. Theo một khía cạnh (A12) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A1-A11, mảnh kháng thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, hoặc mảnh Fv.

Theo một khía cạnh (A13) được đề xuất trong bản mô tả này, phương pháp điều trị cho đối tượng bị nhiễm SARS-CoV-2 hoặc làm giảm khả năng xảy ra của sự nhiễm của đối tượng có nguy cơ nhiễm SARS-CoV-2, bao gồm bước phân phối cho đối tượng này kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Theo một khía cạnh (A14) của A13, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A15) của A13 hoặc A14, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A16) của A13, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A17) của A13, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80% hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A18) của A13, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A19) của khía cạnh bất kỳ trong

số các khía cạnh A13-A18, mảnh kháng thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, hoặc mảnh Fv. Theo một khía cạnh (A20) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A13-A19, kháng thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Theo một khía cạnh (A21) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A13-A18, kháng thể là kháng thể khảm hoặc kháng thể đặc hiệu kép. Theo một khía cạnh (A22) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A13-A21 kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2. Theo một khía cạnh (A23) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A13-A22, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được dùng trước khi lây nhiễm hoặc sau khi lây nhiễm. Theo một khía cạnh (A24) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A13-A23, đối tượng này 60 tuổi hoặc già hơn, bị thỏa hiệp miễn dịch, hoặc mắc rối loạn hô hấp và/hoặc tim mạch. Theo một khía cạnh (A25) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A13-A24, việc phân phối có chứa việc dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, hoặc việc phân phối di truyền với trình tự hoặc vector ARN hoặc ADN mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể.

Theo một khía cạnh (A26) được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể đơn dòng, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể đặc trưng bởi các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Theo một khía cạnh (A27) của A26, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A28) của A26, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A29) của A26, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A30) của A26, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi

nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A31) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A26-A30, mảnh kháng thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Theo một khía cạnh (A32) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A26-A30, kháng thể là kháng thể khảm, hoặc là kháng thể đặc hiệu kép. Theo một khía cạnh (A33) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A26-A32, kháng thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Theo một khía cạnh (A34) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A26-A33, kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với kháng nguyên SARS-CoV-2 chẳng hạn như protein gai bề mặt. Theo một khía cạnh (A35) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A26-A34, kháng thể là intrabody.

Theo một khía cạnh (A36) được đề xuất trong bản mô tả này, tế bào lai hoặc tế bào được thiết kế mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể đặc trưng bởi các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Theo một khía cạnh (A37) của A36, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A38) của A36, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A39) của A36, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A40) của A36, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A41) của A36, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90%

với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A42) của A36, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A43) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A36-A42, mảnh kháng thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, hoặc mảnh Fv. Theo một khía cạnh (A44) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A36-A43, kháng thể là kháng thể khảm, kháng thể đặc hiệu kép, hoặc intrabody. Theo một khía cạnh (A45) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A36-A43, kháng thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Theo một khía cạnh (A46) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A36-A45, kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2.

Theo một khía cạnh (A47) được đề xuất trong bản mô tả này, chế phẩm vắc xin có chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh kháng thể đặc trưng bởi các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Theo một khía cạnh (A48) của A47, ít nhất là một trong số các kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A49) của A47, ít nhất là một trong số các kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A50) của A47, ít nhất là một trong số các kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A51) của A47, ít nhất là một trong số các kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A52) của A47, ít nhất là một trong số các kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và

chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A53) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A47-A52, ít nhất là một trong số các mảnh kháng thể này là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, hoặc mảnh Fv. Theo một khía cạnh (A54) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A47-A52, ít nhất là một trong số các kháng thể là kháng thể khảm, là kháng thể đặc hiệu kép hoặc intrabody. Theo một khía cạnh (A55) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A47-A54, kháng thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Theo một khía cạnh (A56) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A47-A55, kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2.

Theo một khía cạnh (A57) được đề xuất trong bản mô tả này, chế phẩm vắc xin có chứa một hoặc nhiều vector biểu hiện mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A26-A34. Theo một khía cạnh (A58) của A57, (các) vector biểu hiện là (các) vector virus Sindbis hoặc VEE. Theo một khía cạnh (A59) của A57 hoặc A58, chế phẩm vắc xin được tạo chế phẩm để phân phối bằng cách tiêm bằng kim, phun tia, hoặc đục lỗ điện. Theo một khía cạnh (A60) của A57, chế phẩm vắc xin còn chứa một hoặc nhiều vector biểu hiện mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai, chẳng hạn như kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác biệt của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A26-A34.

Theo một khía cạnh (A61) được đề xuất trong bản mô tả này, phương pháp bảo vệ sức khỏe của đối tượng 60 tuổi hoặc già hơn, đối tượng bị thỏa hiệp miễn dịch, hoặc đối tượng mắc rối loạn hô hấp và/hoặc tim mạch mà bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm SARS-CoV-2 bao gồm bước phân phối cho đối tượng này kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4. Theo một khía cạnh (A62) của A61, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được bắt cặp dòng như

nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A63) của A61 hoặc A62, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được bắt cặp dòng có độ tương đồng ít nhất là 95% với như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A64) của A61 hoặc A62, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 1. Theo một khía cạnh (A65) của A61, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A66) của A61, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80% hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A67) của A61, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A68) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A61-A67, mảnh kháng thể là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Theo một khía cạnh (A69), của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A61-A68, kháng thể là IgG, hoặc kháng thể hoặc mảnh kháng thể IgG tái tổ hợp có chứa phần Fc bị đột biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR, để làm tăng thời gian bán thải và/hoặc làm tăng hiệu quả điều trị, chẳng hạn như đột biến LALA, LALA PG, N297, GASD/ALIE, DHS, YTE hoặc LS hoặc glycan được cải biến để làm thay đổi (triệt tiêu hoặc tăng cường) sự tương tác FcR chẳng hạn như sự bổ sung hoặc loại bỏ bằng enzym hoặc hóa chất của glycan hoặc sự biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế với kiểu glycosyl hóa xác định. Theo một khía cạnh (A70) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A61-A67, kháng thể là kháng thể khảm hoặc kháng thể đặc hiệu kép. Theo một khía cạnh (A71) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A61-A70, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được dùng trước khi lây nhiễm hoặc sau khi lây nhiễm. Theo một khía cạnh (A72) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A61-A71, kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2. Theo một khía cạnh (A73) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A61-A72, việc phân phối có chứa việc dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, hoặc việc phân phối di truyền với trình tự hoặc vector ARN hoặc ADN mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Theo một khía cạnh (A74) của A61, kháng thể hoặc mảnh kháng thể cải

thiện sự hô hấp của đối tượng khi so với đối chứng không được điều trị. Theo một khía cạnh (A75) của A61, kháng thể hoặc mảnh kháng thể làm giảm tải lượng virus khi so với đối chứng không được điều trị.

Theo một khía cạnh (A76) được đề xuất trong bản mô tả này, phương pháp xác định tính toàn vẹn kháng nguyên, cấu hình đúng và/hoặc trình tự đúng của protein gai bề mặt SARS-CoV-2 bao gồm các bước: (a) cho mẫu có chứa kháng nguyên tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4; và (b) xác định tính toàn vẹn kháng nguyên, cấu hình đúng và/hoặc trình tự đúng của kháng nguyên bằng sự liên kết có thể phát hiện được của kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất với kháng nguyên. Theo một khía cạnh (A77) của A76, mẫu có chứa kháng nguyên được sản xuất tái tổ hợp. Theo một khía cạnh (A78) của A76, mẫu có chứa chế phẩm vắc xin hoặc mẻ sản xuất vắc xin. Theo một khía cạnh (A79) của A76-A78, sự phát hiện có chứa ELISA, RIA, thẩm tách western, cảm biến sinh học sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc phép đo cản trở lớp sinh học, hoặc nhuộm màu đếm tế bào theo dòng. Theo một khía cạnh (A80) của A76-A79, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất được mã hóa bởi các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A81) của A76-A79, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A82) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A76-A79, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A83) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A76-A79, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A84) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A76-A79, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80% hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A85) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A76-A79, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ nhất có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một

khía cạnh (A86) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A76-A85, mảnh kháng thể thứ nhất là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Theo một khía cạnh (A87) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A76-A86, phương pháp này còn bao gồm bước thực hiện các bước (a) và (b) lần thứ hai để xác định độ ổn định kháng nguyên của kháng nguyên theo thời gian. Theo một khía cạnh (A88) của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh A76-A87, phương pháp này còn bao gồm bước (c) cho mẫu có chứa kháng nguyên tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bắt cặp dòng lần lượt từ các Bảng 3 và 4; và (d) xác định tính toàn vẹn kháng nguyên của kháng nguyên bằng sự liên kết có thể phát hiện được của kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai với kháng nguyên. Theo một khía cạnh (A89) của A88, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai được mã hóa bởi các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A90) của A89, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự biến đổi được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A91) của A89, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai được mã hóa bởi các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng như nêu trong Bảng 1. Theo một khía cạnh (A92) của A89, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A93) của A89, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 70%, 80% hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A94) của A89, kháng thể hoặc mảnh kháng thể thứ hai có chứa các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp dòng từ Bảng 2. Theo một khía cạnh (A95) của A89, mảnh kháng thể thứ hai là kháng thể scFv (mảnh đơn chuỗi biến đổi) tái tổ hợp, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Theo một khía cạnh (A96) của A89, phương pháp này còn bao gồm bước thực hiện các bước (c) và (d) lần thứ hai để xác định độ ổn định kháng nguyên của kháng nguyên theo thời gian.

Theo một khía cạnh (A97) được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể hoặc mảnh kháng thể đơn dòng người, hoặc tế bào lai hoặc tế bào được thiết kế sản xuất ra chúng, trong đó kháng thể liên kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2.

Việc sử dụng danh từ số ít khi sử dụng kết hợp với thuật ngữ "có chứa" trong các yêu cầu bảo hộ và/hoặc bản mô tả có thể có nghĩa là "một," nhưng nó cũng thống nhất với nghĩa "một hoặc nhiều," "ít nhất là một," và "một hoặc nhiều hơn một." Từ "khoảng" có nghĩa là cột hoặc trừ 5% của số được chỉ ra.

Dự tính rằng phương pháp hoặc hợp phần bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện đối với phương pháp hoặc hợp phần khác bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Các mục đích, dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết sau đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng phần mô tả chi tiết và các ví dụ cụ thể mặc dù chỉ ra các phương án của sáng chế nhưng chỉ để minh họa, vì các thay đổi và cải biến khác nhau trong tinh thần và phạm vi của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực dựa trên phần mô tả chi tiết.

MÔ TẢ VẼ VÀ TẮT CÁC HÌNH VẼ

Bằng độc quyền sáng chế hoặc đơn đăng ký sáng chế này có chứa ít nhất là một hình vẽ có màu. Các bản sao của sáng chế hoặc công bố đơn sáng chế với (các) hình vẽ màu sẽ được cung cấp bởi Cơ quan theo yêu cầu và trả phí cần thiết.

Các hình vẽ sau đây tạo thành một phần của bản mô tả này và được bao gồm để chứng minh thêm các khía cạnh nhất định của sáng chế. Có thể hiểu rõ hơn sáng chế bằng cách viện dẫn đến một hoặc nhiều hình vẽ trong số các hình vẽ này kết hợp với phần mô tả chi tiết của các phương án cụ thể được trình bày trong bản mô tả này.

HÌNH 1. Chất nền đáp ứng liều lượng để đánh giá hoạt tính trung hòa hiệp đồng bằng hỗn hợp của COV2-2196 + COV2-2130 bằng cách sử dụng virus SARS-CoV-2 BSL3 sống. Về mặt định lượng có tỉ lệ nhỏ của virus không được trung hòa ở các nồng độ được thử nghiệm cao nhất (250 ng/ml) của các mAb riêng lẻ (các khung ở 0 ng/ml COV2-2196 + 250 ng/ml COV2-2130 và 250 ng/ml COV2-2196 + 0 ng/ml COV2-2130) nhưng sự trung hòa đầy đủ (100%) ở khoảng giá trị của các nồng độ Ab thấp hơn bằng tổ hợp này. Khung ở 15,6 ng/ml COV2-2196 + 63 ng/ml COV2-2130 chỉ ra khu vực với sự hiệp đồng lớn nhất với 15,6 ng/ml của mAb COV2-2196 và

63 ng/ml của mAb COV2-2130 ở dạng kết hợp mà trung hòa 96% virus, trong khi các Ab riêng lẻ chỉ thể hiện sự trung hòa lần lượt là 6 hoặc 0% (hình bảng van ở 0 ng/ml COV2-2196 + 63 ng/ml COV2-2130 và 15,6 ng/ml COV2-2196 + 0 ng/ml COV2-2130). Giá trị trung bình đối với ba bản sao kỹ thuật được thể hiện.

HÌNH 2A-B. Chất nền đáp ứng liều lượng để đánh giá hoạt tính trung hòa hiệp đồng bằng hỗn hợp của mAb COV2-2196 + mAb COV2-2130 bằng cách sử dụng virus sống SARS-CoV-2 BSL3. Giá trị trung bình của các giá trị của ba bản sao đối với các bản sao kỹ thuật được thể hiện. Dữ liệu được trực quan hóa và tính hiệp đồng được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm SynergyFinder.

HÌNH 3. Chất nền đáp ứng liều lượng để đánh giá hoạt tính trung hòa hiệp đồng bằng hỗn hợp của mAb COV2-2196 + mAb COV2-2130 bằng cách sử dụng virus sống SARS-CoV-2 BSL3. Diễn giải điểm của tính hiệp đồng: <-10 : sự tương tác có khả năng là đối kháng; từ -10 đến 10 : sự tương tác có khả năng là cộng gộp; >10 : sự tương tác có khả năng là hiệp đồng.

HÌNH 4A-C. Hiệu quả điều trị của mAb người trung hòa chống lại sự nhiễm SARS-CoV-2 đã được thiết lập. (HÌNH 4A) Chuột nhắt được gây nhiễm bằng đường trong mũi với 10^5 PFU của MA-SARS-CoV-2 và 12 giờ sau được cung cấp sự điều trị kháng thể được chỉ ra bằng cách tiêm trong màng bụng. Gánh nặng virus ở phổi được đo ở 2 ngày sau khi thử thách virus bằng cách sử dụng thử nghiệm màng. Các số đo từ các con chuột nhắt riêng lẻ và độ chuẩn trung vị được thể hiện, và mỗi nhóm được so sánh với đối chứng isotyp bằng cách sử dụng Kruskal-Wallis ANOVA với hậu kiểm Dunn (* $p < 0,05$). Dữ liệu thể hiện một thí nghiệm. **(HÌNH 4B)** Chuột nhắt BALB/c từ mười đến mười một tuần tuổi (một thí nghiệm của từ 3 đến 9 con chuột nhắt trong mỗi nhóm) được điều trị bằng mAb kháng Ifnar1 và được tải nạp bằng AdV-hACE2 thông qua đường trong mũi một ngày sau. Sau bốn ngày, chuột nhắt được gây nhiễm thông qua đường trong mũi với 10^5 FFU của SARS-CoV-2 nguyên bản và 12 giờ sau được cung cấp sự điều trị bằng mAb được chỉ ra bằng cách tiêm trong màng bụng. Gánh nặng virus ở phổi được đo ở 2 dpi sau khi thử thách virus bằng cách sử dụng thử nghiệm màng. Hai đối chứng đối với sự thực hiện thử nghiệm trung hòa màng bao gồm dịch đồng nhất phổi từ con chuột nhắt được điều trị bằng isotyp riêng lẻ mà được trộn 1:1 (thể tích:thể tích) với dịch đồng nhất phổi từ các con chuột nhắt không bị nhiễm hoặc được điều trị bằng hỗn hợp mAb COV2-2196 + COV2-2130 riêng lẻ. Các

số đo từ các con chuột nhất riêng lẻ và độ chuẩn trung vị được thể hiện, và mỗi nhóm được so sánh với đối chứng isotyp bằng cách sử dụng Kruskal-Wallis ANOVA với hậu kiểm Dunn (** $p < 0,01$). Dữ liệu thể hiện một thí nghiệm. (HÌNH 4C) Sự biểu hiện gen xytokin và chemokin được đo bằng phân tích qPCR từ phổi được thu hoạch như trên HÌNH 4B. Các số đo từ các con chuột nhất riêng lẻ và các giá trị trung vị được thể hiện. Các nhóm được so sánh bằng cách sử dụng kiểm định Mann-Whitney U (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

HÌNH 5. Được động học kháng thể sau khi truyền mAb người vào khỉ macaque.

HÌNH 6. Tải lượng virus SARS-CoV-2 (được đo dưới dạng ARN mới được tạo ra hệ gen phụ) ở dịch rửa phế quản khỉ macaque sau khi thử thách trong mũi và nội khí quản bằng virus SARS-CoV-2 kiểu đại.

HÌNH 7. Tải lượng virus SARS-CoV-2 (được đo dưới dạng ARN mới được tạo ra hệ gen phụ) trong mẫu dịch ngoáy mũi ở khỉ macaque sau khi thử thách trong mũi và nội khí quản bằng virus SARS-CoV-2 kiểu đại.

Các HÌNH 8A-E. Cấu trúc tinh thể của RBD protein S trong phức hợp với Fab COV2-2196. (HÌNH 8A) Hình vẽ minh họa của COV2-2196 trong phức hợp với RBD. Chuỗi nặng COV2-2196 được thể hiện bằng màu lục lam, chuỗi nhẹ bằng màu đỏ tươi, và RBD bằng màu xanh lá cây. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 8A của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 8B) Cấu trúc của phức hợp COV2-2196-RBD được chồng lên trên cấu trúc của phức hợp RBD-ACE2 người (PDB ID: 6M0J), sử dụng cấu trúc RBD làm mẫu tham chiếu. Sơ đồ màu sắc của phức hợp COV2-2196-RBD giống như sơ đồ màu sắc trên HÌNH 8A. RBD trong phức hợp RBD-ACE2 được tô màu bằng màu xanh nước biển nhạt, miền ACE2 peptidaza người bằng màu xám. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 8B của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 8C) Cấu trúc của phức hợp COV2-2196-RBD được chồng lên trên cấu trúc của gai với RBD đơn lẻ trên HÌNH dạng "lên" (PDB ID: 6XM4), sử dụng RBD ở hình dạng "lên" làm mẫu tham chiếu. Sơ đồ màu sắc của phức hợp COV2-2196-RBD giống như sơ đồ màu sắc trên HÌNH 8A. Ba tiểu đơn vị của gai được tô màu lần lượt bằng màu xám, màu vàng, hoặc màu xanh nước biển nhạt (tiểu đơn vị với RBD của nó

ở hình dạng "lên" là màu vàng). Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 8C của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 8D) Sự trình diện bề mặt của epitop RBD được nhận diện bởi COV2-2196. Các gốc epitop được tô màu bằng các sắc thái khác nhau của màu xanh lá cây và được gắn nhãn bằng màu đen. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 8D của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 8E) Sự tương tác kháng thể-kháng nguyên giữa COV2-2196 và RBD. RBD được thể hiện trong cùng sự trình diện và sự định hướng bề mặt như trên HÌNH 8D. Các gốc paratop COV2-2196 được thể hiện ở hình biểu diễn gậy. Chuỗi nặng được tô màu bằng màu lục lam, và chuỗi nhẹ được tô màu bằng màu đỏ tươi. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 8E của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.

Các HÌNH 9A-F. Cấu trúc tinh thể của RBD protein S trong phức hợp với cả hai Fab COV2-2196 và COV2-2130. (HÌNH 9A) Hình vẽ minh họa của cấu trúc tinh thể của RBD protein S trong phức hợp với các Fab COV2-2196 và COV2-2130. RBD được thể hiện bằng màu xanh lá cây, chuỗi nặng COV2-2196 bằng màu lục lam, chuỗi nhẹ COV2-2196 bằng màu đỏ tươi, chuỗi nặng COV2-2130 bằng màu vàng, và chuỗi nhẹ COV2-2130 bằng màu da cam. Các CDR của COV2-2130 được gắn nhãn. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 9A của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 9B) Cấu trúc của phức hợp COV2-2130-RBD được chồng lên trên cấu trúc của phức hợp RBD- ACE2 (PDB ID: 6M0J), sử dụng cấu trúc RBD làm mẫu tham chiếu. Sơ đồ màu sắc của phức hợp COV2-2130-RBD giống như sơ đồ màu sắc trên HÌNH 9A. RBD trong phức hợp RBD-ACE2 được tô màu bằng màu xanh nước biển nhạt, miền ACE2 peptidaza người bằng màu xám. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 9B của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó (HÌNH 9C). Cấu trúc của phức hợp COV2-2130-RBD được chồng lên trên cấu trúc của gai với tất cả RBD ở hình dạng "xuống" (PDB ID: 6ZOY), sử dụng RBD trong một vùng khởi động làm mẫu tham chiếu. Sơ đồ màu sắc của phức hợp COV2-2130-RBD giống như sơ đồ màu sắc trên HÌNH 9A. Ba vùng khởi động của gai được tô màu lần lượt bằng màu xám, màu xanh nước biển nhạt, hoặc màu tím. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 9C của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 9D) Cấu trúc

của phức hợp COV2-2196-2130-RBD được chồng lên trên cấu trúc của gai với một RBD ở hình dạng "lên" (PDB ID: 7CAK), sử dụng RBD ở hình dạng "lên" làm mẫu tham chiếu. Sơ đồ màu sắc của phức hợp COV2-2130-RBD giống như sơ đồ màu sắc trên HÌNH 9A. Ba vùng khởi động của gai được tô màu lần lượt bằng màu xám, màu xanh nước biển nhạt, hoặc màu tím. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 9D của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 9E) Sự trình diện bề mặt của epitop RBD được nhận diện bởi COV2-2130. Các gốc epitop được chỉ ra bằng các màu khác nhau và được gắn nhãn bằng màu đen. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 9E của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 9F) Sự tương tác của các gốc paratop COV2-2130 với epitop. RBD được thể hiện trong cùng sự trình diện và sự định hướng bề mặt như trên HÌNH 9E. Các gốc paratop được thể hiện ở hình biểu diễn gậy. Chuỗi nặng được tô màu bằng màu vàng, và chuỗi nhẹ bằng màu da cam. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 9F của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.

Các HÌNH 10A-B. (HÌNH 10A) Kết quả IMGT/DomainGapAlign của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ COV2-2196. Các gốc tương tác chính và các gốc tương ứng của chúng trong các gen dòng mầm được thể hiện trong các khung. Các SEQ ID NO đối với các trình tự trên HÌNH 10A như sau:

	FR2-HCDR2	HCDR3-FR4	LCDR1-FR2	LCDR3-FR4
IGHV1-58	SEQ ID NO. 101	SEQ ID NO. 102		
IGHD2-2		SEQ ID NO. 103		
IGHD2-8		SEQ ID NO. 104		
IGHD2-15		SEQ ID NO. 105		
IGHJ3*02		SEQ ID NO. 106		
IGKV3-20			SEQ ID NO. 107	SEQ ID NO. 108
IGKJ1*01				SEQ ID NO. 109
COV2-2196	SEQ ID NO. 110	SEQ ID NO. 111	SEQ ID NO. 112	SEQ ID NO. 113
COV2-2381	SEQ ID NO. 114	SEQ ID NO. 115	SEQ ID NO. 116	SEQ ID NO. 117
COV2-2072	SEQ ID NO. 118	SEQ ID NO. 119	SEQ ID NO. 120	SEQ ID NO. 121
McC5t2p1_G1	SEQ ID NO. 122	SEQ ID NO. 123	SEQ ID NO. 124	SEQ ID NO. 125
HbnC3t1p2_C6	SEQ ID NO. 126	SEQ ID NO. 127	SEQ ID NO. 128	SEQ ID NO. 129
HbnC3t1p1_C6	SEQ ID NO. 130	SEQ ID NO. 131	SEQ ID NO. 132	SEQ ID NO. 133
S2E12	SEQ ID NO. 134	SEQ ID NO. 135	SEQ ID NO. 136	SEQ ID NO. 137
COV107_1	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.

	138	139	140	141
COV107_2	SEQ ID NO. 142	SEQ ID NO. 143	SEQ ID NO. 144	SEQ ID NO. 145
COV72	SEQ ID NO. 146	SEQ ID NO. 147	SEQ ID NO. 148	SEQ ID NO. 149
COV21_1	SEQ ID NO. 150	SEQ ID NO. 151	SEQ ID NO. 152	SEQ ID NO. 153
COV21_2	SEQ ID NO. 154	SEQ ID NO. 155	SEQ ID NO. 156	SEQ ID NO. 157
COV57_1	SEQ ID NO. 158	SEQ ID NO. 159	SEQ ID NO. 160	SEQ ID NO. 161
COV57_2	SEQ ID NO. 162	SEQ ID NO. 163	SEQ ID NO. 164	SEQ ID NO. 165

(HÌNH 10B) Đường cong liên kết của các thể đột biến điểm của COV2-2196. cADN mã hóa cho các thể đột biến điểm đối với chuỗi nặng, được đóng khung ở trên, được thiết kế, được tổng hợp dưới dạng ADN để tạo ra protein IgG tái tổ hợp, và được thử nghiệm đối với hoạt tính liên kết với protein gai. Các thể đột biến của gốc D108 ở trên đồ thị bên trái phía trên, đột biến hồi biến của đột biến sinh dưỡng được suy ra thành trình tự dòng mầm ở trên đồ thị bên phải phía trên, các thể đột biến P99 ở trên đồ thị bên trái phía dưới, và thể đột biến loại bỏ liên kết disulfua trong HCDR3 ở trên đồ thị bên phải phía dưới.

Các HÌNH 11A-H. Nhận diện các gốc thiết yếu đối với COV2-2196 và COV2-2130 thông qua quét đột biến sâu ghép cặp với sự chọn lọc biến thể kháng. (HÌNH 11A) Các đồ thị biểu trưng của các phân đoạn trốn thoát đột biến của tất cả ở các vị trí RBD với sự trốn thoát mạnh đối với COV2-2196 (bên trái) hoặc COV2-2130 (bên phải). Các chữ cái cao hơn chỉ ra sự trốn thoát liên kết kháng thể lớn hơn. Các đột biến được tô màu dựa trên mức độ mà chúng làm giảm sự liên kết RBD với ACE2 người. Dữ liệu được thể hiện là giá trị trung bình của hai thí nghiệm chọn lọc trốn thoát độc lập sử dụng hai thư viện nấm men độc lập; sự tương quan được thể hiện trên các HÌNH 18B-C. Các phiên bản có thể phóng to, thu nhỏ, tương tác của các đồ thị biểu trưng này có ở jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/. The inventors determined các phân đoạn trốn thoát, như mô tả trong phương pháp, mà thể hiện phân

đoạn ước tính của các tế bào biểu hiện biến thể cụ thể đó mà nằm trong nhóm trốn thoát kháng thể, sao cho giá trị bằng 0 có nghĩa là biến thể luôn luôn được liên kết bởi kháng thể và giá trị bằng 1 có nghĩa là nó luôn trốn thoát khỏi việc liên kết kháng thể. (HÌNH 11B) Các đồ thị biểu trưng của các phân đoạn trốn thoát đột biến đối với COV2-2196 và COV2-2130 mà có thể tiếp cận được bằng các đột biến thể nucleotit đơn lẻ từ chủng tham chiếu Wuhan-Hu-1 được sử dụng trong sự chọn lọc trốn thoát (các HÌNH 11E-F). Tác dụng của mỗi đột biến thể lên sự liên kết ACE2 được thể hiện như trên HÌNH 11A. (HÌNH 11C) Bảng bên trái: lập bản đồ các đột biến trốn thoát quét đột biến sâu đối với COV2-2196 trên bề mặt RBD trong cấu trúc RBD-COV2-2196. Các đột biến mà triệt tiêu sự liên kết COV2-2196 được hiển thị trên cấu trúc RBD bằng cách sử dụng bản đồ nhiệt, trong đó màu xanh nước biển thể hiện vị trí RBD với sự trốn thoát kháng thể tích lũy lớn nhất và màu trắng thể hiện không có sự trốn thoát được phát hiện. Màu xám chỉ ra các gốc nơi mà các tác dụng có hại lên sự biểu hiện RBD ngăn chặn sự đánh giá của tác dụng của đột biến lên sự liên kết kháng thể. Bảng bên phải: hình phóng to của bảng bên trái thể hiện các gốc tương tác xung quanh các vị trí trốn thoát mạnh nhất của RBD. Chuỗi nặng COV2-2196 được tô màu lục lam và chuỗi nhẹ màu đỏ tươi. Hai bản sao được thực hiện với các thư viện độc lập, như mô tả trên HÌNH 11A. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 11C của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó (HÌNH 11D). Bảng bên phải: lập bản đồ các đột biến trốn thoát quét đột biến sâu đối với COV2-2130 trên bề mặt RBD trong cấu trúc RBD-COV2-2130. Các đột biến mà triệt tiêu sự liên kết COV2-2130 được hiển thị trên cấu trúc RBD sử dụng bản đồ nhiệt như trên HÌNH 11C. Bảng bên trái: hình phóng to của bảng bên trái thể hiện các gốc tương tác xung quanh các vị trí trốn thoát mạnh nhất của RBD. Chuỗi nặng COV2-2130 được tô màu vàng và chuỗi nhẹ màu hồng da cam. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 11D của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 11E) Bảng thể hiện kết quả của các thí nghiệm chọn lọc trốn thoát VSV-SARS-CoV-2 với COV2-2196, COV2-2130, và dạng kết hợp của chúng. Số lượng của các thể đột biến trốn thoát được chọn lọc và tổng số lượng của các bản sao chọn lọc trốn thoát được thực hiện được ghi nhận, cũng như là các gốc được nhận diện bằng cách xác định trình tự virus đột biến trốn thoát. (HÌNH 11F) Bảng thể hiện kết quả của sự cấy chuyển của SARS-CoV-2 trong sự có mặt của các nồng độ trung

hòa phụ của AZD8895 (dựa trên COV2-2196), AZD1061 (dựa trên COV2-2130), và AZD7442 (AZD8895 + AZD1061). Các đột biến virus có liên quan đến tính kháng được nhận diện bằng cách xác định trình tự mảng kháng trung hòa được chỉ ra. (HÌNH 11G) Biểu đồ phân tán thể hiện dữ liệu DMS từ HÌNH 11A, với phân đoạn trốn thoát đột biến trên trục x và tác dụng lên sự liên kết ACE2 trên trục y. Dấu gạch chéo chỉ ra các đột biến có thể tiếp cận được chỉ bằng các đột biến thể nhiều nucleotit, trong khi hình tròn chỉ ra các đột biến có thể tiếp cận được bằng đột biến thể một nucleotit. Các đột biến thể axit amin được chọn lọc bằng COV2-2130 trong VSV-SARS-CoV-2 (K444R, K444E) hoặc SARS-CoV-2 nguyên bản (R346I) được chỉ ra. (HÌNH 11H) Sự trung hòa kháng thể như đo được bằng FRNT chống lại các chủng tham chiếu và biến thể SARS-CoV-2 có liên quan. Thử nghiệm trung hòa được thực hiện trong hai bản sao và được lặp lại hai lần, với kết quả được thể hiện từ một bản sao thí nghiệm. Thanh sai số chỉ ra khoảng giá trị đối với mỗi điểm. Các đột biến được so sánh với chủng tham chiếu WA-1 được chỉ ra. B.1.1.7-OXF chứa đột biến mất 69-70 và 144-145 và các đột biến thể sau đây: N501Y, A570D, D614G, P681H, và T716I.

HÌNH 12. Sự gói lên nhau của cấu trúc con của RBD-COV2-2196 trong phức hợp RBD-COV2-2196-2130 và cấu trúc tinh thể RBD-COV2-2196.

Các HÌNH 13A-F. Các kiểu tương tác xếp chồng thơm và kỵ nước tương tự ở vị trí RBD F486 được chia sẻ giữa các phức hợp RBD-COV2-2196 và gai-S2E12. (Các HÌNH 13A và B) Cùng một kiểu liên kết hydro xung quanh góc F486 trong cấu trúc của hai phức hợp. (HÌNH 13C) Sự tương tác chi tiết giữa COV2-2196 và RBD. Chuỗi nặng COV2-2196 được tô màu bằng màu lục lam, chuỗi nhẹ được tô màu bằng màu đỏ tươi, và RBD được tô màu bằng màu xanh lá cây. Các góc tương tác quan trọng được thể hiện ở hình biểu diễn gậy. Phân tử nước tham gia vào sự tương tác Ab-Ag được thể hiện dưới dạng hình cầu màu hồng. Liên kết hydro trực tiếp được thể hiện dưới dạng đường nét đứt màu da cam, và liên kết hydro qua trung gian nước dưới dạng đường nét đứt màu vàng. Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 2C của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 13D) Sự xếp chồng của cấu trúc S2E12/RBD cryo-EM lên trên cấu trúc tinh thể COV2-2196/RBD, với các miền biến đổi của kháng thể làm mẫu tham chiếu. Chuỗi nặng COV2-2196 có màu lục lam, và chuỗi nhẹ của nó màu đỏ tươi; chuỗi nặng S2E12 màu lục lam nhạt, và chuỗi nhẹ của nó có màu hồng nhạt. Hai cấu trúc RBD

tương ứng được tô màu lần lượt bằng màu xanh lá cây hoặc màu vàng. Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 2D của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 13E) Sự tương tác chi tiết giữa chuỗi nặng COV2-2130 và RBD. Các gốc paratop được thể hiện bằng hình biểu diễn gậy và được tô màu bằng màu vàng, các gốc epitop là gậy màu xanh lá cây. Liên kết hydro hoặc sự tương tác phân cực mạnh được thể hiện dưới dạng đường màu đỏ tươi nét đứt. Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 2E của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 13F) Sự tương tác chi tiết giữa chuỗi nhẹ COV2-2130 và RBD. Các gốc paratop được thể hiện bằng hình biểu diễn gậy và được tô màu bằng màu da cam, các gốc epitop là gậy màu xanh lá cây. Liên kết hydro được thể hiện dưới dạng đường màu đỏ tươi nét đứt. Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 2F của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.

Các HÌNH 14A-E. Kiểu dòng vô tính thông thường của kháng thể kháng RBD với cùng một cơ chế liên kết. (HÌNH 14A) Cấu trúc tinh thể COV2-2196/RBD. (HÌNH 14B) Cấu trúc S2E12/RBD cryo-EM. (HÌNH 14C) Mô hình tương đồng COV2-2381/RBD. COV2-2072 mã hóa cho sequon glycosyl hóa được liên kết N trong HCDR3, được chỉ ra bằng hình cầu màu xám. Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 3D của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 14D) Mô hình tương đồng COV2-2072/RBD. (HÌNH 14E) Sự gối lên nhau của cấu trúc tinh thể COV2-2196/RBD (HÌNH 14A) và cấu trúc S2E12/RBD cryo-EM (HÌNH 14B).

Các HÌNH 15A-B. Nhận diện các thành viên kiểu dòng vô tính chung giả định tương tự về mặt di truyền với COV2-2196 trong tập hợp gen biến đổi kháng thể của các cá thể chưa từng nhiễm virus. Trình tự gen biến đổi kháng thể từ cá thể khỏe mạnh với cùng dấu hiệu trình tự như chuỗi nặng (HÌNH 15A) và chuỗi nhẹ (các HÌNH 15A và 15B) COV2-2196 được sắp xếp thẳng hàng. Các trình tự từ ba thể cho khác nhau cũng như là máu dây rốn bao gồm các trình tự với các dấu hiệu của kiểu dòng vô tính chung. Các dấu hiệu trình tự và các gốc tiếp xúc được sử dụng trong COV2-2196 được làm nổi bật bằng các khung bên dưới mỗi sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự (các khung được tô màu đỏ trong Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 4A của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó). Các SEQ ID NO đối

với các trình tự chuỗi nặng trên HÌNH 15A như sau: HIP1: SEQ ID NO. 166, HIP2: SEQ ID NO. 167, HIP3: SEQ ID NO. 168, và CORD: SEQ ID NO. 169. Các SEQ ID NO đối với các trình tự chuỗi nhẹ trên HÌNH 15A như sau: HIP1: SEQ ID NO. 170, HIP2: SEQ ID NO. 171, và HIP3: SEQ ID NO. 172. Các SEQ ID NO đối với các trình tự chuỗi nhẹ HIP1 trên HÌNH 15B như sau: SEQ ID NO. 173, SEQ ID NO. 174, SEQ ID NO. 175, SEQ ID NO. 176, và SEQ ID NO. 177 (từ trên xuống dưới). Các SEQ ID NO đối với các trình tự chuỗi nhẹ HIP2 trên HÌNH 15B như sau: SEQ ID NO. 178, SEQ ID NO. 179, SEQ ID NO. 180, SEQ ID NO. 181, và SEQ ID NO. 182 (từ trên xuống dưới). Các SEQ ID NO đối với các trình tự chuỗi nhẹ HIP3 trên HÌNH 15B như sau: SEQ ID NO. 183, SEQ ID NO. 184, SEQ ID NO. 185, SEQ ID NO. 186, và SEQ ID NO. 187 (từ trên xuống dưới).

Các HÌNH 16A-D. (HÌNH 16A) Cấu trúc vòng COV2-2130 HCDR3 chi tiết. Liên kết hydro phạm vi ngắn, làm ổn định hình dạng vòng, được thể hiện dưới dạng đường nét đứt (đường nét đứt được tô màu đỏ tươi trong Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 5A của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó). (HÌNH 16B) Các gốc của chuỗi nhẹ COV2-2130 tạo thành sự tương tác xếp chồng thơm và liên kết hydro với HCDR3 để làm ổn định thêm vòng HCDR3. (HÌNH 16C) LCDR1, HCDR2, và HCDR3 dài tạo thành bề mặt liên kết bổ sung đối với epitop RBD. RBD được thể hiện dưới dạng sự trình diện bề mặt bằng màu xám. Chuỗi nặng COV2-2130 được tô màu bằng màu vàng với HCDR3 màu da cam, và chuỗi nhẹ màu hồng da cam với LCDR1 màu đỏ tươi. Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 3D của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 16D) Hình quay 180° của HÌNH 16C.

HÌNH 17. Mặt phân cách giữa COV2-2196 và COV2-2130 trong cấu trúc tinh thể của RBD trong phức hợp với COV2-2196 và COV2-2130. Chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ COV2-2196 được thể hiện dưới dạng hình vẽ minh họa lần lượt bằng màu lục lam hoặc màu đỏ tươi, và chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ COV2-2130 lần lượt bằng màu vàng hoặc màu hồng da cam. RBD được tô màu bằng màu xanh lá cây. Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 6 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. Các gốc mặt phân cách được thể hiện ở hình biểu diễn gập.

Các HÌNH 18A-I. Nhận diện bằng quét đột biến sâu của các đột biến ảnh hưởng đến sự liên kết kháng thể và phương pháp chọn lọc các thể đột biến kháng kháng thể với virus VSV-SARS-CoV-2. (HÌNH 18A) Trên: Đồ thị đếm tế bào theo dòng thể hiện chiến lược cho đi qua cổng đại diện để chọn lọc tế bào nấm men đơn lẻ sử dụng bộ tán sắc phía trước và phía bên (ba bảng đầu tiên) và chọn lọc tế bào nấm men biểu hiện RBD (bảng bên phải). Mỗi đồ thị được tạo ra từ cổng đứng trước. Dưới: Đồ thị đếm tế bào theo dòng thể hiện sự cho đi qua cổng đối với tế bào nấm men RBD⁺, kháng thể (tức là, tế bào mà biểu hiện RBD nhưng trong đó đột biến ngăn chặn sự liên kết kháng thể). Thí nghiệm chọn lọc được thể hiện đối với COV2-2196 hoặc COV2-2130, với hai thư viện độc lập được thể hiện cho mỗi cái. (HÌNH 18B) Sự tương quan của các vị trí được quan sát thấy của sự trốn thoát khỏi sự liên kết kháng thể giữa các thí nghiệm chọn lọc thư viện nấm men sử dụng COV2-2196, COV2-2130, hoặc hỗn hợp 1:1 của COV2-2196 và COV2-2130. Trục x thể hiện phân đoạn trốn thoát tích lũy đối với mỗi vị trí đối với thư viện 1, và trục y thể hiện phân đoạn trốn thoát tích lũy đối với mỗi vị trí đối với thư viện 2. Hệ số tương quan và n được chỉ ra đối với mỗi biểu đồ. (HÌNH 18C) Sự tương quan của các đột biến được quan sát thấy mà trốn thoát sự liên kết kháng thể giữa thí nghiệm chọn lọc thư viện nấm men sử dụng COV2-2196, COV2-2130, hoặc hỗn hợp 1:1 của COV2-2196 và COV2-2130. Trục x thể hiện mỗi phân đoạn trốn thoát của đột biến axit amin đối với thư viện 1, và trục y thể hiện mỗi phân đoạn trốn thoát của đột biến axit amin đối với thư viện 2. Hệ số tương quan và n được chỉ ra đối với mỗi biểu đồ. (Các HÌNH 18D-F) Kết quả DMS đối với COV2-2196 (HÌNH 18D), COV2-2130 (HÌNH 18E), hoặc hỗn hợp 1:1 của COV2-2196 và COV2-2130 (HÌNH 18F). Các bảng bên trái: các vị trí của sự trốn thoát qua toàn bộ RBD được chỉ ra bằng các đỉnh mà tương ứng với các đồ thị biểu trưng trong các bảng ở giữa và bên phải. Bảng ở giữa: như trên HÌNH 11A, đồ thị biểu trưng của phân đoạn trốn thoát đột biến tích lũy của tất cả các vị trí RBD với các đột biến trốn thoát mạnh đối với COV2-2196, hoặc COV2-2130, hoặc COV2-2196+COV2-2130. Các đột biến được tô màu dựa trên mức độ mà chúng triệt tiêu RBD liên kết với ACE2 người. Bảng bên phải: một lần nữa, các đồ thị biểu trưng thể hiện các phân đoạn trốn thoát tích lũy, nhưng được tô màu dựa trên mức độ mà các đột biến tác dụng sự biểu hiện RBD trong hệ thống hiển thị nấm men. Các phiên bản có thể phóng to, thu nhỏ, tương tác của các đồ thị biểu trưng này nằm ở jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/.

Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 7F của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó (HÌNH 18G) Biểu đồ cảm biến RTCA đại diện thể hiện virus mà trốn thoát sự trung hòa kháng thể. Tác dụng gây bệnh tế bào (cytopathic effect - CPE) được theo dõi về mặt động học trong tế bào Vero E6 đã được gây nhiễm với virus trong sự có mặt của nồng độ bão hòa (5 $\mu\text{g/ml}$) của kháng thể COV2-2130. Các trường hợp đại diện của sự trốn thoát (màu đỏ tươi) hoặc không có sự trốn thoát có thể phát hiện được (màu xanh nước biển) được thể hiện. Tế bào không bị nhiễm (màu xanh lá cây) hoặc tế bào đã được gây nhiễm với virus mà không có kháng thể (màu đỏ) đóng vai trò làm đối chứng. Các đường cong màu đỏ tươi và màu xanh nước biển thể hiện giếng đại diện đơn lẻ; các đối chứng màu đỏ và màu xanh lá cây là giá trị trung bình của hai bản sao kỹ thuật. Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 7G của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 18H) Biểu đồ cảm biến RTCA đại diện xác nhận rằng biến thể virus được chọn lọc bằng COV2-2130 trên HÌNH 18G quả thực trốn thoát COV2-2130 (màu đỏ tươi) nhưng được trung hòa bằng COV2-2196 (màu xanh nước biển nhạt). Màu sắc có thể nhìn thấy trên Dữ Liệu Mở Rộng HÌNH 7H của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 18I) Các biểu đồ cảm biến ví dụ từ các giếng riêng lẻ của phân tích đĩa E 96 giếng đối với các thí nghiệm chọn lọc trốn thoát với COV2-2196, COV2-2130, hoặc hỗn hợp 1:1 của COV2-2196 và COV2-2130. Các trường hợp của sự trốn thoát khỏi COV2-2130 được ghi nhận, trong khi sự trốn thoát không được phát hiện trong sự có mặt của COV2-2196 hoặc COV2-2196+COV2-2130. Các đối chứng dương và âm được chỉ ra trên đĩa thứ nhất.

HÌNH 19. Phương pháp chọn lọc các thể đột biến kháng kháng thể với virus SARS-CoV-2 nguyên bản.

HÌNH 20(A-I). Các đặc điểm chức năng của mAb SARS-CoV-2 trung hòa. (HÌNH 20A) Bản đồ nhiệt của hoạt tính trung hòa mAb, hoạt tính phong bế hACE2, và sự liên kết với protein S2Pecto dạng trimer hoặc SRBD dạng monome. Các mAb được sắp xếp thứ tự theo hiệu lực trung hòa (cao nhất ở trên cùng, thấp nhất ở dưới cùng). Đường nét đứt chỉ ra 13 kháng thể với giá trị IC_{50} trung hòa thấp hơn 150 ng/ml đối với virus wt. Giá trị IC_{50} được trực quan hóa đối với sự trung hòa virus và sự phong bế hACE2, trong khi giá trị EC_{50} được trực quan hóa đối với sự liên kết. Dạng tái tổ hợp

của mAb SARS-CoV SRBD phản ứng chéo CR3022 được thể hiện dưới dạng đối chứng dương, trong khi mAb kháng dengue 2D22 được thể hiện dưới dạng đối chứng âm. Dữ liệu là đại diện của ít nhất là 2 thí nghiệm độc lập, mỗi thí nghiệm được thực hiện trong hai bản sao kỹ thuật. Không có sự ức chế chỉ ra giá trị $IC_{50} > 10.000$ ng/ml, trong khi không có sự liên kết chỉ ra giá trị $EC_{50} > 10.000$ ng/ml. (Các HÌNH 20B-E) Sự tương quan của sự phong bế hACE2, sự liên kết trime S2Pecto, hoặc sự liên kết SRBD của mAb với hoạt tính trung hòa của chúng. Giá trị R2 được thể hiện đối với phân tích hồi quy tuyến tính của giá trị được biến đổi log. Hình tròn sẫm màu (được thể hiện bằng màu tím trên các HÌNH 1B-E của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó) chỉ ra mAb với giá trị IC_{50} trung hòa thấp hơn 150 ng/ml. (HÌNH 20E) Sự tương quan của sự phong bế hACE2 và sự liên kết trime S2Pecto. Giá trị R2 được thể hiện đối với phân tích hồi quy tuyến tính của giá trị được biến đổi log. (HÌNH 20F) Đường cong trung hòa đối với COV2-2196 và COV2-2130 trong thử nghiệm trung hòa chống lại virus SARS-CoV-2 nguyên bản. Giá trị IC_{50} tính được được chỉ ra trên biểu đồ. Thanh sai số chỉ ra độ lệch chuẩn của mỗi điểm. Dữ liệu là đại diện của ít nhất là 2 thí nghiệm độc lập, mỗi thí nghiệm được thực hiện trong hai bản sao kỹ thuật. (HÌNH 20G) Đường cong trung hòa đối với COV2-2196 và COV2-2130 trong thử nghiệm trung hòa virus giả. Thanh sai số chỉ ra độ lệch chuẩn của mỗi điểm. Các giá trị được thể hiện là hai bản sao kỹ thuật từ một thí nghiệm đơn lẻ. Giá trị IC_{50} tính được từ nhỏ nhất là 6 thí nghiệm được chỉ ra trên biểu đồ. (HÌNH 20H) Đường cong phong bế hACE2 đối với COV2-2196, COV2-2130, và mAb SARS-CoV không phong bế rCR3022 trong ELISA phong bế hACE2. Giá trị IC_{50} tính được được chỉ ra trên biểu đồ. Thanh sai số chỉ ra độ lệch chuẩn của mỗi điểm. Các giá trị được thể hiện là ba bản sao kỹ thuật từ thí nghiệm đại diện được lặp lại hai lần. (HÌNH 20I) Sự liên kết ELISA của COV2-2196, COV2-2130, và rCR3022 với S2Pecto dạng trime. Giá trị EC_{50} tính được được chỉ ra trên biểu đồ. Thanh sai số chỉ ra độ lệch chuẩn của mỗi điểm. Các giá trị được thể hiện là ba bản sao kỹ thuật từ thí nghiệm đại diện được lặp lại hai lần.

HÌNH 21 (A-D). Lập bản đồ epitop của mAb bằng phân tích liên kết cạnh tranh và sự trung hòa hiệp đồng bằng cặp mAb. (HÌNH 21A) Bên trái: thử nghiệm liên kết cạnh tranh dựa trên phép đo cản trở lớp sinh học đo khả năng của mAb để ngăn chặn sự liên kết của các mAb tham chiếu COV2-2196 và rCR3022 với RBD dung hợp với

Fc chuột nhắt (RBD-mFc) đã được tải lên trên cảm biến sinh học kháng Fc chuột nhắt. Các giá trị trong hình vuông là % của sự liên kết của mAb tham chiếu trong sự có mặt của mAb cạnh tranh tương quan với đối chứng cạnh tranh mô phỏng. Hình vuông màu đen chỉ ra sự cạnh tranh đầy đủ (<33% của sự liên kết tương quan với đối chứng không cạnh tranh), trong khi hình vuông màu trắng chỉ ra không có sự cạnh tranh (>67% của sự liên kết tương quan với đối chứng không cạnh tranh). Bên phải: thử nghiệm liên kết cạnh tranh dựa trên phép đo cản trở lớp sinh học đo khả năng của mAb để ngăn chặn sự liên kết của hACE2. Các giá trị chỉ ra % liên kết của hACE2, được chuẩn hóa đối với sự liên kết hACE2 khi không có sự cạnh tranh. Phần tô đậm chỉ ra sự cạnh tranh của mAb với hACE2. (Phần tô đậm được thể hiện bằng màu đỏ trên HÌNH 2A của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.) (HÌNH 21B) Sự cạnh tranh của bảng mAb trung hòa với các mAb tham chiếu COV2-2130, COV2-2196, hoặc rCR3022. mAb tham chiếu được biotinyl hóa và sự liên kết của mAb tham chiếu với S2Pecto dạng trime được đo trong sự có mặt của lượng bão hòa của mỗi mAb trong sự cạnh tranh ELISA. Tín hiệu ELISA đối với mỗi mAb tham chiếu được chuẩn hóa đối với tín hiệu trong sự có mặt của mAb kháng dengue không liên kết 2D22. Màu đen chỉ ra sự cạnh tranh đầy đủ (<25% liên kết của mAb tham chiếu), màu xám chỉ ra sự cạnh tranh một phần (25-60% liên kết của mAb tham chiếu), và màu trắng chỉ ra không có sự cạnh tranh (>60% liên kết của mAb tham chiếu). (HÌNH 21C) Sự trung hòa hiệp đồng của SARS-CoV-2 kiểu đại bằng COV2-2196 và COV2-2130. Phía trên: chất nền trung hòa với các dịch pha loãng theo dãy của mỗi mAb. Thí nghiệm được thực hiện trong ba bản sao kỹ thuật. Được thể hiện là thí nghiệm đại diện của các thí nghiệm được thực hiện trong ba bản sao kỹ thuật. % Trung hòa đối với mỗi dạng kết hợp của các mAb được thể hiện trong mỗi hình vuông. Bản đồ nhiệt từ màu trắng-đến-màu đen lần lượt chỉ ra sự trung hòa 0% đến sự trung hòa 100%. (Bản đồ nhiệt được thể hiện bằng từ màu trắng-đến-màu đỏ trên HÌNH 2C của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.) (HÌNH 21D) Ma trận hiệp đồng được tính dựa trên sự trung hòa SARS-CoV-2 trên HÌNH 21C. Màu tối hơn (được thể hiện bằng màu đỏ trên HÌNH 2D của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó) chỉ ra khu vực trong đó sự trung hòa hiệp

đồng được quan sát thấy, và khung màu đen chỉ ra khu vực của sự hiệp đồng lớn nhất giữa hai mAb.

HÌNH 22 (A-F). Nhận diện epitop và xác định đặc điểm cấu trúc của mAb. (HÌNH 22A) Nhận diện các gốc tiếp xúc thiết yếu bằng cách gây miễn dịch alanin và arginin. Phía trên: sự liên kết của COV2-2130 (màu vàng đậm), COV2-2165 (màu nâu sẫm) hoặc COV2-2196 (màu tím đậm) với các cấu trúc SRBD kiểu dại (wt) hoặc đột biến được đo bằng phép đo cản trở lớp sinh học. Được thể hiện trên trục y là đáp ứng được chuẩn hóa đối với tín hiệu được quan sát thấy để liên kết với SRBD wt. Phía dưới: đường cong liên kết đại diện đối với COV2-2196 với các cấu trúc wt hoặc SRBD với các gốc tiếp xúc thiết yếu bị đột biến. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 3A của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 22B) Cấu trúc tinh thể của SARS-CoV-2 (màu xanh nước biển) và hACE2 (màu xanh lá cây) (PDB (6M0J)). Mô típ nhận diện hACE2 được tô màu orange. Các gốc tiếp xúc thiết yếu đối với COV2-2130 được thể hiện dưới dạng hình cầu màu vàng đậm, trong khi các gốc tiếp xúc thiết yếu đối với COV2-2196 được thể hiện dưới dạng hình cầu màu tím. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 3B của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 22C) Sự liên kết ELISA của mAb với mô típ nhận diện hACE2 có 60 axit amin. r2D22, mAb kháng dengue, được thể hiện dưới dạng đối chứng âm. Phía dưới: cấu trúc của mô típ nhận diện hACE2 bằng màu da cam với các gốc tiếp xúc thiết yếu COV2-2196 được thể hiện bằng màu tím. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 3C của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 22D) Phức hợp trime một Fab:S2Pecto được trực quan hóa bằng cách soi kính hiển vi điện tử bắt màu âm tính đối với COV2-2130 (màu vàng đậm), COV2-2165 (màu nâu sẫm), hoặc COV2-2196 (màu tím đậm). RBD được thể hiện bằng màu xanh nước biển và miền đầu tận cùng N S (NTD) được thể hiện bằng màu đỏ. Mật độ điện tử được thể hiện bằng màu xám. Trạng thái trime (mở hoặc đóng) được chỉ ra đối với mỗi phức hợp. Giá trị trung bình lớp 2D đại diện đối với mỗi phức hợp được thể hiện ở phía dưới (khung kích thước 128 pixel). Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 3D của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. (HÌNH 22E) Các Fab COV2-2130 và COV2-2196 trong phức hợp với trime S2Pecto. Sự liên kết đồng thời của các Fab COV2-2130

(màu vàng đậm) và COV2-2196 (màu tím) với trime S2Pecto. Mật độ điện tử được thể hiện bằng màu xám. Trạng thái trime (mở hoặc đóng) được chỉ ra. Giá trị trung bình lớp 2D đại diện đối với phức hợp được thể hiện ở phía dưới (khung kích thước 128 pixel). Tất cả các ảnh được tạo ra bằng Chimera. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 3E của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó, (HÌNH 22F) Phân tích liên kết cạnh tranh được trực quan hóa trên trime S2Pecto. Cấu trúc tinh thể CR3022 được gắn vào cấu trúc hai Fab:trime S2Pecto. CR3022 được thể hiện bằng màu lục lam. Màu sắc có thể nhìn thấy trên HÌNH 3F của Ví dụ 5 của U.S. 63/161,890, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. Phía dưới: sơ đồ Venn định lượng chỉ ra số lượng của mAb trong mỗi nhóm cạnh tranh và sự gối lên nhau giữa các nhóm.

HÌNH 23 (A-F). Hiệu quả bảo vệ của mAb người trung hòa chống lại sự nhiễm SARS-CoV-2. (HÌNH 23A) Mô hình thử thách SARS-CoV-2. Chuột nhắt BALB/c từ mười đến mười một tuần tuổi (hai thí nghiệm của 4-5 con chuột nhắt trong mỗi nhóm) được điều trị bằng mAb kháng Ifnar1 và được tải nạp với AdV-hACE2 thông qua đường i.n. một ngày sau. Sau bốn ngày, các con chuột nhắt được điều trị thông qua đường i.p. bằng 200 μ g của mAb CoV2-2196, -2130, hoặc dạng kết hợp (tỉ lệ 1:1) hoặc mAb đối chứng isotyp. Một ngày sau, SARS-CoV-2 được gây nhiễm thông qua đường i.n.. Mô được thu lấy ở 7 dpi để phân tích (các HÌNH 23C và 23D). (HÌNH 23B) Sự thay đổi khối lượng cơ thể của chuột nhắt trong bảng a. (ANOVA thông thường hai chiều với hậu kiểm Tukey: **** $P < 0,0001$). (HÌNH 23C) Gánh nặng virus trong phổi, lách và tim được đo bằng RT-qPCR: Kruskal-Wallis ANOVA với hậu kiểm Dunn (*, $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$). Đường nét đứt chỉ ra giới hạn thử nghiệm của sự phát hiện. (HÌNH 23D) Sự biểu hiện gen xytokin và chemokin được đo bằng phân tích qPCR. Kruskal- Wallis ANOVA với hậu kiểm Dunn (*, $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (HÌNH 23E) Mô hình thử thách MA-SARS-CoV-2. Chuột nhắt BALB/c mười hai tuần tuổi ($n=10$) được gây nhiễm với 105 PFU của MA-SARS-CoV-2 thông qua đường i.n.. Sự thay đổi khối lượng cơ thể của chuột nhắt được thể hiện. (HÌNH 23F) Gánh nặng virus trong phổi được đo ở 2 dpi bằng RT-qPCR (bên trái) hoặc thử nghiệm mảng (bên phải) từ (HÌNH 23E): Kruskal-Wallis ANOVA với hậu kiểm Dunn (*** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$).

HÌNH 24. Đường cong trung hòa SARS-CoV-2 đối với bằng mAb. Sự trung hòa của SARS-CoV-2 nguyên bản bằng mAb người. Trung bình $\pm$ SD của hai bản sao kỹ thuật được thể hiện. Dữ liệu thể hiện một trong số hai hoặc hơn hai thí nghiệm độc lập.

Các HÌNH 25A-B. Đường cong ức chế đối với sự ức chế mAb của S2Pecto liên kết với hACE2. Sự phong bế của sự liên kết hACE2 với S2Pecto bằng mAb người trung hòa kháng SARS-CoV-2. Trung bình $\pm$ SD của ba bản sao của một thí nghiệm được thể hiện. Các kháng thể CR3022 và 2D22 đóng vai trò làm đối chứng.

Các HÌNH 26A-B. Sự liên kết ELISA của mAb người trung hòa kháng SARS-CoV-2 với kháng nguyên SRBD, S2Pecto, hoặc SARS-CoV S2Pecto dạng trimer. Trung bình $\pm$ SD của ba bản sao và đại diện của hai thí nghiệm được thể hiện. Các kháng thể CR3022 và 2D22 đóng vai trò làm đối chứng.

HÌNH 27A-B. Lập bản đồ của các gốc tiếp xúc thiết yếu mAb bằng cách gây miễn dịch alanin và arginin và phép đo cản trở lớp sinh học. (HÌNH 27A) Bên trái: Các giá trị đáp ứng đối với mAb liên kết với các cấu trúc SRBD wt hoặc đột biến được chuẩn hóa đối với wt. Dấu sao chỉ ra các gốc trong đó sự phân ly tăng lên của mAb được quan sát thấy, có khả năng chỉ ra gốc ở gần epitop mAb. Bên phải: đường cong đáp ứng đầy đủ đối với sự kết hợp và sự phân ly mAb với các cấu trúc SRBD wt hoặc đột biến. (HÌNH 27B) Cấu trúc của RBD làm nổi bật các gốc tiếp xúc thiết yếu đối với một vài mAb và vị trí của chúng trên cấu trúc.

MÔ TẢ CHI TIẾT SÁNG CHẾ

Như thảo luận ở trên, SARS-CoV-2 là mối quan tâm y tế chính với số ca bệnh nhiều tăng lên hàng ngày. Do đó, việc hiểu về sinh học của virus này và bản chất và phạm vi của đáp ứng miễn dịch của người đối với virus là hết sức quan trọng. Các tác giả sáng chế đã xác định các trình tự của kháng thể người đối với SARS-CoV-2. Các trình tự này và việc sử dụng đối với các kháng thể này được bộc lộ ở đây.

Hơn nữa, bằng cách nghiên cứu chi tiết sự tương tác của một kháng thể (COV2-2196) với RBD, các tác giả sáng chế xác định cơ sở phân tử để chọn lọc kiểu dòng vô tính chung đối với SARS-CoV-2 mà được điều khiển bằng cấu hình cấu trúc phức hợp gồm cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các dấu hiệu cấu trúc chung của kiểu dòng vô tính này góp phần vào sự tạo thành của paratop có chứa các gốc trong cả chuỗi nặng và

chuỗi nhẹ, nhưng đáng chú ý là độc lập với HCDR3 mà thường chiếm ưu thế tương tác kháng nguyên-kháng thể. Các tác giả sáng chế chứng minh kiểu dòng vô tính chung này là một trong số các loại được chia sẻ thường xuyên hơn của kháng thể trung hòa hiệu nghiệm được tạo ra bởi người đối với RBD protein S SARS-CoV-2. Nghiên cứu cấu trúc chi tiết phát hiện ra rằng paratop kháng thể được tạo thành thông thường góp phần vào "lòng thom" được tạo thành bằng năm gốc thom trong paratop xung quanh mặt phân cách của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Cấu trúc lòng này phối trí gốc thom trên protein S SARS-CoV-2, lý giải cho độ đặc hiệu và ái lực cao của các kháng thể này. Đáng chú ý là, mặc dù cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đều cần thiết để tạo thành kiểu dòng vô tính chung này (do đó định ra các gen IGHV, IGHJ, IGLV và IGLJ chính tắc trong kiểu dòng vô tính), HCDR3 ảnh hưởng tối thiểu đến sự tương tác. Vì sự tái tổ hợp chuỗi nặng IGHV1-58-IGHJ3 và chuỗi nhẹ IGKV3-20-IGKJ1 phổ biến trong danh mục tế bào B tiền miễn dịch, nhiều cá thể có khả năng tạo ra các dòng này trong quá trình đáp ứng với sự nhiễm SARS-CoV-2 hoặc sự chủng ngừa. Vị trí kháng nguyên được nhận diện bằng cấu trúc đã được tạo cấu hình từ trước dạng phức hợp của kiểu dòng vô tính chung này có khả năng là thành phần quan trọng của vắc xin bảo vệ đối với COVID-19 do tần suất của dòng tế bào B trong quần thể người và hiệu lực trung hòa và bảo vệ của kháng thể được mã hóa bởi các đoạn gen biến đổi.

Các khía cạnh này và các khía cạnh khác của sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây.

I. Coronavirus 2019 (SARS-CoV-2)

SARS-CoV-2 là virus lây nhiễm gây ra bệnh hô hấp cấp tính được đặt tên là bệnh coronavirus 2019 (COVID-19), bệnh nhiễm trùng hô hấp. Nó là nguyên nhân của sự bùng phát coronavirus 2019–20 đang diễn ra, tình trạng khẩn cấp y tế toàn cầu. Việc xác định trình tự hệ gen đã cho thấy rằng nó là coronavirus ARN sợi đơn, có nghĩa dương tính.

Trong quá trình bùng phát đang diễn ra này, virus thường được đề cập đến theo cách nói thông thường là "coronavirus", "coronavirus mới" và "coronavirus Vũ Hán", trong khi WHO khuyến nghị dùng tên gọi "SARS-CoV-2". Ủy Ban Quốc Tế Về Phân

Loại Virut (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) tuyên bố rằng tên chính thức của virut này là SARS-CoV-2.

Nhiều ca bệnh sớm liên quan đến chợ hải sản và động vật lớn ở thành phố Vũ Hán, Trung Quốc, và virut này được cho là có nguồn gốc từ bệnh lây truyền từ động vật sang người. So sánh các trình tự di truyền của virut này và các mẫu virut khác đã cho thấy tính tương tự với SARS-CoV (79,5%) và coronavirus ở dơi (96%). Phát hiện này đưa ra khả năng nguồn gốc cuối cùng là ở dơi, mặc dù vật chủ trung gian, chẳng hạn như tê tê, không thể được loại trừ. Virut có thể là virut tái tổ hợp được tạo thành từ hai hoặc hơn hai coronavirus.

Sự truyền từ người sang người của virut đã được xác nhận. Coronavirus chủ yếu lây lan thông qua sự tiếp xúc gần, cụ thể là thông qua giọt bắn hô hấp từ ho và hắt hơi trong phạm vi khoảng 6 feet (1,8 m). ARN virut cũng được tìm thấy trong mẫu phân từ bệnh nhân bị lây nhiễm. Có thể là virut có thể lây nhiễm ngay cả trong thời gian ủ bệnh.

Động vật được bán làm thực phẩm ban đầu bị nghi ngờ là vật chủ dự trữ hoặc vật chủ trung gian của SARS-CoV-2 vì nhiều trong số các cá thể đầu tiên được phát hiện là bị lây nhiễm bởi virut là người làm việc ở Chợ Hải Sản Hoa Nam. Chợ bán động vật sống làm thực phẩm cũng bị đổ lỗi trong sự bùng phát SARS vào năm 2003; các chợ này được coi là lò ấp của các tác nhân gây bệnh mới. Sự bùng phát này đã thúc đẩy lệnh cấm tạm thời đối với việc buôn bán và tiêu thụ động vật hoang dã ở Trung Quốc. Tuy nhiên, một số nhà nghiên cứu đề xuất rằng Chợ Hải Sản Hoa Nam có thể không phải là nguồn gốc ban đầu của sự truyền virut sang cho người.

Với số lượng đủ của các hệ gen được xác định trình tự, có thể xây dựng lại cây phát sinh loài của lịch sử đột biến của họ virut. Nghiên cứu về nguồn gốc của sự bùng phát SARS 2003 đã dẫn đến phát hiện về nhiều coronavirus giống SARS ở dơi, hầu hết có nguồn gốc từ chi *Rhinolophus* của dơi móng ngựa. SARS-CoV-2 thuộc vào loại coronavirus liên quan đến SARS này. Hai trình tự hệ gen từ *Rhinolophus sinicus* được công bố vào năm 2015 và 2017 thể hiện sự giống nhau 80% với SARS-CoV-2. Hệ gen virut thứ ba từ *Rhinolophus affinis*, "RaTG13" được thu thập ở tỉnh Vân Nam, có sự giống nhau 96% với SARS-CoV-2.^{[28][29]} Để so sánh, lượng biến đổi giữa các virut

tương tự với lượng của đột biến được quan sát thấy trong mười năm ở chủng virus cúm ở người H3N2.

SARS-CoV-2 thuộc họ virus rộng đã được biết đến dưới dạng coronavirus; "nCoV" là thuật ngữ chuẩn được sử dụng để đề cập đến coronavirus mới cho đến khi chọn được tên gọi cụ thể hơn. Nó là virus ARN sợi đơn (+ssRNA) có nghĩa dương tính. Các coronavirus khác có khả năng gây bệnh từ cảm lạnh thông thường đến bệnh nặng hơn chẳng hạn như hội chứng hô hấp Trung Đông (Middle East respiratory syndrome - MERS) và Hội chứng hô hấp cấp tính nghiêm trọng (Severe acute respiratory syndrome - SARS). Nó là coronavirus được biết đến thứ bảy lây nhiễm cho người, sau 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV, và SARS-CoV.

Giống như SARS-CoV, SARS-CoV-2 là thành viên của phân chi *Sarbecovirus* (Beta-CoV dòng B). Trình tự ARN của nó có chiều dài xấp xỉ 30.000 bazơ. Vào ngày 12 tháng 1, năm hệ gen của SARS-CoV-2 đã được phân lập từ Vũ Hán và được báo cáo bởi Trung Tâm Kiểm Soát Và Phòng Ngừa Bệnh Trung Quốc (Chinese Center for Disease Control and Prevention - CCDC) và các viện khác; số lượng của hệ gen tăng lên đến 28 vào ngày 26 tháng 1. Ngoại trừ đối với hệ gen GenBank sớm nhất, các hệ gen bị cấm vận ở GISAID. Phân tích phát sinh loài đối với các mẫu có sẵn thông qua Nextstrain.

Công bố của hệ gen SARS-CoV-2 dẫn đến một vài thí nghiệm lập mô hình protein trên protein liên kết thụ thể (receptor binding protein - RBD) của protein gai (S) của virus. Kết quả gợi ý rằng protein S giữ lại đủ ái lực với thụ thể Enzym chuyển hóa angiotensin 2 (Angiotensin converting enzyme 2 - ACE2) để sử dụng nó làm cơ chế đi vào tế bào. Vào ngày 22 tháng 1, nhóm ở Trung Quốc làm việc với virus đầy đủ và nhóm ở Mỹ làm việc với di truyền ngược chứng minh một cách độc lập và bằng thí nghiệm ACE2 người là thụ thể đối với SARS-CoV-2.

Để tìm kiếm chất ức chế proteaza tiềm năng, proteaza giống 3C virus M(pro) từ polyprotein ORF1a cũng đã được lập mô hình cho thí nghiệm dự đoán vị trí gắn kết thuốc. Innophore đã tạo ra hai mô hình tính toán dựa trên SARS proteaza, và Chinese Academy of Sciences đã sản xuất cấu trúc thí nghiệm chưa được công bố của SARS-CoV-2 proteaza tái tổ hợp. Ngoài ra, các nhà nghiên cứu ở Đại Học Michigan (the

University of Michigan) đã lập mô hình cấu trúc của tất cả các peptit trưởng thành trong hệ gen SARS-CoV-2 bằng cách sử dụng I-TASSER.

Sự lây nhiễm ở người được biết đến lần đầu tiên xảy ra vào đầu tháng 12 năm 2019. Sự bùng phát của SARS-CoV-2 được phát hiện đầu tiên ở Vũ Hán, Trung Quốc, vào giữa tháng 12 năm 2019, có khả năng là bắt nguồn từ động vật bị lây nhiễm đơn lẻ. Virus tiếp đó lây lan sang tất cả các tỉnh thành của Trung Quốc và sang hơn hai tá quốc gia khác ở Châu Á, Châu Âu, Bắc Mỹ, và Châu Đại Dương. Sự lây lan từ người sang người của virus đã được xác nhận ở tất cả các khu vực này. Vào ngày 30 tháng 1 năm 2020, SARS-CoV-2 được chỉ định là tình trạng khẩn cấp y tế toàn cầu bởi WHO.

Vào ngày 10 tháng 2 năm 2020 (17:15 UTC), có 40,645 ca bệnh đã được xác nhận của sự nhiễm, trong số đó 40,196 ca ở Trung Quốc đại lục. Ban đầu, gần như tất cả ca bệnh bên ngoài Trung Quốc xảy ra ở người đến từ Vũ Hán, hoặc tiếp xúc trực tiếp với người đến từ khu vực này. Sau đó, sự lây lan từ khách du lịch đến các quốc gia khác dẫn đến sự truyền bệnh ở nhiều quốc gia trên thế giới. Mặc dù tỉ lệ lây nhiễm mà dẫn đến sự lây nhiễm được xác nhận hoặc tiến triển thành bệnh hô hấp cấp tính SARS-CoV-2 có thể chẩn đoán vẫn không rõ ràng, tổng số ca tử vong do virus là hơn 19.000 vào ngày 25 tháng 3 năm 2020.

Hệ số lây nhiễm cơ bản (R_0) của virus được ước tính là từ 1,4 đến 3,9. Điều này có nghĩa là, khi không được kiểm tra, virus thường dẫn đến từ 1,4 đến 3,9 ca bệnh mới cho mỗi sự lây nhiễm đã xảy ra. Đã xác minh được rằng virus có thể truyền theo chuỗi ít nhất là bốn người.

Vào tháng 1 năm 2020, nhiều tổ chức và viện bắt đầu nghiên cứu chế tạo vắc xin đối với SARS-CoV-2 dựa trên hệ gen đã được công bố. Ở Trung Quốc, Trung Tâm Kiểm Soát Và Phòng Ngừa Bệnh Trung Quốc đang phát triển vắc xin chống lại coronavirus mới. Đại Học Hong Kong (The University of Hong Kong) cũng đã tuyên bố rằng vắc xin đang được phát triển ở đó. Bệnh Viện Đông Thượng Hải (Shanghai East Hospital) cũng đang phát triển vắc xin cộng tác với công ty công nghệ sinh học Stemirna Therapeutics.

Ở những nơi khác, ba dự án vắc xin đang được hỗ trợ bởi Liên Minh Đổi Mới Sáng Tạo Chuẩn Bị Ứng Phó Dịch Bệnh (Coalition for Epidemic Preparedness Innovations - CEPI), bao gồm các dự án của các công ty công nghệ sinh học Moderna

và Inovio Pharmaceuticals và dự án khác của Đại học Queensland (the University of Queensland). Viện Y Tế Quốc Gia Hoa Kỳ (the United States National Institutes of Health - NIH) hợp tác với Moderna để chế tạo vắc xin ARN ăn khớp gai của bề mặt coronavirus; các thử nghiệm lâm sàng Giai đoạn I bắt đầu vào tháng 3 năm 2020. Inovio Pharmaceuticals đang phát triển sự chủng ngừa dựa trên ADN và cộng tác với công ty Trung Quốc để tăng tốc sự chấp nhận nó bởi các cơ quan quản lý ở Trung Quốc, hy vọng thực hiện các thử nghiệm ở người của vắc xin trong mùa hè năm 2020. Ở Australia, Đại Học Queensland đang nghiên cứu tiềm năng của vắc xin kẹp phân tử mà sẽ cải biến di truyền protein virus để làm cho chúng bắt chước coronavirus và kích thích phản ứng miễn dịch.

Trong dự án độc lập, Cơ quan Y tế Công cộng Canada đã cấp phép cho Trung Tâm Vắc Xin Quốc Tế (VIDO-InterVac) ở Đại Học Saskatchewan (the University of Saskatchewan) bắt đầu nghiên cứu vắc xin. VIDO-InterVac dự định bắt đầu sản xuất và thử nghiệm trên động vật vào tháng 3 năm 2020, và thử nghiệm trên người vào năm 2021. Imperial College Faculty of Medicine ở London đang ở giai đoạn thử nghiệm vắc xin trên động vật.

Bệnh hô hấp cấp tính COVID-19 là bệnh hô hấp do virus gây ra bởi SARS-CoV-2. Nó được phát hiện đầu tiên trong quá trình bùng phát coronavirus Vũ Hán 2019–20. Các triệu chứng có thể bao gồm sốt, ho khan, và hơi thở ngắn. Không có phương pháp điều trị đã được cấp phép đặc hiệu sẵn có vào tháng 3 năm 2020, với các nỗ lực tập trung vào việc làm giảm nhẹ các triệu chứng và hỗ trợ hoạt động chức năng.

Những người bị lây nhiễm có thể không có triệu chứng hoặc có triệu chứng từ nhẹ đến nặng, như sốt, ho, hơi thở ngắn. Tiêu chảy hoặc các triệu chứng đường hô hấp trên (*ví dụ như*, hắt hơi, chảy nước mũi, đau họng) ít thường xuyên hơn. Các ca lây nhiễm nặng có thể tiến triển thành bệnh viêm phổi nặng, suy đa cơ quan, và tử vong. Thời gian từ khi phơi nhiễm đến khi khởi phát triệu chứng được ước tính là từ 2 đến 10 ngày bởi Tổ Chức Y Tế Thế Giới, và từ 2 đến 14 ngày bởi Trung Tâm Kiểm Soát và Phòng Ngừa Bệnh Hoa Kỳ (US Centers for Disease Control and Prevention - CDC).

Các tổ chức y tế toàn cầu đã công bố các biện pháp ngăn ngừa mà cá thể có thể tiến hành để làm giảm cơ hội lây nhiễm SARS-CoV-2. Các khuyến nghị này tương tự

với các khuyến nghị đã được công bố trước đây đối với các coronavirus khác và bao gồm: rửa tay thường xuyên bằng xà phòng và nước; không chạm tay chưa rửa vào mắt, mũi, hoặc miệng; và thực hành vệ sinh hô hấp tốt.

WHO đã công bố một vài quy trình thử nghiệm đối với SARS-CoV-2. Thử nghiệm sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược thời gian thực (rRT-PCR). Thử nghiệm này có thể được thực hiện trên các mẫu đường hô hấp hoặc máu. Kết quả thường có trong vòng từ vài giờ đến vài ngày.

Nghiên cứu về các phương pháp điều trị tiềm năng đối với bệnh này được bắt đầu vào tháng 1 năm 2020. Trung Tâm Kiểm Soát Và Phòng Ngừa Bệnh Trung Quốc bắt đầu thử nghiệm các phương pháp điều trị bệnh viêm phổi hiện có ở bệnh viêm phổi liên quan đến coronavirus vào cuối tháng 1. Cũng có xét nghiệm về chất ức chế ARN polymeraza remdesivir, và interferon beta. Vào cuối tháng 1 2020, các nhà nghiên cứu y học Trung Quốc đã bày tỏ dự định bắt đầu thử nghiệm lâm sàng trên remdesivir, cloquine, và lopinavir/ritonavir, tất cả chúng dường như có "tác dụng ức chế khá tốt" trên SARS-CoV-2 ở cấp độ tế bào trong nghiên cứu thăm dò. Vào ngày 5 tháng 2 năm 2020, Trung Quốc bắt đầu cấp bằng sáng chế cho việc sử dụng remdesivir cho bệnh này.

Tổng tỉ lệ tử vong và tỉ lệ mắc bệnh do sự lây nhiễm SARS-CoV-2 chưa được biết đến, đều do tỉ lệ tử vong ca bệnh có thể thay đổi theo thời gian trong sự bùng phát hiện nay, và do tỉ lệ lây nhiễm mà tiến triển thành bệnh có thể chẩn đoán được vẫn không rõ ràng. Tuy nhiên, nghiên cứu sơ bộ về bệnh hô hấp cấp tính SARS-CoV-2 cho thấy con số tỉ lệ tử vong ca bệnh nằm trong khoảng từ 2% đến 3%, và vào tháng 1 năm 2020 WHO đưa ra giả thiết tỉ lệ tử vong ca bệnh là xấp xỉ 3%. Nghiên cứu in trước của Imperial College chưa được xét duyệt trong số 55 ca tử vong cho thấy rằng ước tính ban đầu của tỉ lệ tử vong có thể quá cao vì sự lây nhiễm không có triệu chứng bị bỏ qua. Họ ước tính tỉ lệ tử vong do lây nhiễm trung bình (tỉ lệ tử vong trong số những người bị lây nhiễm) nằm trong khoảng từ 0,8% khi bao gồm những người mang mầm bệnh không có triệu chứng đến 18% khi chỉ bao gồm các ca bệnh có triệu chứng từ tỉnh Hồ Bắc.

Dữ liệu sớm chỉ ra rằng trong số 41 ca bệnh đã được xác nhận đầu tiên nhập viện ở Vũ Hán, 13 (32%) người cần chăm sóc đặc biệt, và 6 (15%) người bị chết.

Trong số những người bị chết, nhiều người có sức khỏe yếu từ đầu, thể hiện các tình trạng như huyết áp cao, tiểu đường, hoặc bệnh tim mạch mà làm suy yếu hệ thống miễn dịch của họ. Ở các ca bệnh sớm của bệnh hô hấp cấp tính SARS-CoV-2 mà dẫn đến tử vong, thời gian trung vị của bệnh được phát hiện là 14 ngày, với tổng thời gian là từ sáu đến 41 ngày.

II. Kháng Thể Đơn Dòng Và Việc Sản Xuất Chúng

"Kháng thể đã được phân lập" là kháng thể mà đã được tách và/hoặc được thu hồi từ thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Thành phần tạp chất của môi trường tự nhiên của nó là nguyên liệu mà gây trở ngại cho việc sử dụng để chẩn đoán hoặc trị liệu đối với kháng thể, và có thể bao gồm enzym, hormon, và các chất tan là protein hoặc không là protein khác. Trong các phương án cụ thể, kháng thể được tinh chế: (1) đến lớn hơn 95% theo khối lượng của kháng thể như được xác định bằng phương pháp Lowry, và cụ thể nhất là lớn hơn 99% theo khối lượng; (2) đến mức độ đủ để thu được ít nhất là 15 gốc của trình tự axit amin đầu tận cùng N hoặc bên trong bằng cách sử dụng thiết bị xác định trình tự cột quay; hoặc (3) đến độ đồng nhất bằng SDS-PAGE trong điều kiện khử hoặc không khử bằng cách sử dụng xanh Coomassie hoặc nhuộm màu bạc. Kháng thể đã được phân lập bao gồm kháng thể *in situ* ở trong tế bào tái tổ hợp vì ít nhất là một thành phần của môi trường tự nhiên của kháng thể không có mặt. Tuy nhiên, thông thường, kháng thể đã được phân lập được điều chế bằng ít nhất là một bước tinh chế.

Đơn vị kháng thể bốn chuỗi cơ bản là glycoprotein dạng heterotetrame gồm có hai chuỗi nhẹ (L) giống nhau và hai chuỗi nặng (H) giống nhau. Kháng thể IgM gồm có 5 đơn vị heterotetrame cơ bản cùng với polypeptit bổ sung được gọi là chuỗi J, và do đó chứa 10 vị trí liên kết kháng nguyên, trong khi kháng thể IgA được tiết ra có thể polyme hóa để tạo thành cụm lắp ráp đa hóa trị có chứa 2-5 đơn vị 4 chuỗi cơ bản cùng với chuỗi J. Trong trường hợp của IgG, đơn vị 4 chuỗi thường là khoảng 150.000 dalton. Mỗi chuỗi L được liên kết với chuỗi H bằng một liên kết disulfua cộng hóa trị, trong khi hai chuỗi H được liên kết với nhau bằng một hoặc nhiều liên kết disulfua tùy thuộc vào isotíp chuỗi H. Mỗi chuỗi H và L cũng có các cầu disulfua nội chuỗi cách quãng đều đặn. Mỗi chuỗi H có ở đầu tận cùng N, vùng biến đổi (V_H) sau đó là ba

miền không đổi (C_H) đối với mỗi chuỗi trong số các chuỗi alpha và gamma và bốn miền C_H đối với mu và isotýp. Mỗi chuỗi L có ở đầu tận cùng N, vùng biến đổi (V_L) sau đó là miền không đổi (C_L) ở đầu kia của nó. V_L được sắp xếp thẳng hàng với V_H và C_L được sắp xếp thẳng hàng với miền không đổi thứ nhất của chuỗi nặng (C_{H1}). Các gốc axit amin cụ thể được tin là tạo thành mặt phân cách giữa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Sự bắt cặp của V_H và V_L với nhau tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên đơn lẻ. Đối với cấu trúc và tính chất của các lớp khác nhau của kháng thể, xem, *ví dụ như*, Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6.

Chuỗi L từ loài động vật có xương sống bất kỳ có thể được gán vào một trong số hai typ phân biệt rõ ràng, gọi là kappa và lambda dựa trên trình tự axit amin của miền không đổi của chúng (C_L). Tùy thuộc vào trình tự axit amin của miền không đổi của chuỗi nặng của chúng (C_H), globulin miễn dịch có thể được gán vào các lớp hoặc isotýp khác nhau. Có năm lớp của globulin miễn dịch: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, có chuỗi nặng lần lượt được ký hiệu là alpha, delta, epsilon, gamma và mu. Các lớp gamma và alpha được chia tiếp thành các phân lớp trên cơ sở sự khác biệt tương đối nhỏ trong trình tự và chức năng C_H , con người biểu hiện các phân lớp sau đây: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, và IgA2.

Thuật ngữ “biến đổi” dùng để chỉ ra rằng các phân đoạn nhất định của các miền V khác biệt lớn về trình tự giữa các kháng thể. Miền V làm trung gian cho sự liên kết kháng nguyên và xác định tính đặc hiệu của kháng thể cụ thể đối với kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, độ biến đổi không được phân bố đều trên khoảng 110 axit amin của vùng biến đổi. Thay vào đó, vùng V gồm các đoạn tương đối bất biến gọi là vùng khung (FR) gồm 15-30 axit amin được phân cách bởi các vùng ngắn hơn có độ biến đổi cực kỳ gọi là "vùng siêu biến đổi", mỗi vùng có chiều dài 9-12 axit amin. Mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nguyên bản có chứa bốn FR, phần lớn chấp nhận cấu hình tấm beta, được kết nối bởi ba vùng siêu biến, tạo thành kết nối vòng, và trong một số trường hợp tạo thành một phần của, cấu trúc tấm beta. Vùng siêu biến trong mỗi chuỗi được giữ lại với nhau rất gần bằng các FR và với vùng siêu biến từ chuỗi khác góp phần vào việc tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể (xem tài liệu Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public

Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Miền không đổi không tham gia trực tiếp vào việc liên kết kháng thể với kháng nguyên, nhưng thể hiện các chức năng tác động khác nhau, chẳng hạn như sự tham gia của kháng thể trong sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC), thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular phagocytosis - ADCP), thực bào bạch cầu trung tính phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent neutrophil phagocytosis - ADNP), và sự lắng đọng bổ thể phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent complement deposition - ADCD).

Thuật ngữ "vùng siêu biến" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ các gốc axit amin của kháng thể chịu trách nhiệm cho sự liên kết kháng nguyên. Vùng siêu biến thường có chứa các gốc axit amin từ "vùng xác định tính bổ sung" hay "CDR" (ví dụ như, xung quanh các gốc 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) trong V_L , và xung quanh 31-35 (H1), 50-65 (H2) và 95-102 (H3) trong V_H khi được đánh số theo hệ thống đánh số Kabat; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); và/hoặc các gốc từ "vùng siêu biến" (ví dụ như, các gốc 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) trong V_L , và 26-32 (H1), 52-56 (H2) và 95-101 (H3) trong V_H khi được đánh số theo hệ thống đánh số Chothia; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); và/hoặc các gốc từ "vùng siêu biến"/CDR (ví dụ như, các gốc 27-38 (L1), 56-65 (L2) và 105-120 (L3) trong V_L , và 27-38 (H1), 56-65 (H2) và 105-120 (H3) trong V_H khi được đánh số theo hệ thống đánh số IMGT; Lefranc, M. P. *et al.* Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999), Ruiz, M. *et al.* Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000)). Một cách tùy ý kháng thể có sự cài xen đối xứng ở một hoặc nhiều của điểm sau đây 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) và 123 (L3) trong V_L , và 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) và 123 (H3) trong $V_{sub}H$ khi được đánh số theo AHO; Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001)).

"Gốc axit nucleic dòng mầm" có nghĩa là gốc axit nucleic mà có trong tự nhiên trong gen dòng mầm mã hóa cho vùng không đổi hoặc vùng biến đổi. "Gen dòng mầm" là ADN được tìm thấy trong tế bào mầm (tức là, tế bào được dành riêng để trở thành trứng hoặc trong tinh dịch). "Đột biến dòng mầm" dùng để chỉ sự thay đổi có thể di truyền được trong ADN cụ thể mà đã xảy ra trong tế bào mầm hoặc hợp tử ở giai đoạn đơn bào, và khi truyền cho con cháu, đột biến này được kết hợp trong mọi tế bào

của cơ thể. Đột biến dòng mầm trái ngược với đột biến sinh dưỡng mà thu được trong tế bào đơn lẻ của cơ thể. Trong một số trường hợp, các nucleotit trong trình tự ADN dòng mầm mã hóa cho vùng biến đổi bị đột biến (*tức là*, đột biến sinh dưỡng) và được thay thế bằng nucleotit khác.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản đồng nhất, *tức là*, các kháng thể riêng lẻ chứa trong quần thể giống nhau ngoại trừ các đột biến có thể có mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, được định hướng chống lại vị trí có tính kháng nguyên đơn lẻ. Hơn nữa, trái ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng mà bao gồm các kháng thể khác nhau được định hướng chống lại các thể quyết định (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại thể quyết định đơn lẻ trên kháng nguyên. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, kháng thể đơn dòng có lợi ở chỗ chúng có thể được tổng hợp không bị tạp nhiễm bởi kháng thể khác. Từ bỏ nghĩa "đơn dòng" không được hiểu là đòi hỏi phải sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ như, kháng thể đơn dòng hữu dụng trong sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp tế bào lai được mô tả lần đầu tiên bởi Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), hoặc có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp trong tế bào vi khuẩn, động vật hoặc thực vật nhân chuẩn (xem, *ví dụ như*, Bằng Sáng Chế Mỹ 4,816,567) sau khi tuyển chọn tế bào đơn lẻ của tế bào B đặc hiệu kháng nguyên, nguyên tương bào đặc hiệu kháng nguyên đáp ứng với sự nhiễm hoặc sự gây miễn dịch, hoặc sự bất giữ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã được liên kết từ tế bào đơn lẻ trong tập hợp đặc hiệu kháng nguyên đã được tuyển chọn khối lớn. "Kháng thể đơn dòng" cũng có thể được phân lập từ thư viện kháng thể phage bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong, ví dụ như Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) và Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

A. Phương Pháp Chung

Cần hiểu rằng kháng thể đơn dòng liên kết với SARS-CoV-2 có một vài ứng dụng. Chúng bao gồm việc sản xuất bộ kit chẩn đoán để sử dụng trong việc phát hiện và chẩn đoán sự nhiễm SARS-CoV-2, cũng như là để điều trị chúng. Trong các trường hợp này, người ta có thể liên kết kháng thể này với tác nhân chẩn đoán hoặc trị liệu, sử

dụng chúng làm tác nhân bắt giữ hoặc chất cạnh tranh trong thử nghiệm cạnh tranh, hoặc sử dụng chúng riêng lẻ mà không có tác nhân bổ sung được gắn vào nó. Kháng thể có thể bị đột biến hoặc được cải biến, như thảo luận thêm dưới đây. Phương pháp điều chế và xác định đặc điểm kháng thể được biết rõ trong lĩnh vực (xem, ví dụ như, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Bằng Sáng Chế Mỹ 4,196,265).

Phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng (MAb) thường bắt đầu theo cùng cách như phương pháp điều chế kháng thể đa dòng. Bước thứ nhất đối với cả hai phương pháp này là sự gây miễn dịch của vật chủ thích hợp hoặc nhận diện đối tượng miễn nhiễm do sự nhiễm tự nhiên từ trước hoặc sự chủng ngừa với vắc xin đã được cấp phép hoặc thí nghiệm. Như đã biết rõ trong lĩnh vực, hợp phần được cung cấp để gây miễn dịch có thể thay đổi ở khả năng gây miễn dịch của nó. Do đó thường cần phải tăng cường hệ thống miễn dịch vật chủ, như có thể đạt được bằng cách ghép nối chất gây miễn dịch peptit hoặc polypeptit với chất mang. Các chất mang ví dụ và được ưu tiên là hemocyanin ốc limpet (KLH) và albumin huyết thanh bò (BSA). Các albumin khác chẳng hạn như ovalbumin, albumin huyết thanh chuột hoặc albumin huyết thanh thỏ cũng có thể được sử dụng làm chất mang. Phương tiện để liên hợp polypeptit với protein chất mang được biết rõ trong lĩnh vực và bao gồm glutaraldehyt, m-maleimidobencoyl-N-hydroxysuccinimide este, carbodiimide và benzidin đã được bis-biazo hóa. Như cũng đã biết rõ trong lĩnh vực, khả năng gây miễn dịch của hợp phần chất miễn dịch cụ thể có thể được tăng cường bằng cách sử dụng chất kích thích không đặc hiệu của đáp ứng miễn dịch, đã được biết đến dưới dạng chất bổ trợ. Chất bổ trợ ví dụ và được ưu tiên ở động vật bao gồm chất bổ trợ Freund hoàn chỉnh (chất kích thích không đặc hiệu của đáp ứng miễn dịch chứa *Mycobacterium tuberculosis* đã bị giết chết), chất bổ trợ Freund không hoàn chỉnh và chất bổ trợ nhôm hydroxit và ở người bao gồm phèn, CpG, MFP59 và dạng kết hợp của các phân tử kích thích miễn dịch ("Hệ Thống Chất Bổ Trợ", chẳng hạn như AS01 hoặc AS03). Các dạng thí nghiệm bổ sung của sự gây nhiễm để gây cảm ứng tế bào B đặc hiệu SARS-CoV-2 là có thể có, bao gồm vắc xin hạt nano, hoặc kháng nguyên được mã hóa bởi gen được phân phối dưới dạng các gen ADN hoặc ARN trong hệ thống phân phối vật lý (chẳng hạn như hạt nano lipid hoặc trên hạt trần gen bằng vàng), và được phân phối bằng kim, súng bắn gen, thiết bị đục lỗ điện xuyên qua da. Gen kháng nguyên cũng có thể được mang như

được mã hóa bởi vector virus có khả năng hoặc không có khả năng sao chép chẳng hạn như đơn vị sao chép adenovirus, virus kết hợp adeno, poxvirus, herpesvirus, hoặc alphavirus, hoặc theo cách khác hạt giống virus.

Trong trường hợp của kháng thể người chống lại tác nhân gây bệnh tự nhiên, phương pháp thích hợp là xác định đối tượng mà đã bị phơi nhiễm với tác nhân gây bệnh, chẳng hạn như những người đã được chẩn đoán là đã nhiễm bệnh, hoặc những người đã được chủng ngừa để tạo ra sự miễn dịch bảo vệ chống lại tác nhân gây bệnh hoặc để thử nghiệm độ an toàn hoặc hiệu quả của vắc xin thí nghiệm. Kháng thể kháng tác nhân gây bệnh tuần hoàn có thể được phát hiện, và sau đó tế bào B mã hóa cho hoặc sản xuất kháng thể từ đối tượng dương tính với kháng thể có thể thu được.

Lượng của hợp phần gây miễn dịch được sử dụng để sản xuất kháng thể đa dòng thay đổi dựa trên bản chất của chất gây miễn dịch cũng như là động vật được sử dụng để gây miễn dịch. Nhiều con đường có thể được sử dụng để dùng chất gây miễn dịch (dưới da, trong cơ, trong da, trong tĩnh mạch và trong màng bụng). Việc sản xuất kháng thể đa dòng có thể được theo dõi bằng cách lấy mẫu máu của con vật đã được gây miễn dịch tại các thời điểm khác nhau sau khi gây miễn dịch. Lần tiêm tăng cường, thứ hai, cũng có thể được thực hiện. Quy trình tăng cường và chuẩn độ được lặp lại đến khi đạt được độ chuẩn thích hợp. Khi mức độ mong muốn của khả năng gây miễn dịch đạt được, con vật đã được gây miễn dịch có thể được lấy máu và tách huyết thanh và lưu trữ, và/hoặc con vật này có thể được sử dụng để tạo ra MAb.

Sau khi gây miễn dịch, tế bào sinh dưỡng có khả năng sản xuất kháng thể, đặc biệt là tế bào lympho B (tế bào B), được chọn lọc để sử dụng trong quy trình tạo ra MAb. Các tế bào này có thể được thu lấy từ đã được sinh thiết lách, hạch bạch huyết, amidan hoặc hạch hạnh nhân ở họng, dịch hút hoặc mẫu sinh thiết tủy xương, mẫu sinh thiết mô từ các cơ quan nhầy như phổi hoặc đường GI, hoặc từ máu tuần hoàn. Tế bào lympho B sản xuất kháng thể từ con vật đã được gây miễn dịch hoặc người miễn nhiễm sau đó được dung hợp với tế bào của tế bào u tủy bất tử, thường là một của cùng một loài như con vật mà đã được gây miễn dịch hoặc tế bào người hoặc khảm người/chuột. Các dòng tế bào u tủy thích hợp để sử dụng trong quy trình dung hợp sản xuất tế bào lai tốt hơn là không sản xuất kháng thể, có hiệu quả dung hợp cao, và thiếu hụt enzym mà sau đó làm cho không có khả năng sinh trưởng trong môi trường chọn lọc nhất định mà hỗ trợ sự sinh trưởng chỉ của tế bào dung hợp (tế bào lai) mong

muốn. Tế bào bất kỳ trong số nhiều tế bào u tủy có thể được sử dụng, như đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984). Tế bào HMMA2,5 hoặc tế bào MFP-2 là các ví dụ đặc biệt hữu dụng của tế bào này.

Phương pháp tạo ra thể lai của tế bào lách hoặc hạch bạch huyết sản xuất kháng thể và tế bào u tủy thường bao gồm bước trộn tế bào sinh dưỡng với tế bào u tủy ở tỉ lệ 2:1, dù tỉ lệ này có thể thay đổi từ khoảng 20:1 đến khoảng 1:1, lần lượt, trong sự có mặt của tác nhân hoặc các tác nhân (hóa học hoặc điện) mà thúc đẩy sự dung hợp của màng tế bào. Trong một số trường hợp, sự biến nạp của tế bào B người với virus Epstein Barr (EBV) như là bước đầu tiên làm tăng kích thước của tế bào B, tăng cường sự dung hợp với tế bào u tủy có kích thước tương đối lớn. Hiệu quả biến nạp bởi EBV được tăng cường bằng cách sử dụng CpG và thuốc ức chế Chk2 trong môi trường biến nạp. Theo cách khác, tế bào B người có thể được hoạt hóa bằng cách đồng nuôi cấy với dòng tế bào đã được chuyển nạp biểu hiện Phôi Tử CD40 (CD154) trong môi trường chứa các yếu tố hòa tan bổ sung, chẳng hạn như IL-21 và Yếu Tố Hoạt Hóa Tế Bào B Người (BAFF), thành viên Typ II của siêu họ TNF. Phương pháp dung hợp sử dụng virus Sendai đã được mô tả bởi Kohler và Milstein (1975; 1976), và các phương pháp sử dụng polyetylen glycol (PEG), chẳng hạn như 37% (thể tích/thể tích) PEG, bởi Gefter *et al.* (1977). Việc sử dụng phương pháp dung hợp được gây cảm ứng bằng điện cũng thích hợp (Goding, pp. 71-74, 1986) và có các quy trình cho hiệu quả tốt hơn (Yu *et al.*, 2008). Các quy trình dung hợp thường sản xuất thể lai có thể sống được ở tần số thấp, từ khoảng 1×10^{-6} đến 1×10^{-8} , nhưng với quy trình đã được tối ưu hóa người ta có thể đạt được hiệu quả dung hợp gần với 1 trong 200 (Yu *et al.*, 2008). Tuy nhiên, hiệu quả tương đối thấp của sự dung hợp không đặt ra vấn đề, vì thể lai đã dung hợp, có thể sống được được biệt hóa từ tế bào đã được truyền, bố mẹ (cụ thể là tế bào u tủy đã được truyền mà thường tiếp tục phân chia vô hạn) bằng cách nuôi cấy trong môi trường chọn lọc. Môi trường chọn lọc thường là môi trường mà chứa tác nhân mà phong bế sự tổng hợp *de novo* của các nucleotit trong môi trường nuôi cấy mô. Tác nhân ví dụ và được ưu tiên là aminopterin, methotrexat, và azaserin. Aminopterin và methotrexat phong bế sự tổng hợp *de novo* của cả purin và pyrimidin, trong khi đó azaserin chỉ phong bế sự tổng hợp purin. Khi aminopterin hoặc methotrexat được sử dụng, môi trường được bổ sung với hypoxanthin và tymidin làm nguồn nucleotit (môi

trường HAT). Khi azaserin được sử dụng, môi trường được bổ sung với hypoxanthin. Ouabain được bổ sung nếu nguồn tế bào B là dòng tế bào B người được biến nạp EBV, để triệt tiêu dòng được biến nạp EBV mà không dung hợp với u tủy.

Môi trường chọn lọc được ưu tiên là HAT hoặc HAT với ouabain. Chỉ tế bào có khả năng vận hành con đường tận dụng nucleotit có thể sống sót trong môi trường HAT. Tế bào u tủy thiếu các enzym quan trọng của con đường tận dụng này, *ví dụ như*, hypoxanthin phosphoribosyl transferaza (HPRT), và chúng không thể sống sót. Tế bào B có thể vận hành con đường này, nhưng chúng có tuổi thọ hạn chế trong nuôi cấy và thường chết trong vòng khoảng hai tuần. Do đó, chỉ tế bào mà có thể sống sót trong môi trường chọn lọc là thể lai được tạo thành từ tế bào u tủy và tế bào B. Khi nguồn tế bào B được sử dụng để dung hợp là dòng của tế bào B được biến nạp EBV, như ở đây, ouabain cũng có thể được sử dụng để chọn lọc thuốc của thể lai dưới dạng tế bào B được biến nạp EBV nhạy cảm với việc tiêu diệt bằng thuốc, trong khi đó đôi tác u tủy được sử dụng được chọn là kháng với ouabain.

Việc nuôi cấy tạo ra quần thể tế bào lai từ mà tế bào lai cụ thể được chọn lọc. Thông thường, việc chọn lọc tế bào lai được thực hiện bằng cách nuôi cấy tế bào bằng dịch pha loãng đơn lẻ trong đĩa vi chuẩn độ, sau đó là thử nghiệm các dịch nổi bề mặt dòng riêng lẻ (sau khoảng từ hai đến ba tuần) đối với khả năng phản ứng mong muốn. Thử nghiệm này cần phải nhạy, đơn giản và nhanh, chẳng hạn như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm miễn dịch enzym, thử nghiệm gây độc tế bào, thử nghiệm mảng thử nghiệm liên kết miễn dịch điểm, và dạng tương tự. Sau đó tế bào lai đã được chọn lọc được pha loãng theo dãy hoặc được tuyển chọn tế bào đơn lẻ bằng cách tuyển chọn đếm tế bào theo dòng và tách dòng vào dòng tế bào sản xuất kháng thể riêng lẻ, mà sau đó các dòng này có thể được nhân giống vô hạn để tạo ra mAb. Dòng tế bào có thể được khai thác để sản xuất MAb trong hai cách cơ bản. Mẫu của tế bào lai có thể được tiêm (thường là vào trong khoang màng bụng) vào động vật (*ví dụ như*, chuột nhắt). Một cách tùy ý, động vật được nuôi với hydrocacbon, đặc biệt là dầu chẳng hạn như pristane (tetramethylpentadecan) trước khi tiêm. Khi tế bào lai người được sử dụng theo cách này, tối ưu là tiêm chuột nhắt bị thỏa hiệp miễn dịch, chẳng hạn như chuột nhắt SCID, để ngăn chặn sự thải bỏ khỏi u. Con vật đã được tiêm phát triển khối u tiết ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu được sản xuất bằng thể lai tế bào đã dung hợp. Dịch cơ thể của động vật, chẳng hạn như huyết thanh hoặc dịch cổ trướng,

sau đó có thể được rút ra để tạo ra mAb ở nồng độ cao. Các dòng tế bào riêng lẻ cũng có thể được nuôi cấy *in vitro*, trong đó mAb được tiết tự nhiên vào môi trường nuôi cấy mà chúng có thể dễ dàng thu được từ đó ở nồng độ cao. Theo cách khác, dòng tế bào lai người có thể được sử dụng *in vitro* để sản xuất globulin miễn dịch trong dịch nổi bề mặt tế bào. Dòng tế bào có thể được làm cho thích ứng để sinh trưởng trong môi trường không có huyết thanh để tối ưu hóa khả năng để thu hồi globulin miễn dịch đơn dòng người có độ tinh khiết cao.

mAb được sản xuất bằng một trong hai phương thức này có thể được tinh chế thêm, nếu muốn, sử dụng phương pháp lọc, ly tâm và các phương pháp sắc ký khác nhau chẳng hạn như FPLC hoặc sắc ký ái lực. Các mảnh của kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được thu lấy từ kháng thể đơn dòng đã được tinh chế bằng phương pháp mà bao gồm sự phân cắt bằng enzym, chẳng hạn như pepsin hoặc papain, và/hoặc bằng cách phân cắt liên kết disulfua bằng sự khử hóa học. Theo cách khác, mảnh kháng thể đơn dòng được bao hàm bởi sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng bộ tổng hợp peptit tự động.

Cũng dự tính rằng phương pháp tách dòng phân tử có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng. Tế bào B đơn lẻ được xác định là đáp ứng với sự nhiễm hoặc sự chủng ngừa bởi vì nguyên tương bào hoặc chỉ thị tế bào B đã hoạt hóa, hoặc tế bào B ghi nhớ được gắn nhãn bằng kháng nguyên được quan tâm, có thể được tuyển chọn theo cách vật lý bằng cách sử dụng sự chọn lọc hạt thuận từ hoặc tuyển chọn đếm tế bào theo dòng, sau đó ARN có thể được phân lập từ tế bào đơn lẻ và các gen kháng thể được khuếch đại bằng RT-PCR. Các phương pháp RNA-seq tế bào đơn lẻ khác nhau có sẵn để thu được các gen biến đổi kháng thể từ tế bào đơn lẻ. Theo cách khác, các quần thể đã được tuyển chọn khối lớn đặc hiệu kháng nguyên của các tế bào có thể được phân vào các túi nhỏ và các gen biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương hợp được thu hồi từ tế bào đơn lẻ bằng cách sử dụng liên kết vật lý của các đơn vị khuếch đại chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, hoặc việc gắn mã vạch chung của các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ túi. Các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương hợp từ tế bào đơn lẻ cũng có thể được thu lấy từ các quần thể của tế bào B đặc hiệu kháng nguyên bằng cách xử lý tế bào bằng hạt nano thâm nhập tế bào mang đoạn mồi RT-PCR và mã vạch để tạo ra bản phiên mã với một mã vạch cho mỗi tế bào. Các gen biến đổi kháng thể cũng có thể được phân lập bằng dịch chiết ARN của dòng tế bào lai và các gen kháng thể thu được

bằng RT-PCR và tách dòng vào vector biểu hiện globulin miễn dịch. Theo cách khác, thư viện phagemid globulin miễn dịch tổ hợp được điều chế từ ARN được phân lập từ dòng tế bào và phagemid biểu hiện kháng thể thích hợp được chọn lọc bằng cách tuyển chọn sử dụng các kháng nguyên virus. Các ưu điểm của phương pháp này so với kỹ thuật tế bào lai thông thường là nhiều kháng thể hơn xấp xỉ 10^4 lần có thể được sản xuất và được sàng lọc trong một chu kỳ, và tính đặc hiệu mới được tạo ra bằng dạng kết hợp chuỗi H và L mà làm tăng thêm cơ hội tìm ra kháng thể thích hợp.

Các bằng sáng chế Mỹ khác, mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo, mà hướng dẫn việc sản xuất kháng thể hữu dụng trong sáng chế bao gồm Bằng Sáng Chế Mỹ 5,565,332, mà mô tả việc sản xuất kháng thể khám sử dụng phương pháp tổ hợp; Bằng Sáng Chế Mỹ 4,816,567 mà mô tả việc điều chế globulin miễn dịch tái tổ hợp; và Bằng Sáng Chế Mỹ 4,867,973 mà mô tả thể liên hợp kháng thể-tác nhân trị liệu.

B. Kháng Thể Theo Sáng Chế

Kháng thể theo sáng chế có thể được xác định, trong trường hợp thứ nhất, bằng độ đặc hiệu liên kết của chúng. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực, bằng cách đánh giá độ đặc hiệu/ái lực liên kết của kháng thể được đề xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực, có thể xác định liệu kháng thể này có nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ ở đây hay không. Ví dụ như, epitop mà kháng thể được đề xuất liên kết với có thể gồm có trình tự liên kế đơn lẻ của 3 hoặc hơn 3 (ví dụ như, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) axit amin nằm ở trong phân tử kháng nguyên (ví dụ như, epitop mạch thẳng trong miễn). Theo cách khác, epitop có thể gồm có nhiều axit amin (hoặc các trình tự axit amin) không liên kế nằm ở trong phân tử kháng nguyên (ví dụ như, epitop cấu hình).

Hai loại chính của kháng nguyên SARS-CoV-2 là protein gai (S) bề mặt và protein bên trong, đặc biệt là protein nucleocapsid (N). Kháng thể đối với protein S hữu dụng để phòng ngừa, hoặc trị liệu, hoặc chẩn đoán, hoặc để xác định đặc điểm vắc xin. Kháng thể protein S có độ đặc hiệu liên kết bổ sung với protein đó, với kháng thể cụ thể liên kết với miền ngoại bào chiều dài đầy đủ của protein S SARS-CoV-2 (được trình diện dưới dạng monome hoặc oligome chẳng hạn như timer; có hoặc không có

các đột biến làm ổn định hình dạng chẳng hạn như sự đưa vào của prolin ở các vị trí thiết yếu ("đột biến 2P")) và (a) kháng thể kháng protein S mà liên kết với miền liên kết thụ thể (RBD), (b) kháng thể kháng protein S mà liên kết với miền không phải là RBD. Một số tập hợp con mà liên kết với miền không phải là RBD liên kết với miền đầu tận cùng N (NTD), trong khi các miền khác liên kết với epitop không phải là NTD hoặc RBD), và (c) kháng thể protein S có thể còn được phát hiện là trung hòa SARS-CoV-2 bằng cách phong bế sự liên kết của protein S SARS-CoV-2 với thụ thể của nó, enzym chuyển hóa angiotensin người 2 (hACE2), với các kháng thể khác mà trung hòa nhưng không phong bế sự liên kết thụ thể. Cuối cùng, kháng thể có thể phản ứng chéo với cả protein S SARS-CoV-2 và protein S của các coronavirus khác chẳng hạn như SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 và/hoặc HCoV-HKU1, cũng như là trung hòa chéo cả SARS-CoV-2 và các coronavirus khác này.

Một tính đặc hiệu khác là kháng thể mà liên kết với kháng thể N (hoặc các đích bên trong khác) mà chủ yếu dùng để chẩn đoán. Ví dụ như, kháng thể đối với protein N hoặc protein bên trong khác của SARS-CoV-2 mà nhận diện đặc hiệu SARS-CoV-2 hoặc nhận diện theo cách phản ứng chéo SARS-CoV-2 và các coronavirus khác chẳng hạn như SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 và/hoặc HCoV-HKU1.

Các kỹ thuật khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng để xác định có hay không kháng thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" bên trong polypeptit hoặc protein. Các kỹ thuật ví dụ bao gồm, ví dụ, thử nghiệm phong bế chéo thông thường, như được mô tả trong *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Sự phong bế chéo có thể được đo trong các thử nghiệm liên kết khác nhau chẳng hạn như ELISA, phép đo cản trở lớp sinh học, hoặc cộng hưởng plasmon bề mặt. Các phương pháp khác bao gồm phân tích đột biến quét alanin, phân tích thẩm tách peptit (Reineke, *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63, 2004), phân tích phân cắt peptit, kỹ thuật soi kính hiển vi điện tử độ phân giải cao sử dụng sự tái cấu trúc hạt đơn lẻ, cryoEM, hoặc chụp cắt lớp, nghiên cứu tinh thể học và phân tích NMR. Ngoài ra, các phương pháp như phân cắt epitop, tách chiết epitop và sự cải biến hoá học của kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer *Prot. Sci.* 9: 487-496, 2000). Phương pháp khác mà có thể được sử dụng để xác định axit amin bên trong polypeptit mà kháng thể tương tác với là

trao đổi hydro/đoteri được phát hiện bằng phương pháp khối phổ. Theo thuật ngữ chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri bao gồm việc gắn nhãn đoteri cho protein quan tâm, sau đó liên kết kháng thể với protein được gắn nhãn đoteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước và các proton có khả năng trao đổi bên trong axit amin được bảo vệ bởi phức hợp kháng thể trải qua sự trao đổi ngược đoteri thành hydro ở tốc độ chậm hơn so với các proton trao đổi bên trong axit amin mà không phải là một phần của mặt phân cách. Kết quả là, axit amin mà tạo thành một phần của mặt phân cách protein/kháng thể có thể giữ đoteri và do đó thể hiện khối lượng cao hơn tương đối so với axit amin không được bao gồm trong mặt phân cách. Sau sự phân ly của kháng thể, protein đích được cho phân cắt proteaza và phân tích khối phổ, theo đó các gốc được gắn nhãn đoteri mà tương ứng với các axit amin cụ thể mà kháng thể tương tác. Xem, ví dụ như, Ehring, *Analytical Biochemistry* 267: 252-259 (1999); Engen and Smith, *Anal. Chem.* 73: 256A-265A (2001). Khi kháng thể trung hòa SARS-CoV-2, sinh vật biến thể đột biến trốn thoát kháng thể có thể được phân lập bằng cách nhân giống SARS-CoV-2 *in vitro* hoặc trong mô hình động vật trong sự có mặt của nồng độ cao của kháng thể. Phân tích trình tự của gen SARS-CoV-2 mã hóa cho kháng nguyên được nhắm đích bởi kháng thể khám phá ra (các) đột biến mang lại sự trốn thoát kháng thể, chỉ ra các gốc trong epitop hoặc ảnh hưởng đến cấu trúc của epitop về mặt dị lập thể.

Thuật ngữ "epitop" dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc T phản ứng với. Các epitop tế bào B có thể được tạo thành cả từ các axit amin liên kề hoặc các axit amin không liên kề được để gần nhau bởi sự gấp nếp bậc ba của protein. Các epitop được tạo thành từ các axit amin liên kề thường được giữ lại khi lộ ra với dung môi biến tính, trong khi các epitop được hình thành bằng các gấp nếp bậc ba thường bị mất đi khi xử lý bằng dung môi biến tính. Epitop thường bao gồm ít nhất 3, và thông thường hơn, ít nhất 5 hoặc 8-10 axit amin trong cấu hình không gian đơn nhất.

Định Hình Hỗ Trợ Bởi Sự Cải Biến (Modification-Assisted Profiling - MAP), còn được biết đến dưới dạng Định Hình Kháng Thể dựa trên Cấu Trúc Kháng Nguyên (Antigen Structure-based Antibody Profiling - ASAP) là phương pháp phân loại số lượng lớn kháng thể đơn dòng (mAb) được định hướng chống lại cùng kháng nguyên theo độ tương tự của biên dạng liên kết của mỗi kháng thể với kháng nguyên bề mặt

được cải biến bằng hóa chất hoặc enzym (xem Công Bố Bằng Sáng Chế Mỹ 2004/0101920, được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó). Mỗi phân nhóm có thể phản ánh một epitop duy nhất hoặc khác nhau phân biệt được với hoặc gộp một phần lên epitop được thể hiện bởi phân nhóm khác. Công nghệ này cho phép lọc nhanh các kháng thể giống nhau về mặt di truyền, sao cho việc xác định đặc điểm có thể được tập trung vào các kháng thể khác nhau về mặt di truyền. Khi áp dụng cho sàng lọc tế bào lai, MAP có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc nhận dạng các dòng tế bào lai hiếm sản xuất các mAb có các đặc tính mong muốn. MAP có thể được sử dụng để sắp xếp các kháng thể theo sáng chế vào các nhóm kháng thể liên kết với các epitop khác nhau.

Sáng chế bao gồm các kháng thể mà có thể liên kết với cùng một epitop, hoặc một phần của epitop. Tương tự như vậy, sáng chế cũng bao gồm kháng thể cạnh tranh để liên kết với đích hoặc mảnh của chúng với kháng thể ví dụ cụ thể bất kỳ được mô tả trong đây. Người ta có thể dễ dàng xác định việc có hay không có kháng thể liên kết với cùng epitop như, hoặc cạnh tranh để liên kết với, kháng thể tham chiếu bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, để xác định liệu có kháng thể thử nghiệm liên kết với cùng epitop như đối tượng tham chiếu theo sáng chế hay không, kháng thể tham chiếu được để cho liên kết với đích trong điều kiện bão hoà. Tiếp theo, khả năng của kháng thể thử nghiệm để liên kết với phân tử đích được đánh giá. Nếu kháng thể có khả năng liên kết với phân tử đích sau khi liên kết bão hoà với kháng thể tham chiếu, có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với epitop khác với kháng thể tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết với phân tử đích sau khi liên kết bão hoà với kháng thể tham chiếu, thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng epitop như epitop được liên kết bởi kháng thể tham chiếu.

Để xác định liệu có kháng thể cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng SARS-CoV-2 tham chiếu hay không, phương pháp liên kết được mô tả ở trên được tiến hành theo hai hướng: Hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được để cho liên kết với kháng nguyên SARS-CoV-2 trong điều kiện bão hoà tiếp theo là sự đánh giá liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử SARS-CoV-2. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được để cho liên kết với kháng nguyên SARS-CoV-2 trong điều kiện bão hoà tiếp theo là sự đánh giá liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử SARS-

CoV-2. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ kháng thể (bảo hòa) thứ nhất có khả năng liên kết với SARS-CoV-2, thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh để liên kết với SARS-CoV-2. Như hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, kháng thể cạnh tranh để liên kết với kháng thể tham chiếu có thể không cần phải liên kết với cùng epitop như kháng thể tham chiếu nhưng có thể phong bế về mặt không gian sự liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách liên kết epitop gồi hoặc liên kề.

Hai kháng thể liên kết với cùng epitop hoặc gồi nếu mỗi kháng thể này ức chế cạnh tranh (phong bế) sự liên kết của kháng thể khác với kháng nguyên. Tức là vượt quá 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể ức chế sự liên kết của kháng thể khác bằng ít nhất là 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí là 99% như được đo bằng phân tích liên kết cạnh tranh (xem, *ví dụ như*, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Ngoài ra, hai kháng thể có cùng epitop nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc làm suy yếu sự liên kết của một kháng thể cũng làm giảm hoặc làm suy yếu sự liên kết của kháng thể khác. Hai kháng thể có các epitop gồi lên nhau nếu một số đột biến axit amin mà làm giảm hoặc làm suy yếu sự liên kết của một kháng thể cũng làm giảm hoặc làm suy yếu sự liên kết của kháng thể khác. Theo một số khía cạnh kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà liên kết với cùng một epitop hoặc các epitop gồi lên nhau như COV2-2196 được sử dụng kết hợp với kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà liên kết với cùng một epitop hoặc các epitop gồi lên nhau như COV2-2130.

Sau đó thử nghiệm thông thường khác (*ví dụ*, đột biến peptit và phân tích liên kết) có thể được tiến hành để khẳng định có hay không sự thiếu hụt được quan sát thấy của liên kết của kháng thể thử nghiệm thực sự là do sự liên kết với cùng epitop như kháng thể tham chiếu hoặc liệu sự phong bế không gian (hoặc hiện tượng khác) có chịu trách nhiệm cho sự thiếu liên kết được quan sát thấy này hay không. Các thí nghiệm về sự phân loại này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng ELISA, RIA, cộng hưởng plasmon bề mặt, đếm tế bào theo dòng chảy hoặc thử nghiệm liên kết kháng thể định tính hoặc định lượng khác bất kỳ sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật. Nghiên cứu cấu trúc với EM hoặc tinh thể học cũng có thể chứng minh có hay không có hai kháng thể mà cạnh tranh để liên kết nhận diện cùng một epitop.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng có các CDR được bắt cặp dòng từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như minh họa lần lượt trong các Bảng 3 và 4. Kháng thể này có thể được sản xuất bằng các dòng được thảo luận dưới đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế sử dụng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, kháng thể có thể được xác định bằng trình tự thay đổi của chúng, mà bao gồm các vùng "khung" khác. Ngoài ra, các trình tự kháng thể có thể thay đổi từ các trình tự này, một cách tùy ý bằng cách sử dụng phương pháp được thảo luận chi tiết hơn dưới đây. Ví dụ như, các trình tự axit nucleic có thể thay đổi từ các trình tự axit nucleic nêu trên trong đó (a) vùng biến đổi có thể được tách ra khỏi miền không đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, (b) axit nucleic có thể thay đổi từ axit nucleic nêu trên trong khi không ảnh hưởng đến các gốc được mã hóa bởi nó, (c) axit nucleic có thể thay đổi từ axit nucleic nêu trên với tỉ lệ phần trăm nhất định, *ví dụ như*, độ tương đồng 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%, (d) axit nucleic có thể thay đổi từ axit nucleic nêu trên nhờ khả năng lai hóa trong điều kiện có độ nghiêm ngặt cao, ví dụ như điều kiện độ mặn thấp và/hoặc nhiệt độ cao, chẳng hạn như được cung cấp bằng từ khoảng 0,02 M đến khoảng 0,15 M NaCl ở nhiệt độ từ khoảng 50°C đến khoảng 70°C, (e) axit amin có thể thay đổi từ axit amin nêu trên với tỉ lệ phần trăm nhất định, *ví dụ như*, độ tương đồng 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%, hoặc (f) axit amin có thể thay đổi từ axit amin nêu trên bằng cách cho phép các đột biến thể bảo toàn (được thảo luận dưới đây). Mỗi điều trên đây áp dụng cho các trình tự axit nucleic và các trình tự axit amin.

Khi so sánh các trình tự polynucleotit và polypeptit, hai trình tự được nói là "tương đồng" nếu trình tự của các nucleotit hoặc axit amin trong hai trình tự là giống nhau khi được sắp xếp thẳng hàng để có sự tương ứng tối đa, như mô tả dưới đây. So sánh giữa hai trình tự thường được thực hiện bằng cách so sánh các trình tự trên cửa sổ so sánh để xác định và so sánh các vùng cục bộ của sự tương tự trình tự. "Cửa sổ so sánh" như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ đoạn có ít nhất là khoảng 20 vị trí liền kề, thường là từ 30 đến khoảng 75, từ 40 đến khoảng 50, trong đó trình tự có thể được so sánh với trình tự tham chiếu có cùng số lượng của vị trí liền kề sau khi hai trình tự được sắp xếp thẳng hàng tối ưu.

Sự sắp xếp thẳng hàng tối ưu của các trình tự để so sánh có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Megalign trong gói Lasergene của phần mềm thông tin sinh học (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), sử dụng các thông số mặc định. Chương trình này bao gồm một vài sơ đồ sắp xếp thẳng hàng được mô tả trong các tài liệu tham khảo sau đây: Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins--Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogeny pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy--the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, Calif.; Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730.

Theo cách khác, sự sắp xếp thẳng hàng tối ưu của các trình tự để so sánh có thể được thực hiện bằng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith and Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482, bằng thuật toán sắp xếp thẳng hàng tương đồng của Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, bằng cách tra cứu phương pháp độ tương tự của Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, bằng cách thực hiện vi tính hóa của các thuật toán này (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, và TFASTA trong Gói Phần Mềm Di Truyền Học Wisconsin (Wisconsin Genetics Software Package), Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis.), hoặc bằng cách quan sát bằng mắt.

Một ví dụ cụ thể về thuật toán mà thích hợp để xác định tỉ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự và độ tương tự trình tự là các thuật toán BLAST và BLAST 2,0, mà lần lượt được mô tả trong Altschul *et al.* (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 và Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. BLAST và BLAST 2,0 có thể được sử dụng, ví dụ như, với các thông số được mô tả trong bản mô tả này, để xác định phần trăm độ tương đồng trình tự đối với các polynucleotit và các polypeptit theo sáng chế. Phần mềm để thực hiện phân tích BLAST có sẵn công khai thông qua Trung Tâm Quốc Gia Về Thông Tin Công Nghệ Sinh Học. Bản chất đã được tái sắp xếp của trình

tự kháng thể và chiều dài thay đổi của mỗi gen đòi hỏi nhiều chu kỳ tra cứu BLAST đối với trình tự kháng thể đơn lẻ. Ngoài ra, sự lắp ráp thủ công của các gen khác nhau là khó và có khuynh hướng tạo lỗi. Công cụ phân tích trình tự IgBLAST (world-wide-web ở ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) xác định sự ăn khớp với các gen V, D và J dòng mầm, chi tiết ở khớp nối tái sắp xếp, hình phác họa của vùng khung miền V Ig và vùng xác định tính bổ sung. IgBLAST có thể phân tích các trình tự nucleotit hoặc protein và có thể xử lý các trình tự trong mẽ và cho phép tra cứu đối với cơ sở dữ liệu gen dòng mầm và các cơ sở dữ liệu trình tự khác một cách đồng thời để làm giảm thiểu cơ hội bỏ lỡ có thể có gen V dòng mầm ăn khớp nhất.

Trong một ví dụ minh họa, điểm tích lũy có thể được tính bằng cách sử dụng, đối với trình tự nucleotit, các tham số M (điểm thưởng đối với cặp gốc ăn khớp; luôn > 0) và N (điểm phạt đối với các gốc bất cặp nhầm; luôn < 0). Việc mở rộng các tương hợp từ theo mỗi hướng tạm dừng lại khi: điểm sắp xếp thẳng hàng trình tự tích lũy giảm tới lượng X kể từ giá trị đạt được tối đa của nó; điểm tích lũy tiến tới không hoặc thấp hơn, do tích lũy một hoặc nhiều phép sắp xếp thẳng hàng trình tự nhóm có điểm âm; hoặc đạt đến điểm cuối của trình tự nào đó. Các thông số W, T và X của thuật toán BLAST xác định độ nhảy và tốc độ của phép sắp xếp thẳng hàng trình tự. Chương trình BLASTN (đối với các trình tự nucleotit) sử dụng làm mặc định chiều dài từ (W) bằng 11, và kỳ vọng (E) là 10, và sự sắp xếp thẳng hàng ma trận điểm BLOSUM62 (xem Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), (B) bằng 50, kỳ vọng (E) bằng 10, $M=5$, $N=-4$ và sự so sánh của cả hai sợi.

Đối với trình tự axit amin, ma trận điểm có thể được sử dụng để tính điểm tích lũy. Việc mở rộng các tương hợp từ theo mỗi hướng tạm dừng lại khi: điểm sắp xếp thẳng hàng trình tự tích lũy giảm tới lượng X kể từ giá trị đạt được tối đa của nó; điểm tích lũy tiến tới không hoặc thấp hơn, do tích lũy một hoặc nhiều phép sắp xếp thẳng hàng trình tự nhóm có điểm âm; hoặc đạt đến điểm cuối của trình tự nào đó. Các thông số W, T và X của thuật toán BLAST xác định độ nhảy và tốc độ của phép sắp xếp thẳng hàng trình tự.

Trong một phương pháp, "tỉ lệ phần trăm của độ tương đồng trình tự" được xác định bằng cách so sánh hai trình tự được sắp xếp thẳng hàng tối ưu trên cửa sổ so sánh có ít nhất là 20 vị trí, trong đó một phần của trình tự polynucleotit hoặc polypeptit trong cửa sổ so sánh có thể có chứa đột biến thêm hoặc đột biến mất (*tức là*, chỗ cách

quãng) bằng 20 phần trăm hoặc nhỏ hơn, thường là từ 5 đến 15 phần trăm, hoặc từ 10 đến 12 phần trăm, khi so với các trình tự tham chiếu (mà không chứa đột biến thêm hoặc đột biến mất) đối với sự sắp xếp thẳng hàng tối ưu của hai trình tự. Tỷ lệ phần trăm được tính bằng cách xác định số lượng vị trí mà ở đó gốc bazơ axit nucleic hoặc axit amin giống hệt có mặt ở cả hai trình tự để thu được số lượng vị trí bất cập, chia số lượng vị trí bất cập cho tổng số lượng vị trí trong trình tự tham chiếu (*tức là*, kích thước cửa sổ) và nhân kết quả với 100 để thu được tỷ lệ phần trăm của độ tương đồng trình tự.

Cách khác nữa để xác định kháng thể là dưới dạng "dẫn xuất" của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả dưới đây và mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Thuật ngữ "dẫn xuất" dùng để chỉ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên nhưng mà có chứa, một, hai, ba, bốn, năm hoặc hơn năm đột biến thể, đột biến thêm, đột biến mất hoặc sự cải biến axit amin tương quan với phân tử "bố mẹ" (hoặc kiểu đại). Các đột biến thể hoặc đột biến thêm axit amin này có thể đưa vào các gốc axit amin có trong tự nhiên (*tức là*, được mã hóa bằng ADN) hoặc không có trong tự nhiên. Thuật ngữ "dẫn xuất" bao hàm, ví dụ như, dưới dạng biến thể có các vùng CH1, bản lề, CH2, CH3 hoặc CH4 đã được thay đổi, nhờ đó tạo thành, ví dụ như, kháng thể, v.v., có vùng Fc biến thể mà thể hiện đặc điểm tác động hoặc liên kết được tăng cường hoặc làm suy yếu. Thuật ngữ "dẫn xuất" còn bao hàm sự cải biến không ở axit amin, ví dụ như, axit amin mà có thể được glycosyl hóa (*ví dụ như*, có hàm lượng manozơ, 2-N-acetylglucosamin, galactozơ, fucosơ, glucozơ, axit sialic, axit 5-N-acetylneuraminic, axit 5-glycolneuraminic, v.v. đã được thay đổi), được axetyl hóa, được pegyl hóa, được phosphoryl hóa, được amit hóa, được tạo dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/phong bế đã biết, sự phân cắt thủy phân protein, được liên kết với phối tử tế bào hoặc protein khác, v.v.. Theo một số phương án, sự cải biến carbohydrat đã được thay đổi điều biến một hoặc nhiều của đặc điểm sau đây: sự hòa tan của kháng thể, sự làm thuận lợi của sự vận chuyển dưới tế bào và sự tiết của kháng thể, sự thúc đẩy của sự lắp ráp kháng thể, tính toàn vẹn hình dạng, và chức năng tác động qua trung gian kháng thể. Theo phương án cụ thể, sự cải biến carbohydrat đã được thay đổi tăng cường chức năng tác động qua trung gian kháng thể tương quan với kháng thể thiếu sự cải biến carbohydrat. Sự cải biến carbohydrat mà dẫn đến chức năng tác động qua trung gian kháng thể đã

được thay đổi được biết rõ trong lĩnh vực (ví dụ như, xem Shields, R. L. *et al.* (2002) "*Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcγ₃ RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity*," J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740; Davies J. *et al.* (2001) "*Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For FCγ₃ RIII*," Biotechnology & Bioengineering 74(4): 288-294). Phương pháp làm thay đổi hàm lượng carbohydrat đã được biết đến đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực, xem, ví dụ như, Wallick, S. C. *et al.* (1988) "*Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha (1----6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen*," J. Exp. Med. 168(3): 1099-1109; Tao, M. H. *et al.* (1989) "*Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role of Carbohydrate in The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region*," J. Immunol. 143(8): 2595-2601; Routledge, E. G. *et al.* (1995) "*The Effect of Aglycosylation on The Immunogenicity of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody*," Transplantation 60(8):847-53; Elliott, S. *et al.* (2003) "*Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering*," Nature Biotechnol. 21:414-21; Shields, R. L. *et al.* (2002) "*Lack of Fucose on Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fcγ₃ RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity*," J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740).

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể dẫn xuất có thể được tạo ra với trình tự được thiết kế hoặc tình trạng glycosyl hóa để mang lại mức hoạt tính được ưu tiên trong các chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), thực bào bạch cầu trung tính phụ thuộc kháng thể (ADNP), hoặc lắng đọng bổ thể phụ thuộc kháng thể (ADCD) như đo được bằng các thử nghiệm dựa trên hạt hoặc dựa trên tế bào hoặc các nghiên cứu *in vivo* trong mô hình động vật.

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể dẫn xuất có thể được cải biến bằng sự cải biến hóa học sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự phân cắt hóa học đặc hiệu, sự axetyl hóa, sự tạo chế phẩm, sự tổng hợp chuyển hóa của tunicamycin, v.v.. Theo một phương án, dẫn xuất kháng thể có chức năng tương tự hoặc giống hệt như kháng thể bố mẹ. Theo phương án khác, dẫn xuất kháng thể thể hiện hoạt tính đã được thay đổi tương quan

với kháng thể bố mẹ. Ví dụ như, kháng thể dẫn xuất (hoặc mảnh của chúng) có thể liên kết với epitop của nó chặt hơn hoặc kháng hơn đối với sự thủy phân protein so với kháng thể bố mẹ.

C. Thiết Kế Trình Tự Kháng Thể

Theo các phương án khác nhau, người ta có thể chọn thiết kế các trình tự của kháng thể được nhận diện vì nhiều lý do, chẳng hạn như sự biểu hiện được cải thiện, khả năng phản ứng chéo được cải thiện hoặc sự liên kết lệch đích bị giảm đi. Kháng thể được cải biến có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực, bao gồm sự biểu hiện thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, hoặc sự tổng hợp hóa học của các polypeptit. Phương pháp biểu hiện tái tổ hợp được đề cập ở chỗ khác trong tài liệu này. Sau đây là thảo luận chung về các kỹ thuật mục tiêu liên quan để thiết kế kháng thể.

Tế bào lai có thể được nuôi cấy, sau đó tế bào được dung giải, và ARN tổng số được chiết. Các hexame ngẫu nhiên có thể được sử dụng với RT để tạo ra bản sao cADN của ARN, và sau đó PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hỗn hợp đa thành phần của các đoạn mồi PCR được mong đợi là khuếch đại tất cả các trình tự gen biến đổi của người. Sản phẩm PCR có thể được tách dòng vào vector pGEM-T Easy, sau đó được xác định trình tự bằng cách xác định trình tự ADN tự động sử dụng các đoạn mồi vector tiêu chuẩn. Thử nghiệm về sự liên kết và sự trung hòa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể được thu thập từ dịch nổi bề mặt tế bào lai và được tinh chế bằng FPLC, sử dụng cột Protein G.

Kháng thể IgG chiều dài đầy đủ tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng cách tách dòng phụ ADN Fv chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ vector tách dòng vào vector plasmit IgG, đã được chuyển nạp vào tế bào 293 (ví dụ như, Freestyle) hoặc tế bào CHO, và kháng thể có thể được thu thập và được tinh chế từ dịch nổi bề mặt tế bào 293 hoặc CHO. Các hệ thống tế bào vật chủ thích hợp khác bao gồm vi khuẩn, chẳng hạn như *E. coli*, tế bào côn trùng (S2, Sf9, Sf29, High Five), tế bào thực vật (ví dụ như, thuốc lá, có hoặc không có sự thiết kế đối với glycan giống người), tảo, hoặc trong nhiều trường hợp chuyển gen không phải là người, chẳng hạn như chuột nhắt, chuột cống, dê hoặc bò.

Sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa cho kháng thể, đều cho mục đích tinh chế kháng thể tiếp đó, và để gây miễn dịch vật chủ, cũng được dự kiến. Các trình tự mã hóa cho kháng thể có thể là ARN, chẳng hạn như ARN tự nhiên hoặc ARN được cải biến. ARN được cải biến bao gồm sự cải biến hóa học nhất định mà mang lại độ ổn định tăng và khả năng gây miễn dịch thấp cho mARN, bởi nó làm thuận lợi cho sự biểu hiện của protein quan trọng về mặt trị liệu. Ví dụ như, N1-metyl-uridin giả (N1m Ψ) làm tốt hơn một vài sự cải biến nucleosit khác và dạng kết hợp của chúng về khả năng dịch mã. Ngoài việc ngắt sự ức chế phụ thuộc miễn dịch/eIF2 α phosphoryl hóa của sự dịch mã, các nucleotit N1m Ψ kết hợp làm thay đổi từ từ động học của quy trình dịch mã bằng cách làm tăng sự dừng và mật độ ribosom trên mARN. Tải lượng ribosom tăng của mARN được cải biến làm cho chúng dễ chấp nhận hơn để bắt đầu bằng cách thiên về sự tuần hoàn ribosom trên cùng một mARN hoặc sự tuyển chọn ribosom de novo. Sự cải biến này được sử dụng để tăng cường kháng thể sự biểu hiện *in vivo* sau khi gây nhiễm với ARN. ARN, dù là tự nhiên hay được cải biến, có thể được phân phối dưới dạng ARN trần hoặc trong phương tiện phân phối, chẳng hạn như hạt nano lipid.

Theo cách khác, ADN mã hóa cho kháng thể có thể được sử dụng cho cùng mục đích. ADN được bao gồm trong cát xét biểu hiện có chứa vùng khởi động hoạt động trong tế bào chủ mà nó được thiết kế cho. Cát xét biểu hiện được bao gồm một cách có lợi trong vector có thể sao chép, chẳng hạn như plasmit hoặc minivector thông thường. Vector bao gồm vector virus, chẳng hạn như poxvirus, adenovirus, herpesvirus, virus kết hợp adeno, và lentivirus được dự tính. Đơn vị sao chép mã hóa cho các gen kháng thể chẳng hạn như đơn vị sao chép alphavirus dựa trên virus VEE hoặc virus Sindbis cũng được dự tính. Việc phân phối của vector này có thể được thực hiện bằng kim thông qua các đường trong cơ, dưới da, hoặc trong da, hoặc bằng cách đục lỗ điện xuyên qua da khi sự biểu hiện *in vivo* được mong muốn.

Độ khả dụng nhanh của kháng thể được sản xuất trong cùng tế bào chủ và quy trình nuôi cấy tế bào dưới dạng quy trình sản xuất cGMP cuối cùng có tiềm năng để làm giảm khoảng thời gian của chương trình phát triển quy trình. Lonza đã phát triển phương pháp di truyền sử dụng các thể chuyển nạp đã được thu gom sinh trưởng trong môi trường CDACF, để sản xuất nhanh lượng nhỏ (lên đến 50 g) của kháng thể trong tế bào CHO. Mặc dù chậm hơn một chút so với hệ thống tạm thời thực sự, các ưu điểm

bao gồm nồng độ sản phẩm cao hơn và sử dụng cùng vật chủ và quy trình như dòng tế bào sản xuất. Ví dụ về sự sinh trưởng và năng suất của các tập hợp GS-CHO, biểu hiện kháng thể mô hình, trong bình phản ứng sinh học dùng một lần: trong môi trường nuôi cấy bình phản ứng sinh học dạng túi dùng một lần (thể tích hoạt động 5 l) vận hành ở chế độ cấp theo mẻ, nồng độ kháng thể thu hoạch là 2 g/l đạt được trong vòng 9 tuần từ khi chuyển nạp.

Phân tử kháng thể có chứa các mảnh (chẳng hạn như $F(ab')$, $F(ab')_2$) mà được sản xuất, ví dụ như, bằng sự phân cắt thủy phân protein của mAb, hoặc globulin miễn dịch đơn chuỗi có thể sản xuất, ví dụ như, thông qua phương thức tái tổ hợp. Dẫn xuất kháng thể $F(ab')$ là hóa trị một, trong khi dẫn xuất kháng thể $F(ab')_2$ là hóa trị hai. Theo một phương án, các mảnh này có thể được kết hợp với nhau, hoặc với mảnh kháng thể hoặc phối tử thụ thể khác để tạo thành phân tử liên kết "khảm". Đáng chú ý là, phân tử khảm này có thể chứa các phân tử thể có khả năng liên kết với các epitop khác nhau của cùng một phân tử.

Trong các phương án liên quan, kháng thể là dẫn xuất của kháng thể được bộc lộ, ví dụ như, kháng thể có chứa các trình tự CDR giống với các trình tự CDR trong kháng thể được bộc lộ (ví dụ như, kháng thể khảm, hoặc được ghép CDR). Theo cách khác, người ta có thể mong muốn tạo ra sự cải biến, chẳng hạn như đưa sự thay đổi bảo toàn vào trong phân tử kháng thể. Trong việc tạo ra các thay đổi này, chỉ số kỵ nước của axit amin có thể được xem xét. Tầm quan trọng của chỉ số kỵ nước axit amin trong việc mang lại chức năng sinh học tương tác trên protein nhìn chung được hiểu trong lĩnh vực (Kyte và Doolittle, 1982). Chấp nhận rằng đặc điểm kỵ nước tương đối của axit amin góp phần vào cấu trúc bậc hai của protein thu được, mà đến lượt nó xác định sự tương tác của protein với các phân tử khác, ví dụ, enzym, chất nền, thụ thể, ADN, kháng thể, kháng nguyên, và dạng tương tự.

Cũng cần hiểu trong lĩnh vực này rằng sự thể của các axit amin tương tự có thể được tạo ra một cách hiệu quả trên cơ sở độ ưa nước. Bảng Sáng Chế Mỹ 4,554,101, được kết hợp ở đây để tham khảo, chỉ ra rằng độ ưa nước trung bình cục bộ lớn nhất của protein, như được điều tiết bởi độ ưa nước của axit amin liền kề của nó, tương quan với đặc điểm sinh học của protein. Như nêu chi tiết trong Bảng Sáng Chế Mỹ 4,554,101, các giá trị độ ưa nước sau đây được gán cho các gốc axit amin: axit amin có

tính bazơ: arginin (+3,0), lysin (+3,0), và histidin (-0,5); axit amin có tính axit: aspartat (+3,0 $\pm$ 1), glutamat (+3,0 $\pm$ 1), asparagin (+0,2), và glutamin (+0,2); axit amin không ion, ưa nước: serin (+0,3), asparagin (+0,2), glutamin (+0,2), và threonin (-0,4), axit amin chứa lưu huỳnh: cystein (-1,0) và methionin (-1,3); axit amin không thơm, kỵ nước: valin (-1,5), loxin (-1,8), isoloxin (-1,8), prolin (-0,5 $\pm$ 1), alanin (-0,5), và glyxin (0); axit amin thơm, kỵ nước: tryptophan (-3,4), phenylalanin (-2,5), và tyrosin (-2,3).

Cần hiểu rằng axit amin có thể được thế cho axit amin khác có độ ưa nước tương tự và sản xuất protein được cải biến về mặt sinh học hoặc về mặt miễn dịch học. Trong các thay đổi này, đột biến thế của axit amin mà giá trị độ ưa nước của nó ở trong ± 2 được ưu tiên, đột biến thế của axit amin mà giá trị độ ưa nước của nó ở trong ± 1 được đặc biệt ưu tiên, và đột biến thế của axit amin mà giá trị độ ưa nước của nó ở trong $\pm 0,5$ được ưu tiên hơn nữa.

Do đó, như phác họa ở trên, các đột biến thế axit amin thường dựa trên độ tương tự tương đối của phần tử thế chuỗi bên axit amin, ví dụ, tính kỵ nước, độ ưa nước, độ tích điện, kích thước của chúng, và dạng tương tự. Các đột biến thế ví dụ mà cần xem xét các đặc điểm trên đây khác nhau được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực và bao gồm: arginin và lysin; glutamat và aspartat; serin và threonin; glutamin và asparagin; và valin, loxin và isoloxin.

Sáng chế cũng bao hàm sự cải biến isotíp. Bằng cách cải biến vùng Fc để có isotíp khác, các chức năng khác nhau có thể đạt được. Ví dụ như, việc thay đổi thành IgG₁ có thể làm tăng khả năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, việc chuyển đổi thành lớp A có thể cải thiện sự phân bố mô, và việc chuyển đổi thành lớp M có thể cải thiện hóa trị.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, có thể hữu dụng là kết hợp sự cải biến axit amin với một hoặc nhiều sự cải biến axit amin khác mà làm thay đổi sự liên kết C1q và/hoặc chức năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) của vùng Fc của phân tử liên kết IL-23p19. Sự liên kết polypeptit được đặc biệt quan tâm có thể là sự liên kết với C1q và thể hiện sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể. Các polypeptit có hoạt tính liên kết C1q tồn tại từ trước, tùy ý có thêm khả năng làm trung gian cho CDC có thể được cải biến sao cho một hoặc cả hai hoạt tính này được tăng cường. Sự cải biến axit amin mà làm

thay đổi C1q và/hoặc cải biến chức năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể của nó được mô tả, ví dụ như, trong WO/0042072, mà được kết hợp ở đây để tham khảo.

Người ta có thể thiết kế vùng Fc của kháng thể có chức năng tác động đã được thay đổi, *ví dụ như*, bằng cách cải biến sự liên kết C1q và/hoặc sự liên kết Fc γ R và nhờ đó làm thay đổi hoạt tính CDC và/hoặc hoạt tính ADCC. "Chức năng tác động" chịu trách nhiệm hoạt hóa hoặc làm giảm bớt hoạt tính sinh học (*ví dụ như*, ở đối tượng). Các ví dụ về chức năng tác động bao gồm, nhưng không giới hạn ở: sự liên kết C1q; sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); sự liên kết thụ thể Fc; sự gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); sự thực bào; sự điều hòa giảm của thụ thể bề mặt tế bào (*ví dụ như*, thụ thể tế bào B; BCR), v.v.. Chức năng tác động này có thể đòi hỏi vùng Fc được kết hợp với miền liên kết (*ví dụ như*, miền biến đổi kháng thể) và có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm khác nhau (*ví dụ như*, thử nghiệm liên kết Fc, thử nghiệm ADCC, thử nghiệm CDC, v.v.).

Ví dụ như, người ta có thể tạo ra biến thể vùng Fc của kháng thể có sự liên kết C1q được cải thiện và sự liên kết Fc γ RIII được cải thiện (*ví dụ như*, có cả hoạt tính ADCC được cải thiện và hoạt tính CDC được cải thiện). Theo cách khác, nếu mong muốn chức năng tác động được làm giảm hoặc được loại bỏ, biến thể vùng Fc có thể được thiết kế có hoạt tính CDC giảm và/hoặc hoạt tính ADCC giảm. Theo các phương án khác, chỉ một trong số các hoạt tính này có thể được tăng lên, và, một cách tùy ý, ngoài ra hoạt tính khác giảm đi (*ví dụ như*, để tạo ra biến thể vùng Fc có hoạt tính ADCC được cải thiện, nhưng hoạt tính CDC giảm và *ngược lại*).

Sự liên kết FcRn. Các đột biến Fc cũng có thể được đưa vào và được thiết kế để làm thay đổi sự tương tác của chúng với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) và cải thiện tính chất dược động học của chúng. Bộ sưu tập của biến thể Fc người có liên kết được cải thiện với FcRn đã được mô tả (Shields *et al.*, (2001)). Việc lập bản đồ có độ phân giải cao của vị trí liên kết trên IgG1 người đối với Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, và FcRn và thiết kế của biến thể IgG1 có liên kết được cải thiện với Fc γ R, (J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Nhiều phương pháp đã được biết đến mà có thể dẫn đến thời gian bán thải tăng lên (Kuo and Aveson, (2011)), bao gồm sự cải biến axit amin có thể được tạo ra thông qua các kỹ thuật bao gồm sự gây đột biến quét alanin, sự gây đột biến ngẫu nhiên và sàng lọc để đánh giá liên kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) và/hoặc thuộc tính *in vivo*.

Các chiến lược tính toán sau đó là sự gây đột biến cũng có thể được sử dụng để chọn một trong số các đột biến axit amin để gây đột biến.

Do đó sáng chế đề xuất biến thể của protein liên kết kháng nguyên có sự liên kết với FcRn được tối ưu hóa. Theo phương án cụ thể, biến thể này của protein liên kết kháng nguyên có chứa ít nhất là một sự cải biến axit amin trong vùng Fc của protein liên kết kháng nguyên, trong đó sự cải biến này được chọn lọc từ nhóm gồm có 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 và 447 của vùng Fc khi so với polypeptit bố mẹ, trong đó việc đánh số của axit amin trong vùng Fc là cách đây số chỉ số EU trong Kabat. Theo khía cạnh khác của sáng chế sự cải biến là M252Y/S254T/T256E.

Ngoài ra, các tài liệu công bố khác nhau mô tả phương pháp thu lấy phân tử có hoạt tính sinh lý mà thời gian bán thải của nó được cải biến, xem ví dụ như Kontermann (2009) bằng cách đưa polypeptit liên kết FcRn vào trong phân tử hoặc bằng cách dung hợp phân tử này với kháng thể mà ái lực liên kết FcRn của nó được bảo toàn nhưng ái lực đối với các thụ thể Fc khác đã được làm giảm nhiều hoặc dung hợp với miền liên kết FcRn của kháng thể.

Kháng thể được tạo dẫn xuất có thể được sử dụng để làm thay đổi thời gian bán thải (ví dụ như, thời gian bán thải trong huyết thanh) của kháng thể bố mẹ trong động vật có vú, cụ thể là người. Các thay đổi này có thể dẫn đến thời gian bán thải lớn hơn 15 ngày, tốt hơn là lớn hơn 20 ngày, lớn hơn 25 ngày, lớn hơn 30 ngày, lớn hơn 35 ngày, lớn hơn 40 ngày, lớn hơn 45 ngày, lớn hơn 2 tháng, lớn hơn 3 tháng, lớn hơn 4 tháng, hoặc lớn hơn 5 tháng. Thời gian bán thải tăng của kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng trong động vật có vú, tốt hơn là người, dẫn đến độ chuẩn huyết thanh cao hơn của kháng thể hoặc mảnh kháng thể ở động vật có vú, và do đó làm giảm tần suất dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể và/hoặc làm giảm nồng độ của kháng thể hoặc mảnh kháng thể được dùng. Kháng thể hoặc các mảnh của chúng có

thời gian bán thải *in vivo* tăng có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ như, kháng thể hoặc các mảnh của chúng có thời gian bán thải *in vivo* tăng có thể được tạo ra bằng cách cải biến (ví dụ như, thế, làm khuyết hoặc thêm) các gốc axit amin được xác định là tham gia vào sự tương tác giữa miền Fc và thụ thể FcRn.

Beltramello và cộng sự (2010) trước đây đã báo cáo sự cải biến của mAb trung hòa, do khuynh hướng của chúng để tăng cường sự nhiễm virus dengue, bằng cách tạo ra trong đó các gốc loxin ở các vị trí 1,3 và 1,2 của miền CH2 (theo cách đánh số độ nhất IMGT đối với miền C) được thế bằng các gốc alanin. Sự cải biến này, còn gọi là đột biến "LALA", triệt tiêu sự liên kết kháng thể với FcγRI, FcγRII và FcγRIIIa, như mô tả bởi Hessel et al. (2007). Biến thể và mAb tái tổ hợp không được cải biến được so sánh về khả năng của chúng để trung hòa và tăng cường sự nhiễm bởi bốn typ huyết thanh virus dengue. Biến thể LALA giữ lại cùng một hoạt tính trung hòa như mAb không được cải biến nhưng hoàn toàn không có hoạt tính tăng cường. Do đó các đột biến LALA có bản chất này được dự tính trong ngữ cảnh của kháng thể được bộc lộ ở đây.

Sự Glycosyl Hóa Được Thay Đổi. Phương án cụ thể của sáng chế là kháng thể đơn dòng đã được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, chứa glycan về cơ bản đồng nhất mà không có axit sialic, galactosa, hoặc fucosa. Kháng thể đơn dòng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, cả hai vùng này có thể được gắn lần lượt vào các vùng không đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Glycan về cơ bản đồng nhất nêu trên có thể được gắn cộng hóa trị vào vùng không đổi chuỗi nặng.

Phương án khác của sáng chế có chứa mAb với kiểu glycosyl hóa Fc mới. Kháng thể đơn dòng đã được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, có mặt trong hợp phần về cơ bản đồng nhất được thể hiện bằng GNGN hoặc G1/G2 glycoform. Sự glycosyl hóa Fc đóng vai trò đáng kể trong tính chất kháng virus và kháng ung thư của mAb trị liệu. Sáng chế này đi đôi với nghiên cứu gần đây mà thể hiện sự ức chế virus qua trung gian tế bào kháng lentivirus tăng của mAb kháng HIV không chứa fucosa *in vitro*. Phương án này của sáng chế với glycan đồng nhất thiếu fucosa lõi, thể hiện sự bảo vệ tăng chống lại các virus cụ thể bằng hệ số lớn hơn hai lần. Sự loại trừ của fucosa lõi cải thiện từ từ hoạt tính ADCC của mAb qua trung gian

tế bào giết tự nhiên (NK) nhưng dường như có tác dụng trái ngược trên hoạt tính ADCC của tế bào nhân đa hình (PMN).

Kháng thể đơn dòng đã được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa hợp phần về cơ bản đồng nhất được thể hiện bằng GNGN hoặc G1/G2 glycoform thể hiện ái lực liên kết tăng đối với Fc gamma RI và Fc gamma RIII được so sánh với cùng một kháng thể mà không có GNGN glycoform về cơ bản đồng nhất và với các glycoform chứa G0, G1F, G2F, GNF, GNGNF hoặc GNGNFX. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể phân ly từ Fc gamma RI với Kd bằng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn và từ Fc gamma RIII với Kd bằng 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn.

Sự glycosyl hóa của vùng Fc thường được liên kết N hoặc được liên kết O. Được liên kết N dùng để chỉ sự gắn của gốc carbohydrat vào chuỗi bên của gốc asparagin. Sự glycosyl hóa liên kết với O dùng để chỉ sự gắn của một của đường N-acetylgalactosamin, galactosa, hoặc xyloza vào axit hydroxyamin, phổ biến nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể được sử dụng. Các trình tự nhận diện để gắn enzym của gốc carbohydrat vào các trình tự peptit chuỗi bên asparagin là asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ không phải là prolin. Do đó, sự có mặt của một trong các trình tự peptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng.

Kiểu glycosyl hóa có thể được thay đổi, ví dụ như, bằng cách làm khuyết một hoặc nhiều (các) vị trí glycosyl hóa được tìm thấy trong polypeptit, và/hoặc thêm một hoặc nhiều (các) vị trí glycosyl hóa mà không có mặt trong polypeptit. Việc bổ sung vị trí glycosyl hóa vào vùng Fc của kháng thể có thể được thực hiện một cách thuận lợi bằng cách làm thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit được mô tả ở trên (đối với vị trí glycosyl hóa được liên kết N). Biến thể glycosyl hóa ví dụ có đột biến thể axit amin của gốc Asn 297 của chuỗi nặng. Sự thay đổi cũng có thể được tạo ra bằng cách bổ sung, hoặc sự thế bằng, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự của polypeptit ban đầu (đối với vị trí glycosyl hóa được liên kết O). Ngoài ra, sự thay đổi của Asn 297 thành Ala có thể loại bỏ một trong các vị trí glycosyl hóa.

Theo phương án nhất định, kháng thể được biểu hiện trong tế bào mà biểu hiện beta (1,4)-N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnT III), sao cho GnT III bổ sung

GlcNAc vào kháng thể IL-23p19. Phương pháp sản xuất kháng thể theo kiểu này được nêu trong WO/9954342, WO/03011878, công bố sáng chế 20030003097A1, và Umana *et al.*, Nature Biotechnology, 17:176-180, February 1999. Dòng tế bào có thể được thay đổi để tăng cường hoặc làm giảm hoặc triệt tiêu sự cải biến sau dịch mã nhất định, chẳng hạn như sự glycosyl hóa, sử dụng công nghệ biên tập hệ gen chẳng hạn như Đoạn Lặp Xuôi Ngược Ngắn Phân Cách Điều Dạng Cụm (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat - CRISPR). Ví dụ như, công nghệ CRISPR có thể được sử dụng để triệt tiêu các gen mã hóa cho enzym glycosyl hóa trong tế bào 293 hoặc CHO được sử dụng để biểu hiện kháng thể đơn dòng tái tổ hợp.

Loại trừ trở ngại trình tự protein kháng thể đơn dòng. Có thể thiết kế trình tự gen biến đổi kháng thể thu được từ tế bào B người để tăng cường khả năng sản xuất và độ an toàn của chúng. Trở ngại trình tự protein tiềm năng có thể được nhận diện bằng cách tìm kiếm mô típ trình tự kết hợp với các vị trí chứa:

- 1) Gốc Cys không bắt cặp,
- 2) Sự glycosyl hóa được liên kết N,
- 3) Sự khử amit hóa Asn,
- 4) Sự isome hóa Asp,
- 5) Sự cắt cụt SYE,
- 6) Sự oxy hóa Met,
- 7) Sự oxy hóa Trp,
- 8) Glutamat đầu tận cùng N,
- 9) Sự liên kết integrin,
- 10) Sự liên kết CD11c/CD18, hoặc
- 11) Sự phân mảnh

Các mô típ này có thể bị triệt tiêu bằng cách thay đổi gen tổng hợp đối với cADN mã hóa cho kháng thể tái tổ hợp.

Nỗ lực thiết kế protein trong lĩnh vực phát triển kháng thể trị liệu khám phá ra rõ ràng rằng các trình tự hoặc các gốc nhất định có liên quan đến sự khác biệt về độ hòa tan (Fernandez-Escamilla *et al.*, Nature Biotech., 22 (10), 1302-1306, 2004;

Chennamsetty *et al.*, *PNAS*, 106 (29), 11937-11942, 2009; Voynov *et al.*, *Biocon. Chem.*, 21 (2), 385-392, 2010) Rõ ràng từ các đột biến làm thay đổi độ hòa tan trong tài liệu chỉ ra rằng một số gốc ưa nước chẳng hạn như axit aspartic, axit glutamic, và serin góp phần đáng kể thuận lợi hơn vào độ hòa tan protein hơn là các gốc ưa nước, chẳng hạn như asparagin, glutamin, threonin, lysin, và arginin.

Độ ổn định. Kháng thể có thể được thiết kế để có tính chất lý sinh được tăng cường. Người ta có thể sử dụng nhiệt độ tăng để mở cuộn kháng thể để xác định độ ổn định tương đối, sử dụng nhiệt độ nóng chảy biểu kiến trung bình. Phép Đo Nhiệt Lượng Quét Vi Sai (Differential Scanning Calorimetry - DSC) đo nhiệt dung, C_p , của phân tử (nhiệt cần để làm ấm nó, cho mỗi độ) dưới dạng hàm số của nhiệt độ. Người ta có thể sử dụng DSC để nghiên cứu độ ổn định nhiệt của kháng thể. Dữ liệu DSC đối với mAb đặc biệt thú vị vì nó đôi khi phân giải sự mở cuộn của miền riêng lẻ ở trong cấu trúc mAb, tạo ra lên đến ba đỉnh trong biểu đồ nhiệt (từ sự mở cuộn của các miền Fab, C_H2 , và C_H3). Thông thường sự mở cuộn của miền Fab tạo ra đỉnh mạnh nhất. Biên dạng DSC và độ ổn định tương đối của phần Fc thể hiện sự khác biệt đặc trưng đối với các phân lớp IgG₁, IgG₂, IgG₃, và IgG₄ người (Garber and Demarest, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 751-757, 2007). Người ta cũng có thể xác định nhiệt độ nóng chảy biểu kiến trung bình bằng cách sử dụng tính lưỡng hướng sắc tròn (CD), được thực hiện với quang phổ kế CD. Phổ CD UV xa được đo đối với kháng thể trong khoảng giá trị từ 200 đến 260 nm ở lượng gia tăng bằng 0,5 nm. Phổ cuối cùng có thể được xác định dưới dạng giá trị trung bình của 20 lần tích lũy. Các giá trị độ dẹt gốc có thể được tính sau khi trừ giá trị nền. Sự mở cuộn bằng nhiệt của kháng thể (0,1 mg/ml) có thể được theo dõi ở 235 nm từ 25-95 °C và tốc độ gia nhiệt là 1 °C/phút. Người ta có thể sử dụng tán sắc ánh sáng động lực (dynamic light scattering - DLS) để đánh giá xu hướng kết tụ. DLS được sử dụng để xác định đặc điểm kích thước của các hạt khác nhau bao gồm protein. Nếu hệ thống này không phân tán về kích thước, đường kính hiệu quả trung bình của hạt có thể được xác định. Phép đo này phụ thuộc vào kích thước của lõi hạt, kích thước của cấu trúc bề mặt, và nồng độ hạt. Vì DLS về cơ bản đo sự dao động của cường độ ánh sáng bị tán sắc do hạt, hệ số khuếch tán của hạt có thể được xác định. Phần mềm DLS trong thiết bị DLA thương mại thể hiện quần thể hạt ở các đường kính khác nhau. Nghiên cứu về độ ổn định có thể được thực hiện một cách thuận tiện bằng cách sử dụng DLS. Các số đo DLS của mẫu có thể thể hiện liệu

hạt có kết tụ theo thời gian hoặc với sự thay đổi nhiệt độ hay không bằng cách xác định liệu bán kính thủy lực của hạt có tăng lên hay không. Nếu hạt kết tụ, người ta có thể nhìn thấy quần thể lớn hơn của hạt có bán kính lớn hơn. Độ ổn định phụ thuộc vào nhiệt độ có thể được phân tích bằng cách kiểm soát nhiệt độ *in situ*. Các kỹ thuật điện di mao dẫn (capillary electrophoresis - CE) bao gồm phương pháp đã được chứng minh để xác định các dấu hiệu của độ ổn định kháng thể. Người ta có thể sử dụng phương pháp iCE để phân giải biến thể điện tích protein kháng thể do sự khử amit hóa, lysin đầu tận cùng C, sự sialyl hóa, sự oxy hóa, sự glycosyl hóa, và bất kỳ sự thay đổi nào khác đối với protein mà có thể dẫn đến sự thay đổi của pI của protein. Mỗi protein kháng thể đã được biểu hiện có thể được đánh giá bằng tập trung đẳng điện dung dịch tự do, thông lượng cao (IEF) trong cột mao dẫn (cIEF), sử dụng Protein Simple Maurice. Sự phát hiện độ hấp thụ UV toàn bộ cột có thể được thực hiện 30 giây một lần để theo dõi thời gian thực phân tử tập trung ở điểm đẳng điện (pI). Phương pháp này kết hợp độ phân giải cao của gel truyền thống IEF với ưu điểm về sự định lượng và sự tự động được phát hiện ở sự tách dựa trên cột trong khi loại bỏ nhu cầu đối với bước huy động. Kỹ thuật này tạo ra phân tích định lượng, có thể lặp lại về các biên dạng độ tương đồng, độ tinh khiết, và độ không đồng nhất đối với kháng thể đã được biểu hiện. Kết quả xác định độ không đồng nhất điện tích và định cỡ phân tử trên kháng thể, với cả hai chế độ phát hiện độ hấp thụ và độ phát huỳnh quang tự nhiên và với độ nhạy của sự phát hiện hạ xuống 0,7 µg/ml.

Độ hòa tan. Người ta có thể xác định điểm độ hòa tan nội tại của các trình tự kháng thể. Điểm độ hòa tan nội tại có thể được tính bằng cách sử dụng CamSol Intrinsic (Sormanni *et al.*, *J Mol Biol* 427, 478-490, 2015). Các trình tự axit amin đối với các gốc 95-102 (cách đánh số Kabat) trong HCDR3 của mỗi mảnh kháng thể chẳng hạn như scFv có thể được đánh giá thông qua chương trình trực tuyến để tính điểm độ hòa tan. Người ta cũng có thể xác định độ hòa tan bằng cách sử dụng các kỹ thuật phòng thí nghiệm. Các kỹ thuật khác nhau tồn tại, bao gồm bổ sung protein đã được làm khô lạnh vào dung dịch đến khi dung dịch trở nên bão hòa và đạt đến giới hạn độ hòa tan, hoặc cô bằng cách siêu lọc trong thiết bị cô rất nhỏ với ngưỡng ngắt khối lượng phân tử thích hợp. Phương pháp đơn giản nhất là gây ra sự kết tủa vô định hình, mà đo độ hòa tan protein bằng cách sử dụng phương pháp gồm sự kết tủa protein sử dụng amoni sulfat (Trevino *et al.*, *J Mol Biol*, 366: 449-460, 2007). Sự kết tủa

amoni sulfat mang lại thông tin nhanh và chính xác về các giá trị độ hòa tan tương đối. Sự kết tủa amoni sulfat tạo ra dung dịch đã được kết tủa với các pha nước và rắn đã được định rõ và cân lượng tương đối nhỏ của protein. Các phép đo độ hòa tan được thực hiện bằng cách sử dụng gây ra sự kết tủa vô định hình bằng amoni sulfat cũng có thể được thực hiện dễ dàng ở các giá trị độ pH khác nhau. Độ hòa tan protein phụ thuộc nhiều vào độ pH, và độ pH được coi là yếu tố bên ngoài quan trọng nhất mà ảnh hưởng đến độ hòa tan.

Khả năng tự phản ứng. Thông thường, người ta cho rằng các dòng tự phản ứng cần bị triệt tiêu trong quá trình phát sinh cá thể bằng sự chọn lọc âm tính, tuy nhiên điều này trở nên rõ ràng rằng nhiều kháng thể có trong tự nhiên ở người có tính chất tự phản ứng vẫn còn ở kho trưởng thành ở người trưởng thành, và khả năng tự phản ứng có thể tăng cường chức năng kháng virus của nhiều kháng thể đối với tác nhân gây bệnh. Đã chứng minh được rằng các vòng HCDR3 trong kháng thể trong quá trình phát triển tế bào B sớm thường giàu điện tích dương và thể hiện kiểu tự phản ứng (Wardemann *et al.*, *Science* 301, 1374-1377, 2003). Người ta có thể thử nghiệm kháng thể được đề xuất về khả năng tự phản ứng bằng cách đánh giá mức độ liên kết với tế bào có nguồn gốc từ người trong kính hiển vi (bằng cách sử dụng tế bào biểu mô HeLa hoặc HEp-2 dính) và nhuộm màu bề mặt tế bào đếm tế bào theo dòng (bằng cách huyền phù tế bào T Jurkat và tế bào thận phôi người 293S). Khả năng tự phản ứng cũng có thể được khảo sát bằng cách sử dụng sự đánh giá về sự liên kết với mô trong các mảng mô.

Các gốc được ưu Tiên ("Mức Độ Giống Người"). Xác định trình tự sâu kho tế bào B của tế bào B người từ người cho máu được thực hiện trên quy mô rộng trong nhiều nghiên cứu gần đây. Thông tin trình tự về phần đáng kể của kho kháng thể người làm thuận lợi cho sự đánh giá thống kê của các dấu hiệu trình tự kháng thể chung ở người khỏe mạnh. Với hiểu biết về các dấu hiệu trình tự kháng thể trong cơ sở dữ liệu tham chiếu gen biến đổi kháng thể tái tổ hợp người, mức độ đặc hiệu vị trí của "mức độ giống người" (HL) của trình tự kháng thể có thể được ước tính. HL đã được chứng minh là hữu dụng để phát triển kháng thể trong ứng dụng lâm sàng, như kháng thể trị liệu hoặc kháng thể làm vắc xin. Mục đích là để làm tăng mức độ giống người của kháng thể để làm giảm tác dụng có hại có thể có và đáp ứng miễn dịch kháng kháng thể mà sẽ dẫn đến hiệu quả giảm đi đáng kể của thuốc kháng thể hoặc có thể gây ra

biến chứng sức khỏe nghiêm trọng. Người ta có thể đánh giá đặc điểm kháng thể của kho kháng thể kết hợp của ba người cho máu khỏe mạnh có tổng cộng khoảng 400 triệu trình tự và tạo ra điểm "mức độ giống người tương đối" mới (rHL) mà tập trung trên vùng siêu biến của kháng thể. Điểm rHL cho phép người ta dễ dàng phân biệt giữa các trình tự của người (điểm dương) và không phải của người (điểm âm). Kháng thể có thể được thiết kế để triệt tiêu các gốc mà không phổ biến ở kho của người.

D. Kháng Thể Đơn Chuỗi

Mảnh biến đổi đơn chuỗi (scFv) là sự dung hợp của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, được liên kết với nhau bằng cầu nối ngắn (thường serin, glyxin). Phân tử khảm này giữ lại độ đặc hiệu của globulin miễn dịch ban đầu, dù loại bỏ các vùng không đổi và đưa vào cầu nối peptit. Sự cải biến này thường để lại độ đặc hiệu không thay đổi. Các phân tử này được tạo ra trong lịch sử để làm thuận lợi cho sự hiển thị phagơ trong đó nó rất thuận tiện để biểu hiện miễn liên kết kháng nguyên dưới dạng peptit đơn lẻ. Theo cách khác, scFv có thể được tạo ra trực tiếp từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã được tách dòng phụ có nguồn gốc từ tế bào lai hoặc tế bào B. Các mảnh biến đổi đơn chuỗi thiếu vùng Fc không đổi được phát hiện trong phân tử kháng thể hoàn chỉnh, và do đó, các vị trí liên kết thông thường (ví dụ như, protein A/G) được sử dụng để tinh chế kháng thể. Các mảnh này có thể thường được tinh chế/được giữ cố định bằng cách sử dụng Protein L vì Protein L tương tác với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kappa.

Cầu nối linh hoạt thường gồm có các gốc axit amin thúc đẩy xoắn và quay chẳng hạn như alanin, serin và glyxin. Tuy nhiên, các gốc khác có thể cũng hoạt động. Tang và cộng sự (1996) được sử dụng sự hiển thị phagơ làm phương thức chọn lọc nhanh các cầu nối đã được điều chỉnh đối với kháng thể đơn chuỗi (scFv) từ thư viện cầu nối protein. Thư viện cầu nối ngẫu nhiên được xây dựng trong đó các gen đối với các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết bằng đoạn mã hóa cho polypeptit có 18-axit amin của hợp phần biến đổi. Kho scFv (xấp xỉ 5×10^6 thành phần khác nhau) được hiển thị trên phagơ dạng sợi và được đưa đi chọn lọc ái lực bằng hapten. Quần thể của biến thể được chọn lọc thể hiện sự tăng lên đáng kể của hoạt tính liên kết nhưng giữ lại độ đa dạng trình tự đáng chú ý. Việc sàng lọc 1054 biến thể

riêng lẻ sau đó thu được scFv có hoạt tính xúc tác mà được sản xuất một cách hiệu quả ở dạng hòa tan. Phân tích trình tự phát hiện ra prolin được bảo toàn trong hai gốc cầu nối sau đầu tận cùng C của V_H và độ nhiều của arginin và prolin ở vị trí khác như là dấu hiệu chung duy nhất của đoạn buộc được chọn lọc.

Kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế cũng có thể gồm các trình tự hoặc gốc mà cho phép sự dime hóa hoặc sự multimer hóa của thụ thể. Các trình tự này bao gồm các trình tự có nguồn gốc từ IgA, mà cho phép tạo thành multimer kết hợp với chuỗi J. Miền multimer hóa khác là miền dime hóa Gal4. Theo các phương án khác, các chuỗi có thể được cải biến bằng tác nhân chẳng hạn như biotin/avidin, mà cho phép kết hợp hai kháng thể.

Theo phương án riêng rẽ, kháng thể đơn chuỗi có thể được tạo ra bằng cách kết hợp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thụ thể bằng cách sử dụng cầu nối không phải là peptit hoặc đơn vị hóa học. Thông thường, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được sản xuất trong tế bào khác biệt, được tinh chế, và tiếp đó được liên kết với nhau theo kiểu phù hợp (*tức là*, đầu tận cùng N của chuỗi nặng được gắn vào đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ thông qua cầu hóa học phù hợp).

Chất phản ứng liên kết chéo được sử dụng để tạo thành cầu phân tử mà buộc các nhóm chức của hai phân tử khác nhau, *ví dụ như*, tác nhân làm ổn định và đông tụ. Tuy nhiên, dự tính rằng dime hoặc multimer của cùng một chất tương tự hoặc phức hợp dạng heteromer gồm có các chất tương tự khác nhau có thể được tạo ra. Để liên kết hai hợp chất khác nhau theo phương thức từng bước, cầu nối chéo hai chức dị loại có thể được sử dụng mà loại trừ sự tạo thành homopolyme không mong muốn.

Cầu nối chéo hai chức năng dị loại ví dụ chứa hai nhóm phản ứng: một nhóm phản ứng với nhóm amin bậc một (*ví dụ như*, N-hydroxy succinimide) và nhóm kia phản ứng với nhóm thiol (*ví dụ như*, pyridyl disulfide, maleimide, halogen, v.v.). Thông qua nhóm phản ứng amin bậc một, cầu nối chéo có thể phản ứng với (các) gốc lysin của một protein (*ví dụ như*, kháng thể hoặc mảnh đã được chọn lọc) và thông qua nhóm phản ứng thiol, cầu nối chéo, đã được buộc vào protein thứ nhất, phản ứng với gốc cysteine (nhóm sulfhydryl tự do) của protein khác (*ví dụ như*, tác nhân chọn lọc).

Ưu tiên là cầu nối chéo có độ ổn định hợp lý trong máu được sử dụng. Nhiều loại của cầu nối chứa liên kết disulfide đã được biết đến mà có thể được sử dụng thành

công để liên hợp tác nhân nhắm đích và trị liệu/phòng ngừa. Cầu nối mà chứa liên kết disulfua mà bị cản trở không gian có thể chứng tỏ tạo ra độ ổn định *in vivo* lớn hơn, ngăn ngừa sự giải phóng của peptit nhắm đích trước khi đến được vị trí tác động. Do đó các cầu nối này là một nhóm của các tác nhân liên kết.

Chất phản ứng liên kết chéo khác là SMPT, mà là cầu nối chéo hai chức năng chứa liên kết disulfua mà "bị cản trở không gian" bởi vòng benzen liền kề và các nhóm methyl. Người ta tin rằng sự cản trở không gian của liên kết disulfua đóng vai trò làm chức năng bảo vệ liên kết khỏi bị tấn công bởi anion thiolat chẳng hạn như glutathion mà có thể có mặt trong mô và máu, và bởi nó giúp ngăn ngừa việc khử ghép nối của thể liên hợp trước khi phân phối tác nhân đã được gắn đến vị trí đích.

Chất phản ứng liên kết chéo SMPT, như với nhiều chất phản ứng liên kết chéo đã biết khác, mượn khả năng để liên kết chéo các nhóm chức chẳng hạn như SH của cystein hoặc amin bậc một (ví dụ như, nhóm amino epsilon của lysin). Loại có thể có khác của cầu nối chéo bao gồm phenylazit phản ứng ánh sáng hai chức năng dị loại chứa liên kết disulfua có thể phân cắt chẳng hạn như sulfosuccinimidyl-2-(p-azido salicylamido) etyl-1,3'-dithiopropionat. Nhóm N-hydroxy-succinimidyl phản ứng với các nhóm amino bậc một và phenylazit (khi quang phân) phản ứng không chọn lọc với gốc axit amin bất kỳ.

Ngoài cầu nối chéo bị cản trở, cầu nối không bị cản trở cũng có thể được sử dụng theo sáng chế. Các cầu nối chéo hữu dụng khác, không được coi là chứa hoặc tạo ra disulfua đã được bảo vệ, bao gồm SATA, SPDP và 2-iminothiolan (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). Việc sử dụng cầu nối chéo này được hiểu rõ trong lĩnh vực. Phương án khác gồm việc sử dụng cầu nối linh hoạt.

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,680,338, mô tả cầu nối hai chức năng hữu dụng để sản xuất thể liên hợp của phối tử với polyme và/hoặc protein chứa amin, đặc biệt là để tạo thành thể liên hợp kháng thể với chất chelat hóa, thuốc, enzym, nhãn có thể phát hiện được và dạng tương tự. Các Bằng Sáng Chế Mỹ 5,141,648 và 5,563,250 bộc lộ thể liên hợp có thể phân cắt được chứa liên kết không bền mà có thể phân cắt được trong nhiều điều kiện dịu nhẹ. Cầu nối này đặc biệt hữu dụng trong đó tác nhân được quan tâm có thể được liên kết trực tiếp với cầu nối, với sự phân cắt dẫn đến sự giải phóng của tác

nhân hoạt tính. Việc sử dụng cụ thể bao gồm bổ sung nhóm amino tự do hoặc sulfhydryl tự do vào protein, chẳng hạn như kháng thể, hoặc thuốc.

Bằng Sáng Chế Mỹ 5,856,456 đề xuất cầu nối peptit để sử dụng trong việc kết nối các thành phần cấu tạo polypeptit để tạo ra protein dung hợp, *ví dụ như*, kháng thể đơn chuỗi. Cầu nối có chiều dài lên đến khoảng 50 axit amin, chứa ít nhất là một lần xuất hiện của axit amin tích điện (tốt hơn là arginin hoặc lysin) sau đó là prolin, và đặc trưng bởi độ ổn định lớn hơn và sự kết tụ giảm đi. Bằng Sáng Chế Mỹ 5,880,270 bộc lộ cầu nối chứa aminooxy hữu dụng trong nhiều kỹ thuật chẩn đoán miễn dịch và tách.

E. Kháng Thể Đa Đặc Hiệu

Theo phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế là đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. Kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể mà có tính đặc hiệu liên kết đối với ít nhất là hai epitop khác nhau. Kháng thể đặc hiệu kép *ví dụ* có thể liên kết với hai epitop khác nhau của kháng nguyên đơn lẻ. Kháng thể khác này có thể kết hợp vị trí liên kết kháng nguyên thứ nhất với vị trí liên kết đối với kháng nguyên thứ hai. Theo cách khác, nhánh kháng tác nhân gây bệnh có thể được kết hợp với nhánh mà liên kết với phân tử kích hoạt trên tế bào bạch cầu, chẳng hạn như phân tử thụ thể tế bào T (*ví dụ như*, CD3), hoặc thụ thể Fc đối với IgG (FcγR), chẳng hạn như FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) và Fc gamma RIII (CD16), nhờ đó tập trung và khu biệt cơ chế bảo vệ tế bào đến tế bào bị lây nhiễm. Kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để khu biệt tác nhân gây độc tế bào đến tế bào bị lây nhiễm. Các kháng thể này có nhánh liên kết tác nhân gây bệnh và nhánh mà liên kết tác nhân gây độc tế bào (*ví dụ như*, saporin, kháng interferon-α, vinca alkaloid, chuỗi A ricin, methotrexat hoặc hapten đồng vị có hoạt tính phóng xạ). Kháng thể đặc hiệu kép có thể được điều chế dưới dạng kháng thể hoặc mảnh kháng thể chiều dài đầy đủ (*ví dụ như*, kháng thể đặc hiệu kép F(ab')₂). WO 96/16673 mô tả kháng thể kháng ErbB2/kháng Fc gamma RIII đặc hiệu kép và Bằng Sáng Chế Mỹ 5,837,234 bộc lộ kháng thể kháng ErbB2/kháng Fc gamma RI đặc hiệu kép. Kháng thể kháng ErbB2/Fc alpha đặc hiệu kép được thể hiện trong WO98/02463. Bằng Sáng Chế Mỹ 5,821,337 đề cập đến kháng thể kháng ErbB2/kháng CD3 đặc hiệu kép.

Phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu kép đã được biết đến trong lĩnh vực. Sự sản xuất theo truyền thống của kháng thể đặc hiệu kép chiều dài đầy đủ dựa trên sự

biểu hiện đồng thời của hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, mà tại đó hai chuỗi có tính đặc hiệu khác nhau (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)). Bởi vì sắp xếp ngẫu nhiên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, các thể lai này (quadroma) tạo ra hỗn hợp tiềm năng của mười phân tử kháng thể khác nhau, mà trong đó chỉ có một hỗn hợp có cấu trúc đặc hiệu kép chính xác. Việc tinh chế phân tử chính xác, thường được thực hiện theo các bước sắc ký ái lực, thì khá phức tạp, và hiệu suất sản phẩm thấp. Các quy trình tương tự được bộc lộ trong tài liệu WO 93/08829, và trong tài liệu Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Theo phương pháp khác, vùng biến đổi kháng thể với tính đặc hiệu liên kết (vị trí kết hợp kháng thể-kháng nguyên) mong muốn được dung hợp với các trình tự miền không đổi globulin miễn dịch. Tốt hơn là, sự dung hợp là với miền không đổi chuỗi nặng Ig, có chứa ít nhất là một phần của bản lề, các vùng C_{H2} , và C_{H3} . Ưu tiên là có vùng không đổi chuỗi nặng thứ nhất (C_{H1}) chứa vị trí cần thiết để liên kết chuỗi nhẹ, có ở ít nhất là một trong các thể dung hợp. ADN mã hóa cho thể dung hợp chuỗi nặng globulin miễn dịch và, nếu muốn, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, được cài xen vào các vector biểu hiện riêng rẽ, và được chuyển nạp đồng thời vào tế bào thích hợp. Điều này mang lại sự linh hoạt lớn hơn trong việc điều chỉnh tỷ lệ lẫn nhau của ba mảnh polypeptit theo các phương án khi sử dụng các tỷ lệ không cân bằng của ba chuỗi polypeptit được sử dụng trong việc xây dựng mang lại hiệu suất tối ưu của kháng thể đặc hiệu kép mong muốn. Tuy nhiên, có thể cài xen trình tự mã hóa cho hai hoặc cả ba chuỗi polypeptit vào vector biểu hiện đơn lẻ khi biểu hiện ít nhất là hai chuỗi polypeptit ở tỷ lệ bằng nhau dẫn đến hiệu suất cao hoặc khi tỉ lệ không có tác dụng đáng kể lên hiệu suất của tổ hợp chuỗi mong muốn.

Theo phương án cụ thể của phương pháp này, kháng thể đặc hiệu kép được tạo thành từ chuỗi nặng globulin miễn dịch lai có độ đặc hiệu liên kết thứ nhất ở một nhánh, và cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng globulin miễn dịch lai (tạo độ đặc hiệu liên kết thứ hai) ở nhánh khác. Đã phát hiện ra rằng cấu trúc bất đối xứng này tạo thuận lợi cho việc phân tách hợp chất đặc hiệu kép mong muốn khỏi dạng kết hợp chuỗi globulin miễn dịch không mong muốn, bởi vì sự có mặt của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch chỉ ở một nửa của phân tử đặc hiệu kép mang lại cách phân tách dễ dàng. Phương pháp này được bộc lộ trong tài liệu WO 94/04690. Để chi tiết hơn về việc tạo ra kháng thể đặc hiệu kép xem tài liệu, ví dụ, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Theo phương pháp khác được mô tả trong tài liệu Bằng Sáng Chế Mỹ 5731168, mặt phân cách giữa cặp phân tử kháng thể có thể được thiết kế để tối đa hóa tỷ lệ phần trăm của các đime khác loại mà được thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp. Mặt phân cách ưu tiên có chứa ít nhất là một phần của miền C_{H3} . Trong phương pháp này, một hoặc nhiều chuỗi bên axit amin nhỏ từ mặt phân cách của phân tử kháng thể thứ nhất được thay thế bằng chuỗi bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). Tạo ra "các hốc" bù trừ có kích thước tương đồng hoặc tương tự so với (các) chuỗi bên lớn trên mặt phân cách của phân tử kháng thể thứ hai bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin lớn bằng chuỗi bên axit amin nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin). Điều này mang lại cơ chế làm tăng hiệu suất của đime khác loại ngoài các sản phẩm cuối không mong muốn khác chẳng hạn như đime cùng loại.

Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm kháng thể được liên kết chéo hoặc "liên hợp khác loại". Ví dụ như, một trong các kháng thể trong liên hợp khác loại có thể được ghép cặp với avidin, khác với biotin. Các kháng thể này, ví dụ, được đề xuất để hướng đích tế bào hệ miễn dịch đến tế bào không mong muốn (Bằng Sáng Chế Mỹ 4,676,980), và để điều trị sự nhiễm HIV (WO 91/00360, WO 92/200373 và EP 03089). Kháng thể liên hợp khác loại có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp liên kết chéo phù hợp bất kỳ. Chất liên kết chéo thích hợp đã biết rõ trong lĩnh vực và được bộc lộ trong Bằng Sáng Chế Mỹ 4,676,980, cùng với một số kỹ thuật liên kết chéo.

Các kỹ thuật tạo ra kháng thể đặc hiệu kép từ các mảnh kháng thể đã được mô tả trong tài liệu. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép có thể được điều chế bằng cách sử dụng liên kết hóa học. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) mô tả quy trình trong đó các kháng thể nguyên vẹn được phân cắt bằng cách phân giải protein để tạo ra mảnh $F(ab')_2$. Các mảnh này được khử khi có mặt chất tạo phức dithiol, natri arsenit, để làm ổn định dithiol kế cận và ngăn cản sự hình thành disulfua nội phân tử. Sau đó mảnh Fab' tạo ra được chuyển hóa thành dẫn xuất thionitrobenzoat (TNB). Sau đó một trong các dẫn xuất Fab' -TNB được chuyển hóa lại thành Fab' -thiol bằng cách khử với mercaptoetylamin và được trộn với lượng đẳng mol của dẫn xuất Fab' -TNB khác để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép tạo ra có thể được sử dụng làm các chất cho sự cố định có chọn lọc của enzym.

Hiện có các kỹ thuật mà làm thuận lợi cho sự thu hồi trực tiếp của các mảnh Fab'-SH từ *E. coli*, mà có thể được ghép nối hóa học để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) mô tả sự sản xuất của phân tử $F(ab')_2$ kháng thể đặc hiệu kép được làm cho giống người. Mỗi mảnh Fab' được tiết một cách riêng rẽ khỏi *E. coli* và được đưa đi ghép nối hóa học trực tiếp in vitro để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép. Do đó kháng thể đặc hiệu kép được tạo thành có thể liên kết với tế bào biểu hiện quá mức thụ thể ErbB2 và tế bào T người bình thường, cũng như là kích hoạt hoạt tính dung giải của tế bào lympho gây độc tế bào người chống lại đích khối u vú người.

Các kỹ thuật khác nhau để tạo ra và phân lập mảnh kháng thể đặc hiệu kép trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tái tổ hợp cũng đã được mô tả (Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 16, 677-681 (1998). doi:10.1038/nbt0798-677pmid:9661204). Ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép đã được tạo ra bằng cách sử dụng “khóa kéo” loxin (Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553, 1992). Các peptit “khóa kéo” loxin từ các protein Fos và Jun được liên kết với các phần Fab' của hai kháng thể khác nhau bằng cách dung hợp gen. Kháng thể đime cùng loại bị khử ở vùng bản lề để tạo ra các monome và sau đó oxy hóa lại để tạo ra đime khác loại kháng thể. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để sản xuất homodime kháng thể. Công nghệ "diabody" được mô tả bởi Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) đề xuất cơ chế thay thế để tạo ra mảnh kháng thể đặc hiệu kép. Các mảnh có chứa V_H nối với V_L bằng cầu nối mà quá ngắn để cho phép bắt cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi. Theo đó, các miền V_H và V_L của một mảnh bị ép buộc bắt cặp với các miền V_L và V_H bổ sung của mảnh khác, nhờ đó tạo thành hai vị trí liên kết kháng nguyên. Chiến lược khác để tạo ra mảnh kháng thể đặc hiệu kép bằng cách sử dụng đime Fv đơn chuỗi (sFv) cũng đã được báo cáo. Xem Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Theo phương án cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu có thể được tạo thành dưới dạng phức hợp DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) (xem, ví dụ như, các Bằng Sáng Chế Mỹ 7,521,056; 7,527,787; 7,534,866; 7,550,143 và 7,666,400, phần Ví dụ thực hiện sáng chế của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.) Thông thường, kỹ thuật này có ưu điểm của sự tương tác liên kết đặc hiệu và ái lực cao mà xảy ra giữa trình tự miền dime hóa và gắn kết (DDD) của tiểu đơn vị điều hòa (R) của protein kinaza phụ thuộc cAMP (PKA) và trình tự miền neo (AD) có nguồn gốc từ

protein AKAP bất kỳ trong số nhiều protein AKAP (Baillie *et al.*, *FEBS Letters*. 2005; 579: 3264; Wong and Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 959). Các peptit DDD và AD có thể được gắn vào protein, peptit hoặc phân tử khác bất kỳ. Vì các trình tự DDD dime hóa tự phát và liên kết với trình tự AD, kỹ thuật này cho phép sự tạo thành của phức hợp giữa các phân tử được chọn lọc bất kỳ mà có thể được gắn vào các trình tự DDD hoặc AD.

Kháng thể có hơn hai hóa trị được dự tính. Ví dụ, có thể điều chế kháng thể đặc hiệu ba trong một (Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60, 1991; Xu *et al.*, *Science*, 358(6359):85-90, 2017). Kháng thể đa hóa trị có thể được nội tại hóa (và/hoặc được dị hóa) nhanh hơn kháng thể hóa trị hai bằng tế bào biểu hiện kháng nguyên mà kháng thể liên kết với. Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa hóa trị với ba hoặc hơn ba vị trí liên kết kháng nguyên (ví dụ như, tkháng thể hóa trị bốn), mà có thể được sản xuất dễ dàng bằng sự biểu hiện tái tổ hợp của axit nucleic mã hóa cho các chuỗi polypeptit của kháng thể. Kháng thể đa hóa trị có thể có chứa miền dime hóa và ba hoặc hơn ba vị trí liên kết kháng nguyên. Miền dime hóa được ưu tiên có chứa (hoặc gồm có) vùng Fc hoặc vùng bản lề. Trong trường hợp này, kháng thể có chứa vùng Fc và ba hoặc hơn ba vị trí liên kết kháng nguyên ở đầu tận cùng amino đối với vùng Fc. Kháng thể đa hóa trị được ưu tiên ở đây có chứa (hoặc gồm có) từ ba đến khoảng tám, nhưng tốt hơn là bốn, vị trí liên kết kháng nguyên. Kháng thể đa hóa trị có chứa ít nhất là một chuỗi polypeptit (và tốt hơn là hai chuỗi polypeptit), trong đó (các) chuỗi polypeptit có chứa hai hoặc nhiều hơn hai vùng biến đổi. Ví dụ, (các) chuỗi polypeptit có thể có chứa VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, trong đó VD1 là vùng biến đổi thứ nhất, VD2 là vùng biến đổi thứ hai, Fc là một chuỗi polypeptit của vùng Fc, X1 và X2 thể hiện axit amin hoặc polypeptit, và n bằng 0 hoặc 1. Ví dụ, (các) chuỗi polypeptit có thể có chứa: chuỗi VH-CH1-cầu nối linh hoạt-VH-CH1-vùng Fc; hoặc chuỗi VH-CH1-VH-CH1-vùng Fc. Kháng thể đa hóa trị ở đây tốt hơn là còn chứa ít nhất là hai (và tốt hơn là bốn) polypeptit vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Kháng thể đa hóa trị ở đây có thể, ví dụ như, có chứa từ khoảng hai đến khoảng tám polypeptit vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Polypeptit vùng biến đổi chuỗi nhẹ được dự tính ở đây có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và, một cách tùy ý, còn chứa miền C_L.

Sự cải biến điện tích đặc biệt hữu dụng trong trường hợp của kháng thể đa đặc hiệu, trong đó các đột biến thể axit amin trong phân tử Fab dẫn đến làm giảm sự bất

cặp nhằm của chuỗi nhẹ với chuỗi nặng không ăn khớp (sản phẩm phụ kiểu Bence-Jones), mà có thể xảy ra để sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép/đa đặc hiệu dựa trên Fab với sự trao đổi VH/VL ở một (hoặc hơn, trong trường hợp của phân tử có chứa hơn hai phân tử Fab liên kết kháng nguyên) của các nhánh liên kết của chúng (cũng xem công bố PCT số WO 2015/150447, cụ thể là các ví dụ ở trong đó, được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó).

Theo đó, theo phương án cụ thể, kháng thể chứa trong tác nhân trị liệu có chứa

(a) phân tử Fab thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất

(b) phân tử Fab thứ hai mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào T hoạt hóa và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên tế bào đích, hoặc kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên tế bào T hoạt hóa; và

trong đó

i) trong miền không đổi CL của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 124 được thế bằng axit amin tích điện dương (đánh số theo Kabat), và trong đó trong miền không đổi CH1 của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thế bằng axit amin tích điện âm (đánh số theo chỉ số EU Kabat); hoặc

ii) trong miền không đổi CL của phân tử Fab thứ hai dưới b) axit amin ở vị trí 124 được thế bằng axit amin tích điện dương (đánh số theo Kabat), và trong đó trong miền không đổi CH1 của phân tử Fab thứ hai dưới b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thế bằng axit amin tích điện âm (đánh số theo chỉ số EU Kabat).

Kháng thể có thể không chứa cả hai sự cải biến được đề cập theo i) và ii). Miền không đổi CL và CH1 của phân tử Fab thứ hai không được thay thế bởi nhau (*tức là*, vẫn không được trao đổi).

Theo phương án khác của kháng thể, trong miền không đổi CL của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 124 được thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền không đổi CH1 của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số EU Kabat).

Theo phương án khác, trong miền không đổi CL của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 124 được thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat), và trong miền không đổi CH1 của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 147 được thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số EU Kabat).

Theo phương án cụ thể, trong miền không đổi CL của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 124 được thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)) và axit amin ở vị trí 123 được thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền không đổi CH1 của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 147 được thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số EU Kabat).

Theo phương án cụ thể hơn, trong miền không đổi CL của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 124 được thế bằng lysin (K) (đánh số theo Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thế bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo Kabat), và trong miền không đổi CH1 của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 147 được thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo chỉ số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo chỉ số EU Kabat).

Theo phương án cụ thể hơn nữa, trong miền không đổi CL của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 124 được thế bằng lysin (K) (đánh số theo Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thế bằng arginin (R) (đánh số theo Kabat), và trong miền không đổi CH1 của phân tử Fab thứ nhất dưới a) axit amin ở vị trí 147 được thế bằng axit

glutamic (E) (đánh số theo chỉ số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo chỉ số EU Kabat).

F. Thụ Thể Kháng Nguyên Khảm

Thụ thể tế bào T nhân tạo (còn gọi là thụ thể tế bào T khảm, thụ thể miễn dịch khảm, thụ thể kháng nguyên khảm (CAR)) là thụ thể được thiết kế, mà ghép tính đặc hiệu tùy ý lên trên tế bào tác động miễn dịch. Thông thường, các thụ thể này được sử dụng để ghép tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng lên trên tế bào T, với việc chuyển trình tự mã hóa của chúng được làm cho thuận lợi bằng vector retrovirus. Theo cách này, số lượng lớn của tế bào T đặc hiệu đích có thể được tạo ra để chuyển tế bào nuôi. Các nghiên cứu lâm sàng Giai đoạn I của phương pháp này cho thấy hiệu quả.

Dạng phổ biến nhất của các phân tử này là dạng dung hợp của các mảnh biến đổi đơn chuỗi (scFv) có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng, dung hợp với miền xuyên màng và nội bào CD3-zeta. Phân tử này dẫn đến sự truyền tín hiệu zeta trong đáp ứng với sự nhận diện bởi scFv của đích của nó. Ví dụ về cấu trúc này là 14g2a-Zeta, mà là sự dung hợp của scFv có nguồn gốc từ tế bào lai 14g2a (mà nhận diện disialogangliosit GD2). Khi tế bào T biểu hiện phân tử này (thường đạt được bằng sự tải nạp vector oncoretrovirus), chúng nhận diện và tiêu diệt tế bào đích mà biểu hiện GD2 (ví dụ như, tế bào u nguyên bào thần kinh). Để nhắm đích tế bào B ác tính, các nhà nghiên cứu đã tái định hướng tính đặc hiệu của tế bào T bằng cách sử dụng thụ thể miễn dịch khảm đặc hiệu đối với phân tử dòng B, CD19.

Các phân biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch được dung hợp bằng cầu nối linh hoạt để tạo thành scFv. scFv này được dẫn trước bởi peptit tín hiệu để định hướng protein mới sinh đến lưới nội chất và sự biểu hiện bề mặt tiếp đó (nó được phân cắt). Đoạn đệm linh hoạt cho phép scFv hướng theo các chiều khác nhau để có thể liên kết kháng nguyên. Miền xuyên màng là xoắn alpha kỵ nước thông thường thường có nguồn gốc từ phân tử ban đầu của miền nội bào truyền tín hiệu mà nhô vào trong tế bào và truyền tín hiệu mong muốn.

Protein Kiểu I trên thực tế là hai miền protein được liên kết bằng xoắn alpha xuyên màng ở giữa. Lớp lipid kép màng tế bào, mà miền xuyên màng đi qua, hoạt động để tách phần bên trong (miền nội bào) khỏi phần bên ngoài (miền ngoại bào). Không

bất ngờ là việc gắn miền ngoại bào từ một protein với miền nội bào của protein khác dẫn đến phân tử mà kết hợp sự nhận diện của protein trước với tín hiệu của protein sau.

Miền Ngoại Bào. Peptit tín hiệu định hướng protein mới sinh đến lưới nội chất. Điều này là thiết yếu nếu thụ thể cần được glycosyl hóa và được neo trong màng tế bào. Trình tự peptit tín hiệu sinh vật nhân chuẩn bất kỳ thường hoạt động tốt. Thông thường, peptit tín hiệu được gắn tự nhiên vào thành phần ở gần đầu tận cùng amino nhất được sử dụng (*ví dụ như*, trong scFv với sự định hướng chuỗi nhẹ - cầu nối - chuỗi nặng, tín hiệu tự nhiên của chuỗi nhẹ được sử dụng).

Miền nhận diện kháng nguyên thường là scFv. Tuy nhiên có nhiều phương án thay thế. Miền nhận diện kháng nguyên từ các chuỗi đơn lẻ alpha và beta thụ thể tế bào T tự nhiên (TCR) đã được mô tả, là có miền ngoại bào đơn giản (*ví dụ như*, miền ngoại bào CD4 để nhận diện tế bào bị lây nhiễm HIV) và các thành phần nhận diện ngoại lai hơn chẳng hạn như xytokin được liên kết (mà dẫn đến sự nhận diện của các tế bào mang thụ thể xytokin). Trên thực tế, hầu như bất kỳ cái gì mà liên kết đích nhất định với ái lực cao có thể được sử dụng làm vùng nhận diện kháng nguyên.

Vùng đoạn đệm liên kết miền liên kết kháng nguyên với miền xuyên màng. Nó cần phải đủ linh hoạt để cho phép miền liên kết kháng nguyên hướng theo các chiều khác nhau để làm thuận lợi cho sự nhận diện kháng nguyên. Dạng đơn giản nhất là vùng bản lề từ IgG1. Các phương án thay thế bao gồm vùng CH₂CH₃ của globulin miễn dịch và các phần của CD3. Đối với hầu hết các cấu trúc dựa trên scFv, bản lề IgG1 là đủ. Tuy nhiên, đoạn đệm tốt nhất thường phải được xác định theo kinh nghiệm.

Miền Xuyên Màng. Miền xuyên màng là xoắn alpha kị nước mà mở rộng qua màng. Thông thường, miền xuyên màng từ thành phần gần màng nhất của miền nội bào được sử dụng. Điều thú vị là, việc sử dụng miền xuyên màng CD3-zeta có thể dẫn đến sự kết hợp của TCR nhân tạo vào TCR tự nhiên yếu tố mà phụ thuộc vào sự có mặt của gốc axit aspartic tích điện xuyên màng CD3-zeta tự nhiên. Các miền xuyên màng khác nhau dẫn đến độ ổn định thụ thể khác nhau. Miền xuyên màng CD28 dẫn đến thụ thể ổn định, được biểu hiện tốt.

Miền Nội Bào. Đây là "đầu có chức năng" của thụ thể. Sau khi nhận diện kháng nguyên, thụ thể kết cụm và tín hiệu được truyền đến tế bào. Thành phần miền nội bào thường dùng nhất là CD3-zeta, mà chứa 3 ITAM. Nó truyền tín hiệu hoạt hóa đến tế bào T sau khi kháng nguyên được liên kết. CD3-zeta có thể không cung cấp tín hiệu hoạt hóa bổ thể đầy đủ và tín hiệu đồng kích thích bổ sung là cần thiết.

CAR "thế hệ thứ nhất" thường có miền nội bào từ chuỗi ξ CD3, mà là chất truyền sơ cấp của tín hiệu từ TCR nội bào. CAR "thế hệ thứ hai" bổ sung miền truyền tín hiệu nội bào từ các thụ thể protein đồng kích thích khác nhau (ví dụ như, CD28, 41BB, ICOS) vào đuôi tế bào chất của CAR để tạo ra tín hiệu bổ sung cho tế bào T. Các nghiên cứu tiền lâm sàng đã chứng minh rằng thế hệ thứ hai của thiết kế CAR cải thiện hoạt tính kháng khối u của tế bào T. Gần đây hơn, CAR "thế hệ thứ ba" kết hợp nhiều miền truyền tín hiệu, chẳng hạn như CD3z-CD28-41BB hoặc CD3z-CD28-OX40, để gia tăng hơn nữa hiệu lực.

G. ADC

Thế Liên Hợp Thuốc Kháng Thể hay ADC là lớp mới của thuốc dược phẩm sinh học có hiệu lực cao được thiết kế dưới dạng trị liệu nhắm đích để điều trị cho người mắc bệnh truyền nhiễm. ADC là phân tử phức hợp gồm có kháng thể (toàn bộ mAb hoặc mảnh kháng thể chẳng hạn như mảnh biến đổi đơn chuỗi, hoặc scFv) được liên kết, thông qua cầu nối hóa học ổn định với liên kết không bền, với tải lượng hoặc thuốc gây độc tế bào/kháng virus có hoạt tính sinh học. Thế liên hợp thuốc kháng thể là các ví dụ về thế liên hợp sinh học và thế liên hợp miễn dịch.

Bằng cách kết hợp khả năng nhắm đích độc nhất của kháng thể đơn dòng với khả năng triệt tiêu ung thư của thuốc gây độc tế bào, thế liên hợp thuốc kháng thể cho phép phân biệt nhạy giữa mô khỏe mạnh và mô bị bệnh. Điều này có nghĩa là, trái ngược với phương pháp toàn thân truyền thống, thế liên hợp thuốc kháng thể nhắm đích và tấn công tế bào bị lây nhiễm nhờ đó tế bào khỏe mạnh bị ảnh hưởng ít nghiêm trọng hơn.

Trong liệu pháp kháng khối u dựa trên ADC phát triển, thuốc kháng ung thư (ví dụ như, độc tố tế bào hoặc chất gây độc tế bào) được ghép nối với kháng thể mà nhắm đích đặc hiệu chỉ thị tế bào nhất định (ví dụ như, protein màng, lý tưởng là, chỉ được tìm

thấy ở trong hoặc ở trên tế bào bị lây nhiễm). Kháng thể theo vết các protein này vào trong cơ thể và gắn bản thân chúng vào bề mặt của tế bào ung thư. Phản ứng hóa sinh giữa kháng thể và protein đích (kháng nguyên) kích hoạt tín hiệu trong tế bào khối u, mà sau đó hấp thụ hoặc nội tại hóa kháng thể cùng với độc tố tế bào. Sau khi ADC được nội tại hóa, thuốc gây độc tế bào được giải phóng và tiêu diệt tế bào hoặc làm hư hỏng sự sao chép virus. Do sự nhắm đích này, lý tưởng là thuốc có tác dụng phụ giảm đi và tạo ra cửa sổ trị liệu rộng hơn so với các tác nhân khác.

Liên kết ổn định giữa kháng thể và tác nhân gây độc tế bào/kháng virus là khía cạnh cốt yếu của ADC. Cầu nối được dựa trên mô típ hóa học bao gồm disulfua, hydrazon hoặc peptit (có thể phân cắt), hoặc thioete (không thể phân cắt) và điều khiển sự phân bố và phân phối của tác nhân gây độc tế bào đến tế bào đích. Các loại có thể phân cắt và không thể phân cắt của cầu nối đã được chứng minh là an toàn trong các thử nghiệm cận lâm sàng và lâm sàng. Brentuximab vedotin bao gồm cầu nối có thể phân cắt nhạy cảm với enzym mà phân phối tác nhân kháng vi ống hiệu nghiệm và độ độc cao Monomethyl auristatin E hoặc MMAE, tác nhân kháng u tổng hợp, đến tế bào ác tính CD30-dương đặc hiệu ở người. Do độ độc cao của nó MMAE, mà ức chế sự phân chia tế bào bằng cách phong bế sự polyme hóa của tubulin, không thể sử dụng làm thuốc hóa trị liệu tác nhân đơn lẻ. Tuy nhiên, dạng kết hợp của MMAE được liên kết với kháng thể đơn dòng kháng CD30 (cAC10, protein màng tế bào của yếu tố hoại tử khối u hoặc thụ thể TNF) được chứng minh là ổn định trong dịch ngoại bào, có thể phân cắt bằng cathepsin và an toàn để trị liệu. Trastuzumab emtansin, ADC đã được phê chuẩn khác, là dạng kết hợp của chất ức chế tạo thành vi ống mertansin (DM-1), dẫn xuất của Maytansin, và kháng thể trastuzumab (Herceptin®/Genentech/Roche) được gắn bằng cầu nối không thể phân cắt, ổn định.

Độ khả dụng của cầu nối tốt hơn và ổn định hơn làm thay đổi chức năng của liên kết hóa học. Loại cầu nối, có thể phân cắt hoặc không thể phân cắt, mượn tính chất đặc hiệu đối với thuốc gây độc tế bào (kháng ung thư). Ví dụ như, cầu nối không thể phân cắt giữ thuốc ở trong tế bào. Kết quả là, toàn bộ kháng thể, cầu nối và tác nhân gây độc tế bào đi vào tế bào ung thư được nhắm đích trong đó kháng thể bị thoái biến đến cấp độ axit amin. Phức hợp thu được – axit amin, cầu nối và tác nhân gây độc tế bào – bây giờ trở thành thuốc hoạt tính. Ngược lại, cầu nối có thể phân cắt được xúc tác bằng enzym trong tế bào chủ trong đó nó giải phóng tác nhân gây độc tế bào.

Loại khác của cầu nối có thể phân cắt, hiện đang được phát triển, bổ sung phân tử phụ thêm giữa thuốc gây độc tế bào/kháng virus và vị trí phân cắt. Công nghệ cầu nối này cho phép các nhà nghiên cứu để chế tạo ADC linh hoạt hơn mà không lo lắng về việc làm thay đổi động học phân cắt. Các nhà nghiên cứu cũng đang phát triển phương pháp mới để phân cắt peptit dựa trên sự thoái biến Edman, phương pháp xác định trình tự axit amin trong peptit. Sự định hướng trong tương lai trong việc phát triển ADC cũng bao gồm sự phát triển của sự liên hợp đặc hiệu vị trí (TDC) để cải thiện thêm độ ổn định và chỉ số trị liệu và thể liên hợp miễn dịch phát tia α và hạt nano liên hợp kháng thể.

H. BiTE

Chất ăn khớp tế bào T đặc hiệu kép (BiTE) là lớp kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép nhân tạo mà được nghiên cứu để sử dụng làm thuốc chống ung thư. Chúng định hướng hệ miễn dịch của vật chủ, đặc biệt hơn là hoạt tính gây độc tế bào của tế bào T, chống lại tế bào bị lây nhiễm. *BiTE* là nhãn hiệu đã được đăng ký của Micromet AG.

BiTE là protein dung hợp gồm có hai mảnh biến đổi đơn chuỗi (scFv) của các kháng thể khác nhau, hoặc các trình tự axit amin từ bốn gen khác nhau, trên chuỗi peptit đơn lẻ nặng khoảng 55 kilodalton. Một trong số các scFv liên kết với tế bào T thông qua thụ thể CD3, và scFv khác liên kết với tế bào bị lây nhiễm thông qua phân tử đặc hiệu.

Giống như kháng thể đặc hiệu kép khác, và không giống như kháng thể đơn dòng thông thường, BiTE tạo thành liên kết giữa tế bào T và tế bào đích. Điều này làm cho tế bào T gây ra hoạt tính gây độc tế bào/kháng virus trên tế bào bị lây nhiễm bằng cách sản xuất protein như perforin và granzym, độc lập trong sự có mặt của MHC I hoặc phân tử đồng kích thích. Các protein này đi vào tế bào bị lây nhiễm và làm bắt đầu sự chết theo chương trình của tế bào. Tác động này bắt chước quy trình sinh lý được quan sát thấy trong quá trình tế bào T tấn công chống lại tế bào bị lây nhiễm.

I. Intrabody

Theo phương án cụ thể, kháng thể là kháng thể tái tổ hợp mà thích hợp để tác động bên trong tế bào – kháng thể này được biết đến dưới dạng "intrabody." Các kháng thể này có thể gây trở ngại cho chức năng đích bằng nhiều cơ chế, chẳng hạn như bằng cách thay đổi việc chuyên chở protein nội bào, gây trở ngại cho chức năng enzym, và phong bế tương tác protein-protein hoặc protein-ADN. Theo nhiều cách, cấu trúc của chúng bất chức hoặc song song với cấu trúc của kháng thể đơn chuỗi và đơn miền, được thảo luận ở trên. Quả thực, bản phiên mã đơn lẻ/đơn chuỗi là đặc điểm quan trọng mà cho phép sự biểu hiện nội bào trong tế bào đích, và cũng làm cho protein đi qua màng tế bào dễ dàng hơn. Tuy nhiên, các dấu hiệu khác là cần thiết.

Hai vấn đề chính ảnh hưởng đến việc thực hiện trị liệu intrabody là phân phối, bao gồm việc nhắm đích tế bào/mô, và độ ổn định. Đối với phân phối, nhiều phương pháp đã được sử dụng, chẳng hạn như phân phối định hướng mô, sử dụng vùng khởi động đặc hiệu loại tế bào, phân phối dựa trên virus và sử dụng peptit có khả năng thẩm thấu tế bào/di chuyển qua màng. Đối với độ ổn định, phương pháp này thường là sàng lọc bằng tổng lực, bao gồm phương pháp mà gồm sự hiển thị phago và có thể bao gồm sự trưởng thành hoặc sự phát triển trình tự của các trình tự liên ứng, hoặc nhiều sự cải biến được định hướng chẳng hạn như sự cải biến làm ổn định các trình tự (ví dụ như, vùng Fc, các trình tự protein chaperon, khóa kéo loxin) và sự thay thế/cải biến disulfua.

Đặc điểm khác mà intrabody có thể đòi hỏi là tín hiệu để nhắm đích nội bào. Vector mà có thể nhắm đích intrabody (hoặc protein khác) đến các vùng dưới tế bào chẳng hạn như tế bào chất, nhân, ty thể và ER đã được thiết kế và có trên thị trường (Invitrogen Corp.; Persic *et al.*, 1997).

Nhờ khả năng đi vào tế bào của chúng, intrabody có ứng dụng khác mà các loại khác kháng thể có thể không đạt được. Trong trường hợp của kháng thể này, khả năng để tương tác với miền tế bào chất MUC1 trong tế bào sống có thể gây trở ngại cho các chức năng có liên quan đến MUC1 CD, chẳng hạn như các chức năng truyền tín hiệu (liên kết với phân tử khác) hoặc sự tạo thành oligome. Cụ thể là, dự tính rằng kháng thể này có thể được sử dụng để ức chế sự tạo thành dime MUC1.

J. Tinh Chế

Theo phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể được tinh chế. Thuật ngữ "được tinh chế," như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để đề cập đến hợp phần, có thể phân lập từ các thành phần khác, trong đó protein được tinh chế đến mức độ bất kỳ tương quan với tình trạng có thể thu được trong tự nhiên của nó. Do đó protein được tinh chế còn dùng để chỉ protein, không chứa môi trường mà nó có thể có mặt trong tự nhiên ở trong đó. Trong đó thuật ngữ "về cơ bản được tinh chế" được sử dụng, ký hiệu này dùng để chỉ hợp phần trong đó protein hoặc peptit tạo thành thành phần chính của hợp phần, chẳng hạn như cấu thành khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 95% hoặc nhiều hơn của protein trong hợp phần.

Các kỹ thuật tinh chế protein được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Các kỹ thuật này gồm, ở một cấp độ, sự cắt phân đoạn thô của môi trường tế bào thành các phân đoạn polypeptit và không có polypeptit. Bằng cách tách polypeptit khỏi các protein khác, polypeptit được quan tâm có thể được tinh chế thêm bằng cách sử dụng các kỹ thuật sắc ký và điện di để đạt được sự tinh chế một phần hoặc hoàn toàn (hoặc tinh chế đến khi đồng nhất). Phương pháp phân tích cụ thể là được làm cho phù hợp để điều chế peptit tinh khiết là sắc ký trao đổi ion, sắc ký loại trừ; điện di gel polyacrylamit; tập trung đẳng điện. Phương pháp khác để tinh chế protein bao gồm, kết tủa với amoni sulfat, PEG, kháng thể và dạng tương tự hoặc bằng cách làm biến tính bằng nhiệt, sau đó là ly tâm; lọc gel, pha đảo, sắc ký hydroxylapatit và ái lực; và dạng kết hợp của các kỹ thuật này và các kỹ thuật khác.

Trong việc tinh chế kháng thể theo sáng chế, có thể mong muốn biểu hiện polypeptit trong hệ thống biểu hiện nhân sơ hoặc nhân chuẩn và chiết protein bằng cách sử dụng các điều kiện làm biến tính. Polypeptit có thể được tinh chế từ các thành phần tế bào khác bằng cách sử dụng cột ái lực, mà liên kết với phần được gắn đuôi của polypeptit. Như thường là đã biết trong lĩnh vực, người ta tin rằng thứ tự thực hiện các bước tinh chế khác nhau có thể được thay đổi, hoặc các bước nhất định có thể được bỏ qua, và vẫn dẫn đến phương pháp thích hợp để điều chế protein hoặc peptit về cơ bản được tinh chế.

Thông thường, kháng thể hoàn chỉnh được phân đoạn bằng cách sử dụng các tác nhân (*tức là*, protein A) mà liên kết phần Fc của kháng thể. Theo cách khác, kháng nguyên có thể được sử dụng để tinh chế và chọn lọc đồng thời các kháng thể thích hợp. Phương pháp này thường sử dụng tác nhân chọn lọc liên kết với giá đỡ, chẳng hạn như cột, bộ lọc hoặc hạt. Kháng thể được liên kết với giá đỡ, chất tạp nhiễm được loại bỏ (*ví dụ như*, được rửa đi), và kháng thể được giải phóng bằng cách áp dụng các điều kiện (muối, nhiệt, v.v.).

Các phương pháp khác nhau để định lượng mức độ tinh chế của protein hoặc peptit đã được biết đến đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực nhờ vào sáng chế này. Chúng bao gồm, ví dụ như, xác định hoạt tính đặc hiệu của phân đoạn hoạt tính, hoặc đánh giá lượng của các polypeptit ở trong phân đoạn bằng phân tích SDS/PAGE. Phương pháp khác để đánh giá độ tinh khiết của phân đoạn là để tính hoạt tính đặc hiệu của phân đoạn, để so sánh nó với hoạt tính đặc hiệu của dịch chiết ban đầu, và do đó để tính mức độ độ tinh khiết. Đơn vị thực sự được sử dụng để thể hiện lượng của hoạt tính sẽ, tất nhiên, phụ thuộc vào kỹ thuật thử nghiệm cụ thể được chọn để tuân theo sự tinh chế và việc có hay không có protein hoặc peptit được biểu hiện thể hiện hoạt tính có thể phát hiện được.

Đã biết rằng sự di chuyển của polypeptit có thể thay đổi, đôi khi là đáng kể, với các điều kiện khác nhau của SDS/PAGE (Capaldi *et al.*, 1977). Do đó rõ ràng rằng dưới các điều kiện điện di khác nhau, khối lượng phân tử biểu kiến của sản phẩm biểu hiện được tinh chế hoặc được tinh chế một phần có thể thay đổi.

III. Sự Gây Miễn Dịch Chủ Động/Thụ Động Và Sự Điều Trị/Ngăn Ngừa Nhiễm SARS-CoV-2

A. Chế Phẩm Và Cách Dùng

Sáng chế đề xuất được phẩm có chứa kháng thể kháng virus SARS-CoV-2 và kháng nguyên để tạo ra chúng. Dược phẩm này có chứa lượng hữu hiệu để phòng ngừa hoặc điều trị của kháng thể hoặc mảnh của chúng, hoặc chất gây miễn dịch peptit, và chất mang dược dụng. Theo phương án cụ thể, thuật ngữ "dược dụng" có nghĩa là được cơ quan quản lý của chính quyền liên bang hoặc tiểu bang phê chuẩn hoặc được liệt kê trong Dược Điển Hoa Kỳ hoặc dược điển được công nhận chung khác để sử

dùng ở động vật, và cụ thể hơn là ở người. Thuật ngữ "chất mang" dùng để chỉ chất pha loãng, tá dược, hoặc tá dược lỏng mà chất trị liệu được dùng với nó. Chất mang được này có thể là chất lỏng tiết trùng, chẳng hạn như nước và dầu, bao gồm các dịch lỏng có nguồn gốc từ dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc tổng hợp, chẳng hạn như dầu lạc, dầu đậu tương, dầu khoáng, dầu vừng và dạng tương tự. Nước là chất mang cụ thể khi được phẩm được dùng trong tĩnh mạch. Dung dịch nước muối và dung dịch dextroza và glyxrol trong nước cũng có thể được sử dụng làm chất mang lỏng, cụ thể là làm dung dịch để tiêm. Tá dược thích hợp khác bao gồm tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mỳ, đá phân, silicagel, natri stearat, glyxerol monostearat, đá talc, natri clorua, sữa gầy sấy khô, glyxerol, propylen, glycol, nước, etanol và dạng tương tự.

Dược phẩm, nếu muốn, cũng có thể có chứa lượng nhỏ của chất làm ẩm hoặc nhũ tương hóa, hoặc chất đệm pH. Các dược phẩm này có thể có dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, bột, chế phẩm được giải phóng duy trì và dạng tương tự. Chế phẩm dùng qua đường miệng có thể bao gồm các chất mang tiêu chuẩn chẳng hạn như các loại dùng cho dược phẩm của mannitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat, v.v.. Các ví dụ về các tác nhân được thích hợp được mô tả trong "Remington's Pharmaceutical Sciences." Dược phẩm này chứa lượng hữu hiệu để phòng ngừa hoặc điều trị của kháng thể hoặc mảnh của chúng, tốt hơn là ở dạng được tinh chế, cùng với lượng thích hợp của chất mang sao cho cung cấp dạng thích hợp để dùng cho bệnh nhân. Chế phẩm này cần phải phù hợp với phương thức dùng, mà có thể là qua đường miệng, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong má, trong mũi, phun sương, xông khí quản, trong trực tràng, qua âm đạo, tại chỗ hoặc được phân phối bằng cách thông khí cơ học.

Vắc xin hoạt tính cũng được hình dung trong đó kháng thể như các kháng thể được bộc lộ được sản xuất *in vivo* ở đối tượng có nguy cơ nhiễm SARS-CoV-2. Vắc xin này có thể được tạo chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ như, được tạo chế phẩm để tiêm qua đường trong da, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, hoặc thậm chí trong màng bụng. Việc dùng bằng đường trong da và trong cơ được dự tính. Vắc xin có thể theo cách khác được dùng bằng đường tại chỗ trực tiếp vào niêm mạc, ví dụ như, bằng thuốc nhỏ mũi, xông, bằng dụng cụ phun sương, hoặc thông qua sự phân phối trong trực tràng hoặc qua âm đạo. Muối được dùng bao gồm muối axit và muối

mà được tạo thành với axit vô cơ chẳng hạn như, ví dụ, axit hydrocloric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, axit oxalic, axit tartaric, axit mandelic, và axit tương tự. Các muối được tạo thành với nhóm carboxyl tự do cũng có thể có nguồn gốc từ bazơ vô cơ chẳng hạn như, ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit, và bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, 2-etylamin ethanol, histidin, procain và bazơ tương tự.

Việc chuyển thụ động của kháng thể, đã được biết đến dưới dạng miễn dịch thụ động mắc phải nhân tạo, thường gồm việc sử dụng tiêm trong tĩnh mạch hoặc trong cơ. Các dạng của kháng thể có thể là huyết tương hoặc huyết thanh máu người hoặc động vật, dưới dạng globulin miễn dịch người đã được thu gom để sử dụng trong tĩnh mạch (IVIG) hoặc trong cơ (IG), dưới dạng IVIG hoặc IG người độ chuẩn cao từ thể cho đã được gây miễn dịch hoặc từ thể cho đang hồi phục từ bệnh, và dưới dạng kháng thể đơn dòng (MAb). Sự miễn dịch này thường kết thúc chỉ trong thời gian ngắn, và cũng có nguy cơ tiềm năng đối với phản ứng quá mẫn, và bệnh huyết thanh, đặc biệt là từ globulin gamma có nguồn gốc không phải từ người. Tuy nhiên, miễn dịch thụ động mang lại sự bảo vệ ngay lập tức. Kháng thể được tạo chế phẩm trong chất mang thích hợp để tiêm, tức là, tiệt trùng và có thể phân phối bằng xy lanh.

Nhìn chung, các thành phần của các hợp phần theo sáng chế được cung cấp riêng rẽ hoặc được trộn với nhau ở dạng liều đơn vị, ví dụ như, dưới dạng bột được làm đông lạnh khô hoặc chất cô không chứa nước trong vật chứa kín khí chẳng hạn như ampun hoặc túi xác định lượng hoạt chất. Khi hợp phần được dùng bằng cách truyền, nó có thể được làm phân tán bằng chai truyền có chứa nước hoặc nước muối loại dùng cho được phẩm tiệt trùng. Khi hợp phần được dùng bằng cách tiêm, ampun của nước tiệt trùng để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi sử dụng.

Hợp phần theo sáng chế có thể được tạo chế phẩm dưới dạng dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối được dùng bao gồm các muối được tạo thành với anion chẳng hạn như axit clohydric, axit phosphoric, axit axetic, axit oxalic, axit tartaric, v.v. và các muối được tạo thành với cation chẳng hạn như các muối được tạo dẫn xuất từ natri, kali, amoni, canxi, sắt hydroxit, isopropylamin, trietylamin, 2-etylamin ethanol, histidin, procain, v.v..

2. ADCC

Sự gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) là cơ chế miễn dịch dẫn đến sự dung giải của tế bào đích được phủ kháng thể bằng tế bào tác động miễn dịch. Tế bào đích là tế bào mà kháng thể hoặc các mảnh của chúng có chứa vùng Fc liên kết đặc hiệu với, thường là thông qua phần protein mà ở đầu tận cùng N đối với vùng Fc. "Kháng thể có sự gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) tăng lên/giảm đi" có nghĩa là kháng thể có ADCC tăng lên/giảm đi như xác định được bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ADCC tăng lên/giảm đi" được xác định dưới dạng sự tăng lên/giảm đi của số lượng của tế bào đích mà được dung giải trong thời gian nhất định, ở nồng độ nhất định của kháng thể trong môi trường xung quanh tế bào đích, bằng cơ chế của ADCC đã xác định ở trên, và/hoặc sự giảm đi/tăng lên của nồng độ của kháng thể, trong môi trường xung quanh tế bào đích, cần để đạt được sự dung giải của số lượng nhất định của tế bào đích trong thời gian nhất định, bằng cơ chế của ADCC. Sự tăng lên/giảm đi của ADCC tương quan với ADCC qua trung gian cùng một kháng thể được sản xuất bằng cùng một loại tế bào chủ, sử dụng cùng một phương pháp sản xuất, tinh chế, tạo chế phẩm và lưu trữ tiêu chuẩn (mà đã được biết đến đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực), nhưng không được thiết kế. Ví dụ như, sự tăng lên của ADCC qua trung gian kháng thể được sản xuất bằng tế bào chủ được thiết kế để có kiểu glycosyl hóa đã được thay đổi (ví dụ như, để biểu hiện glycosyltransferaza, GnTIII, hoặc glycosyltransferaza khác) bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, tương quan với ADCC qua trung gian cùng một kháng thể được sản xuất bằng cùng một loại tế bào chủ không được thiết kế.

3. CDC

Sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) là chức năng của hệ thống bổ thể. Nó là quy trình trong hệ thống miễn dịch mà tiêu diệt tác nhân gây bệnh bằng cách làm hư hỏng màng của chúng mà không có sự tham gia của kháng thể hoặc tế bào của hệ

thống miễn dịch. Có ba quy trình chính. Cả ba quy trình này cài xen một hoặc nhiều phức hợp tấn công màng (MAC) vào tác nhân gây bệnh mà gây ra sự trương do áp suất thẩm thấu keo gây chết, *tức là*, CDC. Nó là một trong số các cơ chế mà nhờ đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể có tác dụng kháng virus.

IV. Thể Liên Hợp Kháng Thể

Kháng thể theo sáng chế có thể được liên kết với ít nhất là một tác nhân để tạo thành thể liên hợp kháng thể. Để làm tăng hiệu quả của phân tử kháng thể dưới dạng tác nhân chẩn đoán hoặc trị liệu, nó thường phải liên kết hoặc liên kết cộng hóa trị hoặc tạo phức hợp ít nhất là một phân tử hoặc gốc mong muốn. Phân tử hoặc gốc này có thể là, nhưng không giới hạn ở, ít nhất là một phân tử tác động hoặc báo cáo. Phân tử tác động có chứa phân tử có hoạt tính mong muốn, *ví dụ như*, hoạt tính gây độc tế bào. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về phân tử tác động mà đã được gắn vào kháng thể bao gồm độc tố, tác nhân kháng khối u, enzym trị liệu, nuclit phóng xạ, tác nhân kháng virus, tác nhân chelat hóa, xytokin, yếu tố sinh trưởng, và oligo- hoặc polynucleotit. Ngược lại, phân tử báo cáo được xác định dưới dạng gốc bất kỳ mà có thể được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về phân tử báo cáo mà đã được liên hợp với kháng thể bao gồm enzym, nhãn phóng xạ, hapten, nhãn huỳnh quang, phân tử lân quang, phân tử phát quang hóa học, chất mang màu, phân tử ưa ánh sáng, hạt hoặc phối tử có màu, chẳng hạn như biotin.

Thể liên hợp kháng thể thường được ưu tiên để sử dụng làm tác nhân chẩn đoán. Kháng thể chẩn đoán thường nằm trong hai lớp, kháng thể để sử dụng trong chẩn đoán *in vitro*, chẳng hạn như trong nhiều thử nghiệm miễn dịch, và kháng thể để sử dụng quy trình chẩn đoán *in vivo*, thường là đã được biết đến dưới dạng "chụp ảnh được định hướng bằng kháng thể." Nhiều tác nhân chụp ảnh thích hợp đã được biết đến trong lĩnh vực, như là phương pháp gắn chúng vào kháng thể (xem, *ví dụ như*, các Bằng Sáng Chế Mỹ 5,021,236, 4,938,948, và 4,472,509). Gốc chụp ảnh được sử dụng có thể là ion thuận từ, đồng vị có hoạt tính phóng xạ, chất phát huỳnh quang, chất có thể phát hiện được bằng NMR, và tác nhân chụp ảnh tia X.

Trong trường hợp của ion thuận từ, người ta có thể đề cập làm ví dụ các ion chẳng hạn như crom (III), mangan (II), sắt (III), sắt (II), coban (II), niken (II), đồng

(II), neodim (III), samari (III), ytebi (III), gadolini (III), vanadi (II), tecbi (III), đyprosi (III), honmi (III) và/hoặc ecbi (III), với gadolini được đặc biệt ưu tiên. Các ion hữu dụng trong các trường hợp khác, chẳng hạn như chụp ảnh tia X, bao gồm nhưng không giới hạn ở lantan (III), vàng (III), chì (II), và đặc biệt là bitmut (III).

Trong trường hợp của đồng vị có hoạt tính phóng xạ cho ứng dụng trị liệu và/hoặc chẩn đoán, người ta có thể kể đến astatin²¹¹, ¹⁴cacbon, ⁵¹crom, ³⁶clo, ⁵⁷coban, ⁵⁸coban, đồng⁶⁷, ¹⁵²Eu, gali⁶⁷, ³hydro, iot¹²³, iot¹²⁵, iot¹³¹, indi¹¹¹, ⁵⁹sắt, ³²photpho, reni¹⁸⁶, reni¹⁸⁸, ⁷⁵selen, ³⁵lưu huỳnh, technicium^{99m} và/hoặc ytri⁹⁰. ¹²⁵I thường được ưu tiên để sử dụng theo phương án nhất định, và technicium^{99m} và/hoặc indi¹¹¹ cũng thường được ưu tiên do năng lượng thấp của chúng và sự thích hợp để phát hiện phạm vi dài. Kháng thể đơn dòng được gắn nhãn có hoạt tính phóng xạ theo sáng chế có thể được sản xuất theo phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực. Ví dụ như, kháng thể đơn dòng có thể được iot hóa bằng cách cho tiếp xúc với natri và/hoặc kali iodua và tác nhân oxy hóa hóa học chẳng hạn như natri hypoclorit, hoặc tác nhân oxy hóa enzym, chẳng hạn như lactoperoxidaza. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được gắn nhãn bằng technetium^{99m} bằng quy trình trao đổi phối tử, ví dụ như, bằng cách khử pertechnat bằng dung dịch chứa thiếc, chelat hóa technetium đã được khử trên cột Sephadex và cho kháng thể vào cột này. Theo cách khác, các kỹ thuật gắn nhãn trực tiếp có thể được sử dụng, *ví dụ như*, bằng cách ủ pertechnat, tác nhân khử chẳng hạn như SnCl_2 , dung dịch đệm chẳng hạn như dung dịch natri-kali phthalat, và kháng thể. Các nhóm chức trung gian mà thường được sử dụng để liên kết đồng vị phóng xạ mà tồn tại dưới dạng ion kim loại với kháng thể là axit diethylentriaminpentaaxetic (DTPA) hoặc axit etylen diamintetraxetic (EDTA).

Trong số các nhãn huỳnh quang được dự tính để sử dụng làm thể liên hợp bao gồm Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Fluorescein Isothioxyanat, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamin Green, Rhodamin Red, Renographin, ROX, TAMRA, TET, Tetrametyl rhodamin, và/hoặc Texas Red.

Các loại khác của kháng thể được dự tính trong sáng chế là kháng thể được dự định ban đầu để sử dụng *in vitro*, trong đó kháng thể được liên kết với phối tử liên kết thứ cấp và/hoặc với enzym (đuôi enzym) mà sẽ tạo ra sản phẩm có màu khi tiếp xúc

với cơ chất sinh màu. Các ví dụ về enzym thích hợp bao gồm ureaza, phosphataza kiềm, hydro peroxidaza (củ cải ngựa) hoặc glucoza oxidaza. Phôi tử liên kết thứ cấp được ưu tiên là các hợp chất biotin và avidin và streptavidin. Việc sử dụng các nhãn này đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực và được mô tả, ví dụ như, trong các Bằng Sáng Chế Mỹ 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 và 4,366,241.

Phương pháp đã biết khác nữa để gắn đặc hiệu vị trí phân tử vào kháng thể có chứa phản ứng của kháng thể với nhãn ái lực dựa trên hapten. Về cơ bản, nhãn ái lực dựa trên hapten phản ứng với axit amin ở vị trí liên kết kháng nguyên, bởi nó phá hủy vị trí này và phong bế phản ứng kháng nguyên đặc hiệu. Tuy nhiên, điều này có thể không có lợi vì nó dẫn đến sự mất đi của sự liên kết kháng nguyên bằng thể liên hợp kháng thể.

Phân tử chứa các nhóm azido cũng có thể được sử dụng để tạo thành liên kết cộng hóa trị với protein thông qua hợp chất trung gian nitren phản ứng mà được tạo ra bằng tia cực tím cường độ thấp (Potter and Haley, 1983). Cụ thể là, chất tương tự 2- và 8-azido của các nucleotit purin đã được sử dụng làm mẫu dò quang học định hướng vị trí để xác định protein liên kết nucleotit trong dịch chiết tế bào thô (Owens & Haley, 1987; Atherton *et al.*, 1985). Các nucleotit 2- và 8-azido cũng đã được sử dụng để lập bản đồ miền liên kết nucleotit của protein được tinh chế (Khatoon *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; Dholakia *et al.*, 1989) và có thể được sử dụng làm tác nhân liên kết kháng thể.

Một vài phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực để gắn hoặc liên hợp kháng thể đối với gốc liên hợp của nó. Một số phương pháp gắn gồm việc sử dụng phức hợp chelat kim loại sử dụng, ví dụ như, tác nhân chelat hóa hữu cơ như axit diethylentriaminpentaaxetic anhydrit (DTPA); axit etylentriaminetetraaxetic; N-clo-p-toluensulfonamit; và/hoặc tetraclo-3 α -6 α -diphenylglycouril-3 được gắn vào kháng thể (các Bằng Sáng Chế Mỹ 4,472,509 và 4,938,948). Kháng thể đơn dòng cũng có thể được cho phản ứng với enzym trong sự có mặt của tác nhân ghép nối chẳng hạn như glutaraldehyt hoặc periodat. Thể liên hợp với chỉ thị fluorescein được điều chế trong sự có mặt của các tác nhân ghép nối này hoặc bằng phản ứng với isothioxyanat. Trong Bằng Sáng Chế Mỹ 4,938,948, việc chụp ảnh khối u vú đạt được bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và gốc chụp ảnh có thể phát hiện được được liên kết với kháng thể

bằng cách sử dụng cầu nối chẳng hạn như methyl-p-hydroxybenzimidat hoặc N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat.

Theo các phương án khác, sự tạo dẫn xuất của globulin miễn dịch bằng cách đưa chọn lọc các nhóm sulfhydryl trong vùng Fc của globulin miễn dịch, sử dụng điều kiện phản ứng mà không làm thay đổi vị trí kết hợp kháng thể được dự tính. Thử nghiệm liên hợp kháng thể được sản xuất theo phương pháp này được bộc lộ để thể hiện độ bền lâu, độ đặc hiệu và độ nhạy được cải thiện (Bằng Sáng Chế Mỹ 5,196,066, được kết hợp ở đây để tham khảo). Sự gắn đặc hiệu vị trí của phân tử tác động hoặc báo cáo, trong đó phân tử báo cáo hoặc tác động được liên hợp vào gốc carbohydrat trong vùng Fc cũng đã được bộc lộ trong tài liệu (O'Shannessy *et al.*, 1987). Phương pháp này đã được báo cáo để sản xuất kháng thể hứa hẹn về mặt chẩn đoán và trị liệu mà hiện nay đang được đánh giá lâm sàng.

V. Phương Pháp Phát Hiện Miễn Dịch

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện miễn dịch để liên kết, tinh chế, loại bỏ, định lượng và theo cách khác thường là phát hiện SARS-CoV-2 và kháng nguyên kết hợp của nó. Mặc dù phương pháp này có thể được áp dụng theo nghĩa truyền thống, cách sử dụng khác sẽ được kiểm soát chất lượng và theo dõi của vắc xin và dịch dự trữ virus khác, trong đó kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để đánh giá lượng hoặc tính toàn vẹn (*tức là*, độ ổn định lâu dài) của kháng nguyên ở virus. Theo cách khác, phương pháp có thể được sử dụng để sàng lọc các kháng thể khác nhau về biên dạng khả năng phản ứng thích hợp/mong muốn.

Các phương pháp phát hiện miễn dịch khác bao gồm các thử nghiệm đặc hiệu để xác định sự có mặt của SARS-CoV-2 ở đối tượng. Phạm vi rộng của các định dạng thử nghiệm được dự tính, nhưng đặc biệt là các định dạng thử nghiệm mà được sử dụng để phát hiện SARS-CoV-2 trong dịch lỏng thu được từ đối tượng, chẳng hạn như nước bọt, máu, huyết tương, đờm, tinh dịch hoặc nước tiểu. Cụ thể là, tinh dịch đã được chứng minh là mẫu có thể sống để phát hiện SARS-CoV-2 (Purpura *et al.*, 2016; Mansuy *et al.*, 2016; Barzon *et al.*, 2016; Gornet *et al.*, 2016; Duffy *et al.*, 2009; CDC, 2016; Halfon *et al.*, 2010; Elder *et al.* 2005). Các thử nghiệm có thể được định dạng theo cách có lợi để sử dụng không phải là trong việc chăm sóc sức khỏe (tại nhà), bao

gồm thử nghiệm dòng chảy bên (xem dưới đây) tương tự với thử thai tại nhà. Các thử nghiệm này có thể được đóng gói ở dạng bộ kit với các chất phản ứng thích hợp và hướng dẫn sử dụng để cho phép sử dụng bởi đối tượng là thành viên trong gia đình.

Một số phương pháp phát hiện miễn dịch bao gồm có thể kể đến một vài như là thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm đo phóng xạ miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm phát quang hóa học, thử nghiệm phát quang sinh học, và thẩm tách western. Cụ thể là, thử nghiệm cạnh tranh để phát hiện và định lượng kháng thể SARS-CoV-2 được định hướng đến epitop ký sinh trùng đặc hiệu trong các mẫu cũng được đề xuất. Các bước của các phương pháp phát hiện miễn dịch hữu dụng khác nhau đã được mô tả trong tài liệu khoa học, chẳng hạn như, *ví dụ như*, Doolittle and Ben-Zeev (1999), Gulbis and Galand (1993), De Jager *et al.* (1993), và Nakamura *et al.* (1987). Nhìn chung, phương pháp liên kết miễn dịch bao gồm việc thu lấy mẫu bị nghi ngờ chứa SARS-CoV-2, và cho mẫu tiếp xúc với kháng thể thứ nhất theo sáng chế, như trường hợp có thể là, dưới điều kiện hữu hiệu để cho phép sự tạo thành của phức hợp miễn dịch.

Các phương pháp này bao gồm phương pháp tinh chế SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên liên quan từ mẫu. Kháng thể tốt hơn là được liên kết với giá đỡ rắn, chẳng hạn như ở dạng chất nền cột, và mẫu bị nghi ngờ chứa SARS-CoV-2 hoặc thành phần kháng nguyên sẽ được cho vào kháng thể đã được giữ cố định. Các thành phần không mong muốn sẽ được rửa ra khỏi cột, để lại kháng nguyên SARS-CoV-2 được tạo phức hợp miễn dịch với kháng thể đã được giữ cố định, mà sau đó được thu thập bằng cách lấy sinh vật này hoặc kháng nguyên từ cột.

Phương pháp liên kết miễn dịch còn bao gồm phương pháp để phát hiện và định lượng lượng SARS-CoV-2 hoặc các thành phần liên quan trong mẫu và phát hiện và định lượng phức hợp miễn dịch bất kỳ được tạo thành trong quy trình liên kết. Ở đây, người ta sẽ thu lấy mẫu bị nghi ngờ chứa SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên của nó và cho mẫu tiếp xúc với kháng thể mà liên kết SARS-CoV-2 hoặc các thành phần của chúng, sau đó là phát hiện và định lượng lượng phức hợp miễn dịch được tạo thành dưới điều kiện đặc hiệu. Về sự phát hiện kháng nguyên, mẫu sinh học được phân tích có thể là mẫu bất kỳ mà bị nghi ngờ chứa SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên SARS-CoV-2, chẳng hạn như phân hoặc mẫu vật mô, dịch chiết mô đã được đồng nhất hóa,

dịch sinh học, bao gồm máu và huyết thanh, hoặc chất tiết, chẳng hạn như phân hoặc nước tiểu.

Cho mẫu sinh học đã được chọn tiếp xúc với kháng thể dưới điều kiện hữu hiệu và trong khoảng thời gian đủ để cho phép sự tạo thành của phức hợp miễn dịch (phức hợp miễn dịch sơ cấp) thường là vấn đề bổ sung đơn giản hợp phần kháng thể vào mẫu và ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian đủ dài cho kháng thể tạo thành phức hợp miễn dịch với, *tức là*, để liên kết với SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên có mặt. Sau thời gian này, hợp phần mẫu-kháng thể, chẳng hạn như phần mô, đĩa ELISA, thẩm tách điểm hoặc thẩm tách Western, thường được rửa để loại bỏ bất kỳ loại kháng thể nào không liên kết đặc hiệu, chỉ cho phép kháng thể đã liên kết đặc hiệu ở trong phức hợp miễn dịch sơ cấp được phát hiện.

Nhìn chung, sự phát hiện của sự tạo thành phức hợp miễn dịch được biết rõ trong lĩnh vực và có thể đạt được thông qua việc sử dụng nhiều phương pháp. Các phương pháp này thường dựa trên sự phát hiện nhãn hoặc chỉ thị, chẳng hạn như đuôi bất kỳ trong số các đuôi có hoạt tính phóng xạ, huỳnh quang, sinh học và enzym. Các bằng sáng chế đề cập đến việc sử dụng các nhãn này bao gồm các Bằng Sáng Chế Mỹ 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 và 4,366,241. Tất nhiên, người ta có thể phát hiện thấy các ưu điểm khác thông qua việc sử dụng phối tử liên kết thứ cấp chẳng hạn như kháng thể thứ hai và/hoặc sự sắp xếp liên kết phối tử biotin/avidin, như đã biết trong lĩnh vực.

Bản thân kháng thể được sử dụng trong việc phát hiện có thể được liên kết với nhãn có thể phát hiện được, trong đó người ta sau đó đơn giản là phát hiện nhãn này, bởi nó cho phép lượng của phức hợp miễn dịch sơ cấp trong hợp phần được xác định. Theo cách khác, kháng thể thứ nhất mà trở nên được liên kết ở trong phức hợp miễn dịch sơ cấp có thể được phát hiện bằng phối tử liên kết thứ hai mà có ái lực liên kết đối với kháng thể. Trong các trường hợp này, phối tử liên kết thứ hai có thể được liên kết với nhãn có thể phát hiện được. Bản thân phối tử liên kết thứ hai thường là kháng thể, mà có thể do đó được gọi là kháng thể "thứ cấp". Phức hợp miễn dịch sơ cấp được cho tiếp xúc với phối tử, hoặc kháng thể, liên kết thứ cấp, đã được gắn nhãn, dưới điều kiện hữu hiệu và trong khoảng thời gian đủ để cho phép sự tạo thành của thứ cấp phức hợp miễn dịch. Sau đó phức hợp miễn dịch thứ cấp thường được rửa để loại bỏ kháng

thể hoặc phối tử được gắn nhãn thứ cấp không liên kết đặc hiệu bất kỳ, và sau đó nhãn vẫn còn ở lại trong thứ cấp phức hợp miễn dịch được phát hiện.

Các phương pháp khác bao gồm sự phát hiện của phức hợp miễn dịch sơ cấp bằng phương pháp hai bước. Phối tử liên kết thứ hai, chẳng hạn như kháng thể mà có ái lực liên kết đối với kháng thể, được sử dụng để tạo thành thứ cấp phức hợp miễn dịch, như mô tả ở trên. Sau khi rửa, phức hợp miễn dịch thứ cấp được cho tiếp xúc với phối tử hoặc kháng thể liên kết thứ ba mà có ái lực liên kết đối với kháng thể thứ hai, cũng dưới điều kiện hữu hiệu và trong khoảng thời gian đủ để cho phép sự tạo thành của phức hợp miễn dịch (phức hợp miễn dịch bậc ba). Phối tử hoặc kháng thể thứ ba được liên kết với nhãn có thể phát hiện được, cho phép phát hiện phức hợp miễn dịch bậc ba đã được tạo thành như vậy. Hệ thống này có thể tạo ra sự khuếch đại tín hiệu nếu muốn.

Một phương pháp phát hiện miễn dịch sử dụng hai kháng thể khác nhau. Kháng thể đã được biotinyl hóa thứ nhất được sử dụng để phát hiện kháng nguyên đích, và sau đó kháng thể thứ hai được sử dụng để phát hiện biotin được gắn vào biotin đã được tạo phức hợp. Trong phương pháp này, mẫu cần thử nghiệm trước hết được ủ trong dung dịch chứa kháng thể bước thứ nhất. Nếu kháng nguyên đích có mặt, một số kháng thể liên kết với kháng nguyên để tạo thành phức hợp kháng thể đã được biotinyl hóa/kháng nguyên. Sau đó phức hợp kháng thể/kháng nguyên được khuếch đại bằng cách ủ các dung dịch liên tiếp của streptavidin (hoặc avidin), ADN đã được biotinyl hóa, và/hoặc ADN đã được biotinyl hóa bổ sung, với mỗi bước bổ sung thêm các vị trí biotin vào phức hợp kháng thể/kháng nguyên. Các bước khuếch đại được lặp lại đến khi đạt được mức độ khuếch đại thích hợp, tại thời điểm đó mẫu được ủ trong dung dịch chứa kháng thể bước thứ hai chống lại biotin. Kháng thể bước thứ hai này được gắn nhãn, ví dụ như, với enzym mà có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của phức hợp kháng thể/kháng nguyên bằng mô enzym học sử dụng cơ chất sinh màu. Với sự khuếch đại thích hợp, thể liên hợp có thể được sản xuất mà có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Phương pháp phát hiện miễn dịch đã biết khác có ưu điểm của phương pháp immuno-PCR (phản ứng chuỗi polymeraza). Phương pháp PCR này tương tự với phương pháp Cantor về việc ủ với ADN đã được biotinyl hóa, tuy nhiên, thay vì sử dụng nhiều chu kỳ ủ streptavidin và ADN đã được biotinyl hóa, phức hợp

ADN/biotin/streptavidin/kháng thể được rửa sạch với chất đệm độ pH thấp hoặc muối cao mà giải phóng kháng thể. Sau đó dung dịch rửa thu được được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR với các đoạn môi thích hợp với các đối chứng thích hợp. Ít nhất là về lý thuyết, khả năng khuếch đại lớn và độ đặc hiệu của PCR có thể được sử dụng để phát hiện phân tử kháng nguyên đơn lẻ.

A. ELISA

Thử nghiệm miễn dịch, theo nghĩa trực tiếp và đơn giản nhất của chúng, là thử nghiệm liên kết. Các thử nghiệm miễn dịch được ưu tiên nhất định là các loại khác nhau của thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) đã biết trong lĩnh vực. Sự phát hiện hóa mô miễn dịch sử dụng phân mô cũng đặc biệt hữu dụng. Tuy nhiên, dễ dàng hiểu rõ rằng sự phát hiện này không bị giới hạn ở các kỹ thuật này, và thâm tách western, thâm tách điểm, phân tích FACS, và dạng tương tự cũng có thể được sử dụng.

Trong một ELISA ví dụ, kháng thể theo sáng chế được giữ cố định trên bề mặt được chọn thể hiện ái lực protein, chẳng hạn như giếng trong đĩa vi chuẩn độ polystyren. Sau đó, hợp phần thử nghiệm bị nghi ngờ chứa SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên SARS-CoV-2 được bổ sung vào các giếng. Sau khi liên kết và rửa để loại bỏ không liên kết đặc hiệu phức hợp miễn dịch, kháng nguyên đã được liên kết có thể được phát hiện. Sự phát hiện có thể đạt được bằng cách bổ sung kháng thể kháng SARS-CoV-2 khác mà được liên kết với nhãn có thể phát hiện được. Kiểu ELISA này là "ELISA kẹp" đơn giản. Sự phát hiện cũng có thể đạt được bằng cách bổ sung kháng thể kháng SARS-CoV-2 thứ hai, sau đó là bổ sung kháng thể thứ ba mà có ái lực liên kết đối với kháng thể thứ hai, với kháng thể thứ ba được liên kết với nhãn có thể phát hiện được.

Trong ELISA ví dụ khác, các mẫu bị nghi ngờ chứa SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên SARS-CoV-2 được giữ cố định lên trên bề mặt giếng và sau đó được cho tiếp xúc với kháng thể kháng SARS-CoV-2 theo sáng chế. Sau khi liên kết và rửa để loại bỏ không liên kết đặc hiệu phức hợp miễn dịch, kháng thể kháng SARS-CoV-2 đã liên kết được phát hiện. Khi kháng thể kháng SARS-CoV-2 ban đầu được liên kết với nhãn có thể phát hiện được, phức hợp miễn dịch có thể được phát hiện một cách trực tiếp.

Một lần nữa, phức hợp miễn dịch có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai mà có ái lực liên kết đối với kháng thể kháng SARS-CoV-2 thứ nhất, với kháng thể thứ hai được liên kết với nhãn có thể phát hiện được.

Bất kể định dạng nào được sử dụng, ELISA có các dấu hiệu nhất định chung, chẳng hạn như phủ, ủ và liên kết, rửa để loại bỏ các loại không liên kết đặc hiệu, và phát hiện phức hợp miễn dịch đã liên kết. Chúng được mô tả dưới đây.

Trong việc phủ đĩa bằng kháng nguyên hoặc kháng thể, người ta thường ủ các giếng của đĩa với dung dịch của kháng nguyên hoặc kháng thể, qua đêm hoặc trong khoảng thời gian xác định tính theo giờ. Sau đó các giếng của đĩa được rửa để loại bỏ nguyên liệu hấp thụ không hoàn toàn. Sau đó bề mặt sẵn sàng còn lại bất kỳ của các giếng "được phủ" bằng protein không đặc hiệu mà trung tính về tính kháng nguyên đối với kháng huyết thanh thử nghiệm. Chúng bao gồm albumin huyết thanh bò (BSA), casein hoặc dung dịch bột sữa. Việc phủ cho phép phong bế các vị trí hấp thụ không đặc hiệu trên bề mặt đã cố định và do đó làm giảm mức nền gây ra bởi sự liên kết không đặc hiệu của kháng huyết thanh trên bề mặt.

Trong ELISA, có khả năng tùy chỉnh nhiều hơn để sử dụng phương thức phát hiện bậc hai hoặc bậc ba chứ không phải quy trình trực tiếp. Do đó, sau sự liên kết của protein hoặc kháng thể với giếng, phủ bằng nguyên liệu không phản ứng để làm giảm mức nền, và rửa để loại bỏ nguyên liệu không liên kết, bề mặt đã cố định được cho tiếp xúc với mẫu sinh học cần được thử nghiệm dưới điều kiện hữu hiệu để cho phép tạo thành phức hợp miễn dịch (kháng nguyên/kháng thể). Sự phát hiện của phức hợp miễn dịch sau đó đòi hỏi phối tử hoặc kháng thể liên kết thứ cấp được gắn nhãn, và phối tử hoặc kháng thể liên kết thứ cấp kết hợp với kháng thể bậc ba được gắn nhãn hoặc phối tử liên kết thứ ba.

"Dưới điều kiện hữu hiệu để cho phép tạo thành phức hợp miễn dịch (kháng nguyên/kháng thể)" có nghĩa là các điều kiện tốt hơn là bao gồm việc pha loãng kháng nguyên và/hoặc kháng thể bằng các dung dịch chẳng hạn như BSA, globulin gamma bò (BGG) hoặc nước muối đệm photphat (PBS)/Tween. Các tác nhân bổ sung này cũng có xu hướng hỗ trợ trong việc làm giảm mức nền không đặc hiệu.

Các điều kiện "thích hợp" cũng có nghĩa là việc ủ ở nhiệt độ hoặc trong khoảng thời gian đủ để cho phép liên kết hiệu quả. Các bước ủ thường là từ khoảng 1 đến 2

đến 4 giờ hoặc tương tự, ở nhiệt độ tốt hơn là trên mức từ 25°C đến 27°C, hoặc có thể là qua đêm ở nhiệt độ khoảng 4°C hoặc tương tự.

Sau tất cả các bước ủ trong ELISA, bề mặt đã tiếp xúc được rửa để loại bỏ nguyên liệu không được tạo phức hợp. Quy trình rửa được ưu tiên bao gồm rửa bằng dung dịch chẳng hạn như PBS/Tween, hoặc chất đệm borat. Sau khi tạo thành phức hợp miễn dịch đặc hiệu giữa mẫu thử nghiệm và nguyên liệu đã liên kết ban đầu, và bước rửa tiếp theo, sự xuất hiện của thậm chí là lượng phớt của phức hợp miễn dịch có thể được xác định.

Để tạo ra phương thức phát hiện, kháng thể thứ hai hoặc thứ ba có nhãn kết hợp để cho phép phát hiện. Tốt hơn là, nó là enzyme mà tạo ra sự phát triển màu khi ủ với cơ chất sinh màu thích hợp. Do đó, ví dụ như, người ta muốn cho tiếp xúc hoặc ủ các phức hợp miễn dịch thứ nhất và thứ hai với kháng thể đã liên hợp ureaza, glucoza oxidaza, phosphataza kiềm hoặc hydro peroxidaza trong khoảng thời gian và dưới điều kiện mà có thiên hướng phát triển sự tạo thành phức hợp miễn dịch hơn nữa (*ví dụ như*, ủ trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong dung dịch chứa PBS chẳng hạn như PBS-Tween).

Sau khi ủ với kháng thể đã gắn nhãn, và tiếp đó rửa để loại bỏ nguyên liệu không liên kết, lượng nhãn được định lượng, *ví dụ như*, bằng cách ủ với cơ chất sinh màu chẳng hạn như ure, hoặc màu tím bromocresol, hoặc axit 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonic (ABTS), hoặc H_2O_2 , trong trường hợp của peroxidaza làm nhãn enzyme. Sau đó sự định lượng đạt được bằng cách đo mức độ màu được tạo ra, *ví dụ như*, sử dụng máy đo quang phổ ở phổ nhìn thấy.

Theo phương án khác, sáng chế dự tính việc sử dụng các định dạng cạnh tranh. Điều này đặc biệt hữu dụng trong sự phát hiện kháng thể SARS-CoV-2 trong mẫu. Trong thử nghiệm dựa trên sự cạnh tranh, lượng chưa biết của chất phân tích hoặc kháng thể được xác định bằng khả năng của nó để chiếm chỗ lượng đã biết của kháng thể đã gắn nhãn hoặc chất phân tích. Do đó, sự mất đi có thể định lượng của tín hiệu là dấu hiệu chỉ ra lượng kháng thể hoặc chất phân tích chưa biết trong mẫu.

Ở đây, tác giả sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đơn dòng SARS-CoV-2 đã gắn nhãn để xác định lượng của kháng thể SARS-CoV-2 trong mẫu. Định dạng cơ bản bao gồm bước cho lượng đã biết của kháng thể đơn dòng SARS-CoV-2 (được liên

kết với nhãn có thể phát hiện được) tiếp xúc với kháng nguyên hoặc hạt SARS-CoV-2. Kháng nguyên hoặc sinh vật SARS-CoV-2 tốt hơn là được gắn vào giá đỡ. Sau sự liên kết của kháng thể đơn dòng đã gắn nhãn vào giá đỡ, mẫu được bổ sung và được ủ dưới điều kiện cho phép kháng thể không gắn nhãn bất kỳ trong mẫu cạnh tranh với, và do đó chiếm chỗ, kháng thể đơn dòng đã gắn nhãn. Bằng cách đo nhãn bị mất đi hoặc nhãn còn lại (và trừ nó đi từ lượng ban đầu của nhãn đã liên kết), người ta có thể xác định có bao nhiêu kháng thể không gắn nhãn được liên kết với giá đỡ, và do đó có bao nhiêu kháng thể có mặt trong mẫu.

B. Thẩm Tách Western

Thẩm tách Western (theo cách khác, thẩm tách miễn dịch protein) là kỹ thuật phân tích được sử dụng để phát hiện các protein đặc hiệu trong mẫu nhất định của dịch đồng nhất hoặc dịch chiết mô. Nó sử dụng điện di trên gel để tách protein tự nhiên hoặc biến tính theo chiều dài của polypeptit (các điều kiện làm biến tính) hoặc theo cấu trúc 3-D của protein (các điều kiện tự nhiên/không biến tính). Sau đó các protein được chuyển vào màng (thường là nitrocellulose hoặc PVDF), trong đó chúng được dò (được phát hiện) bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu đối với protein đích.

Các mẫu có thể được lấy từ mô hoàn chỉnh hoặc từ môi trường nuôi cấy tế bào. Trong hầu hết các trường hợp, mô rắn trước hết bị phá vỡ cơ học bằng cách sử dụng máy pha trộn (cho thể tích mẫu lớn hơn), sử dụng máy đồng nhất hóa (thể tích nhỏ hơn), hoặc bằng cách nghiền siêu âm. Tế bào cũng có thể được phá vỡ mở ra bằng một trong các phương pháp cơ học nêu trên. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng các mẫu vi khuẩn, virus hoặc môi trường có thể là nguồn protein và do đó thẩm tách Western không bị giới hạn chỉ ở nghiên cứu tế bào. Các loại chất tẩy tạp, muối, và chất đệm có thể được sử dụng để giúp cho sự dung giải của các tế bào và để làm tan protein. Chất ức chế proteaza và phosphatase thường được bổ sung để ngăn chặn sự phân cắt của mẫu bằng enzym của bản thân nó. Việc chuẩn bị mô thường được thực hiện ở nhiệt độ lạnh để tránh làm biến tính protein.

Các protein của mẫu được tách bằng cách sử dụng điện di trên gel. Việc tách protein có thể là theo điểm đẳng điện (pI), khối lượng phân tử, điện tích, hoặc dạng kết hợp của các yếu tố này. Bản chất của việc tách phụ thuộc vào việc xử lý mẫu và bản

chất của gel. Đây là cách rất hữu dụng để xác định protein. Cũng có thể sử dụng gel hai chiều (2-D) mà làm lan các protein từ mẫu đơn lẻ ra hai chiều. Protein được tách theo điểm đẳng điện (độ pH mà tại đó chúng có điện tích toàn phần trung tính) ở chiều thứ nhất, và theo khối lượng phân tử của chúng ở chiều thứ hai.

Để tạo ra các protein có thể tiếp cận được để phát hiện kháng thể, chúng được di chuyển từ trong gel lên trên màng làm bằng nitroxenluloza hoặc polyvinyliden diflorua (PVDF). Màng được đặt lên phía trên gel, và chồng giấy lọc được đặt lên trên nó. Toàn bộ chồng này được đặt trong dung dịch đệm mà di chuyển lên trên giấy bằng tác động của mao dẫn, mang các protein theo nó. Phương pháp khác để chuyển các protein được gọi là thẩm tách điện và sử dụng dòng điện để kéo protein từ gel vào màng PVDF hoặc nitroxenluloza. Các protein di chuyển từ ở trong gel lên trên màng trong khi duy trì sự tổ chức mà chúng có ở trong gel. Kết quả của quy trình thẩm tách này là, các protein được lộ ra trên lớp bề mặt mỏng để phát hiện (xem dưới đây). Cả hai loại màng này được chọn vì tính chất liên kết protein không đặc hiệu của chúng (*tức là*, liên kết với tất cả protein ngang bằng nhau). Sự liên kết protein được dựa trên sự tương tác kỵ nước, cũng như là sự tương tác tích điện giữa màng và protein. Màng nitroxenluloza rẻ hơn PVDF nhưng dễ vỡ hơn nhiều và không đứng thẳng tốt cho việc dò lặp đi lặp lại. Tính đồng đều và hiệu quả tổng thể của việc chuyển protein từ gel sang màng có thể được kiểm tra bằng cách nhuộm màu màng bằng các thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue hoặc Ponceau S. Khi đã được chuyển, protein được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể sơ cấp đã gắn nhãn, hoặc kháng thể sơ cấp không gắn nhãn sau đó là sự phát hiện gián tiếp bằng cách sử dụng protein A đã gắn nhãn hoặc kháng thể đã gắn nhãn thứ cấp liên kết với vùng Fc của kháng thể sơ cấp.

C. Thử Nghiệm Dòng Chảy Bên

Thử nghiệm dòng chảy bên, còn gọi là thử nghiệm sắc ký miễn dịch dòng chảy bên, là thiết bị đơn giản được dự định để phát hiện sự có mặt (hoặc không có mặt) của chất phân tích đích trong mẫu (chất nền) mà không có nhu cầu về thiết bị chuyên dụng và đắt tiền, dù nhiều ứng dụng dựa trên phòng thí nghiệm tồn tại mà được hỗ trợ bởi thiết bị đọc. Thông thường, các thử nghiệm này được sử dụng làm chẩn đoán y tế cần

ít tài nguyên, để thử nghiệm tại nhà, điểm thử nghiệm chăm sóc, hoặc sử dụng trong phòng thí nghiệm. Ứng dụng phổ biến và đã được biết rõ là thử thai tại nhà.

Công nghệ này dựa trên dây tăng mao dẫn, chẳng hạn như mẫu giấy xốp hoặc polyme thiêu kết. Mỗi thành phần này có khả năng vận chuyển dịch lỏng (ví dụ như, nước tiểu) tự phát. Thành phần thứ nhất (miếng đệm mẫu) hoạt động như là bộ biển và giữ lượng dư của dịch mẫu. Khi được nhúng, dịch này di chuyển sang thành phần thứ hai (miếng đệm liên hợp) trong đó nhà sản xuất đã lưu trữ cái gọi là thể liên hợp, định dạng khô của hạt có hoạt tính sinh học (xem dưới đây) trong chất nền muối-đường mà chứa mọi thứ để bảo đảm phản ứng hóa học tối ưu giữa phân tử đích (ví dụ như, kháng nguyên) và đối tác hóa học của nó (ví dụ như, kháng thể) mà đã được giữ cố định trên bề mặt của hạt. Trong khi dịch mẫu hòa tan chất nền muối-đường, nó cũng hòa tan hạt và trong một tác động vận chuyển kết hợp mẫu và thể liên hợp trộn lẫn trong khi chảy qua cấu trúc xốp này. Theo cách này, chất phân tích liên kết với hạt trong khi di chuyển tiếp qua tầng mao dẫn thứ ba. Nghiên liệu này có một hoặc nhiều khu vực (thường được gọi là dải) trong đó phân tử thứ ba đã được giữ cố định bởi nhà sản xuất. Khi mà hỗn hợp mẫu-thể liên hợp đến được các dải này, chất phân tích được liên kết trên hạt và phân tử 'bắt giữ' thứ ba liên kết phức hợp. Sau một lúc, khi ngày càng nhiều dịch lỏng đi qua dải, hạt tích tụ và khu vực dải đổi màu. Thông thường có ít nhất là hai dải: một dải (đối chứng) mà bắt giữ hạt bất kỳ và nhờ đó cho thấy rằng điều kiện phản ứng và công nghệ hoạt động tốt, dải thứ hai chứa phân tử bắt giữ đặc hiệu và chỉ bắt giữ các hạt mà phân tử chất phân tích đã được giữ cố định trên đó. Sau khi đi qua khu vực phản ứng, dịch lỏng đi vào nguyên liệu xốp cuối cùng – bắc – mà hoạt động đơn giản như là vật chứa rác thải. Thử Nghiệm Dòng Chảy Bên có thể hoạt động như là thử nghiệm cạnh tranh hoặc kẹp. Thử nghiệm dòng chảy bên được bộc lộ trong Bằng Sáng Chế Mỹ 6,485,982.

D. Hóa Mô Miễn Dịch

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với cả hai khối mô được kết đông tươi và/hoặc được cố định trong formalin, được nhúng parafin được điều chế để nghiên cứu bằng hóa mô miễn dịch (immunohistochemistry - IHC). Phương pháp điều chế các khối mô từ mẫu vật dạng hạt này đã được sử dụng thành

công trong các nghiên cứu IHC trước đây của các yếu tố tiên lượng khác nhau và đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

Một cách vắn tắt, các phần kết đông có thể được điều chế bằng cách khử nước 50 ng mô kết đông "đã được tán thành bột" ở nhiệt độ trong phòng trong nước muối đệm photphat (PBS) trong các viên nang nhựa nhỏ; tạo viên hạt bằng ly tâm; tái tạo huyền phù chúng trong môi trường nhúng nhót (OCT); lộn ngược viên nang và/hoặc tạo viên lại bằng ly tâm; kết đông nhanh trong isopentan -70°C; cắt viên nang nhựa và/hoặc loại bỏ xy lanh đã kết đông của mô; kẹp chặt xy lanh mô trên đồ kẹp vi phẫu điều lạnh; và/hoặc cắt 25-50 phần nối tiếp từ viên nang. Theo cách khác, các mẫu mô kết đông toàn phần có thể được sử dụng để cắt các phần theo dãy.

Các phần lâu bền có thể được điều chế bằng phương pháp tương tự gồm sự khử nước của 50 mg mẫu trong vi ống ly tâm nhựa; tạo viên; tái tạo huyền phù trong formalin 10% để cố định trong 4 giờ; rửa/tạo viên; tái tạo huyền phù trong aga 2,5% ẩm; tạo viên; làm lạnh trong nước đá để làm cứng aga; loại bỏ khối mô/aga khỏi ống; làm thâm nhập và/hoặc nhúng khối này trong parafin; và/hoặc cắt lên đến 50 phần lâu bền theo dãy. Một lần nữa, các mẫu mô hoàn chỉnh có thể được thay thế.

E. Bộ Kit Phát Hiện Miễn Dịch

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến bộ kit phát hiện miễn dịch để sử dụng với phương pháp phát hiện miễn dịch được mô tả ở trên. Khi kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên SARS-CoV-2, kháng thể có thể được bao gồm trong bộ kit. Do đó bộ kit phát hiện miễn dịch có chứa, trong phương tiện vật chứa thích hợp, kháng thể thứ nhất mà liên kết với SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên SARS-CoV-2, và một cách tùy ý chất phản ứng phát hiện miễn dịch.

Theo phương án nhất định, kháng thể SARS-CoV-2 có thể được liên kết trước với giá đỡ rắn, chẳng hạn như cột chất nền và/hoặc giếng của đĩa vi chuẩn độ. Chất phản ứng phát hiện miễn dịch của bộ kit có thể có dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, bao gồm các nhãn có thể phát hiện được mà được kết hợp với hoặc được liên kết với kháng thể được đề xuất. Nhãn có thể phát hiện được mà được kết hợp với hoặc được

gắn vào phôi tử liên kết thứ cấp cũng được tự tính. Phôi tử thứ cấp ví dụ là kháng thể thứ cấp mà có ái lực liên kết đối với kháng thể thứ nhất.

Chất phản ứng phát hiện miễn dịch thích hợp khác để sử dụng trong bộ kit này bao gồm chất phản ứng hai thành phần mà có chứa kháng thể thứ cấp mà có ái lực liên kết đối với kháng thể thứ nhất, cùng với kháng thể thứ ba mà có ái lực liên kết đối với kháng thể thứ hai, kháng thể thứ ba được liên kết với nhãn có thể phát hiện được. Như lưu ý ở trên, nhiều nhãn ví dụ đã được biết đến trong lĩnh vực và tất cả các nhãn này có thể được sử dụng cho sáng chế.

Bộ kit có thể còn chứa hợp phần được lấy phần phân ước thích hợp của SARS-CoV-2 hoặc kháng nguyên SARS-CoV-2, dù được gắn nhãn hay không được gắn nhãn, như có thể được sử dụng để điều chế đường cong tiêu chuẩn cho thử nghiệm phát hiện. Bộ kit có thể chứa thể liên hợp kháng thể-nhãn ở dạng được liên hợp đầy đủ, ở dạng hợp chất trung gian, hoặc dưới dạng các gốc riêng rẽ cần được liên hợp bởi người sử dụng của bộ kit. Các thành phần của bộ kit có thể được đóng gói trong môi trường nước hoặc ở dạng khô lạnh.

Các phương tiện chứa của các bộ kit thường bao gồm ít nhất là một lọ, ống nghiệm, bình thót cổ, chai, xylanh hoặc các phương tiện chứa khác, mà trong đó kháng thể có thể được đặt vào, hoặc tốt hơn là, được phân ước một cách thích hợp. Bộ kit theo sáng chế cũng thường bao gồm các phương tiện chứa kháng thể, kháng nguyên và các vật chứa chất phản ứng khác bất kỳ trong sự bao kín để bán trên thị trường. Các vật chứa này có thể bao gồm vật chứa dạng tiêm hoặc các vật chứa nhựa ép khuôn thổi mà lọ mong muốn được giữ lại trong đó.

F. Thử Nghiệm Kiểm Soát Chất Lượng Vắc Xin Và Kháng Nguyên

Sáng chế cũng bao hàm việc sử dụng kháng thể và mảnh kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc đánh giá tính toàn vẹn kháng nguyên của kháng nguyên virus trong mẫu. Các sản phẩm sinh y như vắc xin khác với thuốc hóa học trong đó chúng không thể được xác định đặc điểm phân tử một cách bình thường; kháng thể là phân tử lớn có độ phức tạp đáng kể và có khả năng thay đổi nhiều từ lần điều chế này sang lần điều chế khác. Chúng cũng được dùng cho cá thể khỏe mạnh, bao gồm trẻ em khi bắt đầu cuộc sống, và do đó cần phải nhấn mạnh rằng chất

lượng của chúng phải được đảm bảo, đến mức độ lớn nhất có thể, mà chúng có hiệu quả trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh đe dọa tính mạng, mà mà không gây hại cho bản thân chúng.

Sự toàn cầu hóa ngày càng tăng trong sản xuất và phân phối vắc xin đã mở ra các khả năng mới để quản lý tốt hơn các quan ngại y tế cộng đồng nhưng cũng làm nảy sinh các câu hỏi về sự tương đương và khả năng thay thế lẫn nhau của các vắc xin tìm được bằng nhiều nguồn khác nhau. Sự tiêu chuẩn hóa quốc tế của nguyên liệu bắt đầu, của thử nghiệm sản xuất và kiểm soát chất lượng, và việc đặt ra kỳ vọng cao về giám sát quản lý về cách mà các sản phẩm này được sản xuất và được sử dụng, do đó đặt nền tảng cho sự thành công liên tục. Nhưng nó vẫn là lĩnh vực thay đổi không ngừng, và các tiến bộ kỹ thuật liên tục trong lĩnh vực mang lại hứa hẹn cho việc phát triển các vũ khí mới hiệu nghiệm chống lại các đe dọa y tế công cộng cũ, cũng như là các đe dọa y tế công cộng mới - bệnh sốt rét, dịch cúm, và HIV, chỉ kể tên một số ít - nhưng cũng đặt ra áp lực lớn cho các nhà sản xuất, các cơ quan quản lý, và cộng đồng y tế rộng hơn để đảm bảo rằng các sản phẩm tiếp tục đáp ứng tiêu chuẩn cao nhất về chất lượng có thể đạt được.

Do đó, người ta có thể thu được kháng nguyên hoặc vắc xin từ nguồn bất kỳ hoặc ở điểm bất kỳ trong quy trình sản xuất. Do đó quy trình kiểm soát chất lượng có thể bắt đầu với việc điều chế mẫu cho thử nghiệm miễn dịch mà xác định sự liên kết của kháng thể hoặc mảnh được bộc lộ ở đây với kháng nguyên virus. Thử nghiệm miễn dịch này được bộc lộ ở chỗ khác trong tài liệu này, và thử nghiệm bất kỳ trong số chúng có thể được sử dụng để đánh giá tính toàn vẹn cấu trúc/tính kháng nguyên của kháng nguyên. Tiêu chuẩn để tìm kiếm mẫu chứa lượng chấp nhận được của kháng nguyên nguyên vẹn và đúng về tính kháng nguyên có thể được thiết lập bởi các cơ quan quản lý.

Phương án quan trọng khác trong đó tính toàn vẹn kháng nguyên được đánh giá là xác định tuổi thọ và độ ổn định lưu trữ. Hầu hết các thuốc, bao gồm vắc xin, có thể hư hỏng theo thời gian. Do đó, điều quan trọng để xác định, theo thời gian, kháng nguyên, chẳng hạn như trong vắc xin, có bị thoái biến hoặc mất ổn định đến mức độ mà nó không còn có tính kháng nguyên và/hoặc có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch khi được dùng cho đối tượng. Một lần nữa, tiêu chuẩn để tìm kiếm mẫu chứa lượng

chấp nhận được của kháng nguyên nguyên vẹn về tính kháng nguyên có thể được thiết lập bởi các cơ quan quản lý.

Theo phương án nhất định, các kháng nguyên virus có thể chứa hơn một epitop bảo vệ. Trong các trường hợp này, nó có thể chứng tỏ là hữu dụng để sử dụng các thử nghiệm mà xem xét sự liên kết của hơn một kháng thể, chẳng hạn như 2, 3, 4, 5 hoặc thậm chí là nhiều kháng thể hơn. Các kháng thể này liên kết với các epitop có quan hệ gần gũi, sao cho chúng liên kết hoặc thậm chí là gói lên nhau. Mặt khác, chúng có thể thể hiện các epitop khác biệt từ các phần khác hần của kháng nguyên. Bằng cách đánh giá tính toàn vẹn của nhiều epitop, ảnh hưởng chính hơn của tính toàn vẹn tổng thể của kháng nguyên, và do đó khả năng để tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ, có thể được xác định.

Kháng thể và các mảnh của chúng như mô tả trong sáng chế cũng có thể được sử dụng trong bộ kit để theo dõi hiệu quả của quy trình chủng ngừa bằng cách phát hiện sự có mặt của kháng thể SARS-CoV-2 bảo vệ. Kháng thể, mảnh kháng thể, hoặc biến thể và dẫn xuất của chúng, như mô tả trong sáng chế cũng có thể được sử dụng trong bộ kit để theo dõi sự sản xuất vắc xin với khả năng gây miễn dịch mong muốn.

G. Ví Dụ Thực Hiện Sáng Chế

Các ví dụ sau đây được bao gồm để chứng minh các phương án được ưu tiên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nên hiểu rõ rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ sau đây là theo các kỹ thuật tiêu biểu được phát hiện bởi tác giả sáng chế để thực hiện tốt chức năng trong thực hành các phương án, và do đó có thể được xem là thiết lập các phương thức ưu tiên để thực hành nó. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nên, dựa trên bản mô tả sáng chế này, hiểu rõ rằng nhiều sự thay đổi có thể được thực hiện trong các phương án cụ thể mà được bộc lộ và vẫn đạt được cùng kết quả hoặc kết quả tương tự mà không nằm ngoài tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1 – Tính Hiệp Đồng Kháng thể

Tính hiệp đồng được định nghĩa ở đây dưới dạng hoạt tính trung hòa cao hơn qua trung gian hỗn hợp của hai mAb khi được so sánh với mhoạt tính trung hòa qua trung gian mAb riêng lẻ ở cùng một tổng nồng độ (*in vitro*) hoặc liều lượng (*in vivo*) của kháng thể. Để đánh giá liệu hai mAb có hiệp đồng trong hỗn hợp để trung hòa SARS-CoV-2 hay không, tác giả sáng chế sử dụng phương pháp được báo cáo trước đây để định lượng tính hiệp đồng (Ianevski A, He L, Aittokallio T, Tang J. *Bioinformatics*. 33, 2413-2415, 2017). Để đánh giá mức ý nghĩa của tác dụng có lợi từ việc kết hợp các mAb, đáp ứng kết hợp được quan sát thấy (chất nền đáp ứng liều lượng) được so sánh với đáp ứng kỳ vọng được tính bằng mô hình tính điểm tính hiệp đồng (Ianevski A, He L, Aittokallio T, Tang J. *Bioinformatics*. 33, 2413-2415, 2017). Sự trung hòa virus được đo trong thử nghiệm xét nghiệm trung hòa làm giảm tập trung thông thường (FRNT) sử dụng SARS-CoV-2 kiểu đại và đơn lớp nuôi cấy tế bào Vero-E2. Các mAb riêng lẻ COV2-2196 và COV2-2130 được trộn ở các nồng độ khác nhau để đánh giá hoạt tính trung hòa của các tỉ lệ mAb khác nhau trong hỗn hợp. Đặc biệt là, mỗi dịch pha loãng bảy lần của mAb COV2-2130 (bắt đầu từ 500 ng/ml) được trộn với mỗi trong số chín dịch pha loãng của mAb COV2-2196 (bắt đầu từ 500 ng/ml) trong tổng thể tích 50 μ l của mỗi điều kiện và sau đó được ủ với 50 μ l SARS-CoV-2 sống trong môi trường nuôi cấy tế bào (môi trường RPMI-1640 có bổ sung với 2% FBS) trước khi cho vào tế bào Vero-E2 hợp lưu sinh trưởng trong đĩa 96 giếng. Các giá trị đối chứng bao gồm các giá trị đối với đáp ứng liều lượng của hoạt tính trung hòa được đo một cách riêng rẽ đối với các mAb riêng lẻ COV2-2196 và COV2-2130 mà được đánh giá ở cùng liều lượng như trong hỗn hợp (xem các HÌNH 1-3). Mỗi phép đo được thực hiện trong hai bản sao. Tác giả sáng chế tính tiếp phần trăm trung hòa virus đối với mỗi điều kiện và sau đó tính điểm của giá trị tính hiệp đồng, mà xác định sự tương tác giữa hai mAb này trong hỗn hợp là hiệp đồng (điểm của tính hiệp đồng = 17,4). Lưu ý, điểm của tính hiệp đồng nhỏ hơn -10 chỉ ra hiện tượng đối kháng, điểm từ -10 đến 10 chỉ ra tác dụng cộng gộp, và điểm lớn hơn 10 chỉ ra tác dụng hiệp đồng. Ví dụ trên các HÌNH 1-3 thể hiện chất nền đáp ứng liều lượng và chứng minh rằng liều lượng mAb kết hợp bằng 79 ng/ml trong hỗn hợp (16 ng/ml của COV2-2196 và 63 ng/ml của COV2-2130) có cùng hoạt tính như 250 ng/ml của mỗi

mAb riêng lẻ. Phát hiện này cho thấy rằng trong hỗn hợp liều lượng có thể được làm giảm hơn 3 lần để đạt được cùng hiệu lực trong sự trung hòa virus.

Để đánh giá hiệu quả điều trị của việc điều trị, các tác giả sáng chế trước hết thử nghiệm mAb COV2-2196 hoặc COV2-2130 hoặc dạng kết hợp 1:1 của chúng bằng cách sử dụng mô hình thử thách MA-SARS-CoV-2. Tất cả các phương pháp điều trị làm giảm virus lây nhiễm trong phổi như đo được bằng độ chuẩn mangan của mô phổi ở 2 ngày sau khi gây nhiễm virus. Việc điều trị bằng hỗn hợp được phân phối ở liều lượng bằng 400 µg/con chuột nhắt (~ 20 mg/kg) hiệu quả nhất, vì làm giảm đáng kể gánh nặng phổi lên đến 3×10^4 lần; 4 trong số 5 con từ nhóm điều trị này không còn có virus lây nhiễm trong phổi (HÌNH 4A). Tương tự, việc điều trị của chuột nhắt có phổi đã được tải nạp với adenovirus tái tổ hợp để biểu hiện thụ thể SARS-CoV-2 ACE2 người (AdV-hACE2) bằng 400 µg/con chuột nhắt của hỗn hợp mAb 12 giờ sau khi thử thách virus SARS-CoV-2 nguyên bản phát hiện ra sự trung hòa đầy đủ của virus lây nhiễm ở phổi *in vivo* (HÌNH 4B). Sự biểu hiện của các gen cytokin và chemokin INF-γ, IL-6, CXCL10 và CCL2, mà là chất chỉ thị của viêm, cũng được làm giảm ở phổi của chuột nhắt được điều trị bằng hỗn hợp mAb khi được so sánh với phổi của chuột nhắt được điều trị bằng đối chứng isotyp (HÌNH 4C). Các kết quả này cùng nhau gợi ý hiệu quả điều trị sau phơi nhiễm qua trung gian hỗn hợp của COV2-2196 + COV2-2130 trong mô hình thử thách SARS-CoV-2 chuột nhắt.

Ví dụ 2 - Nghiên Cứu Thử Thách Động Vật Linh Trưởng Không Phải Là Người

Sản xuất và tinh chế MAb. Các trình tự của mAb mà đã được tổng hợp (Twist Bioscience) và tách dòng vào vector biểu hiện đơn cistron IgG1 (được đặt tên là pTwist-mCis_G1) được sử dụng để tiết mAb trong nuôi cấy tế bào động vật có vú. Vector này chứa trình tự 2A được tăng cường và cầu nối GSG mà cho phép sự biểu hiện đồng thời của các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mAb từ cấu trúc đơn lẻ khi chuyển nạp¹. Các tác giả sáng chế được mô tả trước đây sự biểu hiện quy mô nhỏ của mAb trong 1 ml môi trường nuôi cấy ExpiCHO trong đĩa 96 giếng². Để biểu hiện mAb quy mô lớn hơn, các tác giả sáng chế thực hiện sự chuyển nạp (từ 1 đến 300 ml của mỗi kháng thể) của môi trường nuôi cấy tế bào CHO sử dụng Hệ Thống Biểu Hiện Gibco™ ExpiCHO™ và quy trình đối với ống bình phản ứng nhỏ 50 ml (Corning) như mô tả bởi nhà cung cấp. Dịch nổi bề mặt nuôi cấy được tinh chế bằng cách sử dụng HiTrap mAbselect SuRe (Cytiva, trước đây là GE Healthcare Life Sciences) trên hệ

thống sắc ký protein song song 24 cột (Protein BioSolutions). mAb đã được tinh chế được trao đổi chất đệm vào PBS, cô bằng cách sử dụng Đơn Vị Lọc Ly Tâm Amicon® Ultra-4 50KDa (Millipore Sigma) và lưu trữ ở nhiệt độ 4°C đến khi sử dụng. mAb đã được tinh chế được thử nghiệm đều đặn về hàm lượng nội độc tố mà được phát hiện là <1 EU/mg IgG đối với nghiên cứu NHP. Thử nghiệm nội độc tố được thực hiện bằng cách sử dụng hộp chứa PTS201F (Charles River), với độ nhạy nằm trong khoảng từ 10 đến 0,1 EU/ml, và thiết bị Endosafe Nexgen-MCS (Charles River).

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm hiệu quả bảo vệ của mAb bằng cách sử dụng mô hình thử thách động vật linh trưởng không phải là người (NHP) SARS-CoV-2 được mô tả gần đây^{3,4}. Đối với mô hình này, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm dưới dạng đơn trị liệu COV2-2196 mAb trung hòa được mã hóa bởi cùng đoạn gen biến đổi như COV2-2196 nhưng sử dụng nhiều sự khác biệt axit amin đáng chú ý trong HCDR3 và LCDR3. Các con vật nhận một liều lượng 50 mg/kg của mAb COV2-2196 hoặc mAb đối chứng isotyp trong tĩnh mạch vào ngày -3 và sau đó được thử thách trong mũi và trong khí quản vào ngày 0 với liều lượng bằng $1,1 \times 10^4$ PFU SARS-CoV-2. Sau khi thử thách, các tác giả sáng chế đánh giá ARN virus bằng RT-qPCR trong dịch rửa phế quản (BAL) và mẫu phết mũi. Hàm lượng cao của ARN virus dưới hệ gen được quan sát thấy ở NHP được điều trị bằng mAb đối chứng isotyp, với đỉnh trung vị là 7,53 (trong khoảng từ 5,37 đến 8,23) $\log_{10}$ bản sao ARN/mẫu phết trong mẫu phết mũi và đỉnh trung vị là 4,97 (trong khoảng từ 3,81 đến 5,24) $\log_{10}$ bản sao ARN/ml trong BAL. ARN virus dưới hệ gen không được phát hiện trong các mẫu từ nhóm điều trị bằng mAb ($\text{LOD} = 50 [1,7 \log_{10}]$ bản sao ARN/mẫu phết hoặc cho mỗi ml) thể hiện sự bảo vệ. Phân tích được động học phát hiện ra nồng độ ổn định của mAb người tuần hoàn ở NHP.

Nghiên cứu thử thách NHP. Nghiên cứu NHP gắn với nguyên tắc nêu trong ấn bản thứ tám của Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Nhà máy nơi mà nghiên cứu này được tiến hành (Bioqual Inc., Rockville, MD) được công nhận đầy đủ bởi Tổ Chức Đánh Giá Và Công Nhận Sự Chăm Sóc Động Vật Thí Nghiệm (Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International - AAALAC) và có Văn Phòng Bảo Vệ Động Vật Thí Nghiệm đã được phê chuẩn. Nghiên cứu NHP được tiến hành tuân theo tất cả các quy định địa phương, bang, và liên bang liên quan và được phê chuẩn bởi Ủy Ban

Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm (Institutional Animal Care and Use Committee - IACUC) liên quan.

Tám con khỉ rhesus macaque (*Macaca mulatta*) trưởng thành khỏe mạnh có nguồn gốc từ Ấn Độ (khối lượng cơ thể từ 5 đến 15 kg) được nghiên cứu. Các con vật được phân ngẫu nhiên vào nhóm điều trị bằng mAb kháng SARS-CoV-2 ($n = 4$ trong mỗi nhóm) và một nhóm đối chứng (được điều trị bằng isotyp) ($n = 4$ trong mỗi nhóm). Các con vật nhận một liều lượng 50 mg/kg của mAb COV2-2196 hoặc mAb đối chứng isotyp trong tĩnh mạch vào ngày -3 và sau đó được thử thách trong ba ngày với $1,1 \times 10^4$ PFU SARS-CoV-2, được dùng dưới dạng 1 ml theo đường i.n và 1 ml theo đường nội khí quản. Sau khi thử thách, ARN virus được đánh giá bằng RT-qPCR trong dịch rửa phế quản và mẫu phết mũi ở nhiều thời điểm như mô tả^{5,6}. Tất cả các con vật được khám sức khỏe. Ngoài ra, tất cả các con vật được theo dõi hàng ngày với quy trình tính điểm nội bộ được phê chuẩn bởi Ủy Ban Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm. Các nghiên cứu này không mù.

Phát hiện mAb người tuấn hoàn trong huyết thanh NHP. Đĩa ELISA được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C với 1 µg/ml kháng thể thứ cấp IgG kháng người ở dê (H+L) (khí đã được hấp thụ từ trước) (Novus Biological) và sau đó được phong bế trong thời gian 2 giờ. Các mẫu huyết thanh được thử nghiệm ở các dịch pha loãng 3 lần bắt đầu ở dịch pha loãng 1:3 trong Blocker Casein trong chất pha loãng PBS (ThermoFisher). Các mẫu được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ môi trường và sau đó được lấy ra, và các đĩa được rửa. Sau đó các giếng được ủ trong thời gian 1 giờ với IgG kháng người ở dê đã liên hợp HRP (khí đã được hấp thụ từ trước) (Southern Biotech) ở độ pha loãng 1:4.000. Các giếng được rửa và sau đó được ủ với Cơ Chất Peroxidaza SureBlue Reserve TMB Microwell (Seracare) (100 µl/giếng) trong thời gian 3 phút sau đó là Dung Dịch Làm Dừng TMB (Seracare) để làm dừng phản ứng (100 µl/giếng). Các vi đĩa được đọc ở 450 nm. Nồng độ của mAb người được nghịch đảo từ khoảng giá trị tuyến tính của đường cong tiêu chuẩn IgG người được tinh chế (Sigma) bằng cách sử dụng phần mềm Prism, phiên bản 8,0 (GraphPad).

Ví dụ 3 – Nguyên Liệu Và Phương Pháp Đối Với Ví Dụ 4

Sự biểu hiện và tinh chế của miền liên kết thụ thể (RBD) tái tổ hợp của protein gai SARS-CoV-2. Các đoạn ADN tương ứng với RBD protein S (các gốc 319 - 528)

được tối ưu hóa trình tự để biểu hiện, được tổng hợp, và tách dòng vào plasmit ADN biểu hiện pTwist-CMV xuôi dòng của peptit tín hiệu IL-2 (MYRMQLLSIALSLALVTNS) (Twist Bioscience). Cầu nối ba axit amin (GSG) và đuôi His được kết hợp ở đầu tận cùng C của cấu trúc biểu hiện để làm thuận lợi cho sự tinh chế protein. Tế bào Expi293F được chuyển nạp tạm thời với plasmit mã hóa cho RBD, và dịch nổi bề mặt nuôi cấy được thu lấy sau khi 5 ngày. RBD được tinh chế từ dịch nổi bề mặt bằng sắc ký ái lực niken với cột HisTrap Excel (GE Healthcare Life Sciences). Để sản xuất protein được sử dụng trong thử nghiệm kết tinh hóa, 5 μ M kifunensin được bao gồm trong môi trường nuôi cấy để sản xuất RBD với mannoza glycan cao. Glycoprotein mannoza cao tiếp đó được xử lý bằng endoglycosidaza F1 (Millipore) để thu được RBD đã được deglycosyl hóa đồng nhất.

Sự biểu hiện và tinh chế của các Fab COV2-2196 và COV2-2130 tái tổ hợp. Các mảnh ADN tương ứng với các miền biến đổi chuỗi nặng COV2-2196 và COV2-2130 với miền CH1 IgG1 người và các miền biến đổi chuỗi nhẹ với miền không đổi chuỗi kappa người được tổng hợp và tách dòng vào vector pTwist (Twist Bioscience). Vector này bao gồm chuỗi nặng của mỗi Fab, sau đó là cầu nối GGGGS, vị trí phân cắt furin, vị trí phân cắt ribosom T2A, và chuỗi nhẹ của mỗi Fab. Sự biểu hiện của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được gây ra bởi cùng một vùng khởi động CMV. Các Fab COV2-2196 và COV2-2130 được biểu hiện trong tế bào ExpiCHO bằng sự chuyển nạp tạm thời với plasmit biểu hiện. Fab tái tổ hợp được tinh chế từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng cột CaptureSelect kháng CH1 (Thermo Fisher Scientific). Đối với phức hợp RBD/COV2-2196, trình tự *wt* của COV2-2196 được sử dụng để biểu hiện. Đối với phức hợp RBD/COV2-2196/COV2-2130, phiên bản được cải biến của Fab COV2-2196 được sử dụng trong đó hai axit amin đầu tiên của vùng biến đổi bị đột biến từ QM thành EV.

Sự kết tinh hóa và sự xác định cấu trúc của phức hợp kháng thể-kháng nguyên. Fab COV2-2196 đã được tinh chế được trộn với RBD đã được deglycosyl hóa ở tỉ lệ mol bằng 1:1,5, và hỗn hợp được tinh chế thêm bằng sắc ký loại trừ kích thước với cột Superdex-200 Increase (GE Healthcare Life Sciences) để thu được phức hợp kháng thể-kháng nguyên. Để thu được phức hợp ba thành phần RBD/COV2-2196/COV2-2130, RBD đã được tinh chế và đã được deglycosyl hóa được trộn với cả hai Fab COV2-2196 và COV2-2130 ở tỉ lệ mol bằng 1:1,5:1,5, và phức hợp ba thành phần

được tinh chế với cột Superdex-200 Increase. Phức hợp được cô đến khoảng 10 mg/ml và được đưa đi thử nghiệm kết tinh hóa. Phức hợp RBD/COV2-2196 được kết tinh hóa trong 16% - 18% PEG 3350, 0,2 Tris-HCl pH 8,0 – 8,5, và phức hợp RBD/COV2-2196/COV2-2130 được kết tinh hóa trong 5% (khối lượng/thể tích) PEG 1000, 100 mM natri photphat dibazo/axit xitric độ pH 4,2, 40% (thể tích/thể tích) rượu phản ứng. Dung dịch bảo vệ lạnh cryo được tạo ra bằng cách trộn dung dịch kết tinh hóa với 100% glyxerol ở tỉ lệ thể tích bằng 20:7 đối với tinh thể của cả phức hợp. Tinh thể protein được kết đông nhanh trong nitơ lỏng sau khi ngâm nhanh trong dung dịch bảo vệ lạnh cryo. Dữ liệu nhiễu xạ được thu thập ở chùm tia 21-ID-F đối với phức hợp RBD/COV2-2196 và 21-ID-G đối với phức hợp RBD/COV2-2196/COV2-2130 ở Advanced Photon Source. Dữ liệu nhiễu xạ được xử lý bằng XDS⁵⁸ và bộ CCP4⁵⁹. Cấu trúc tinh thể được làm sáng tỏ bằng sự thay thế phân tử bằng cách sử dụng cấu trúc của RBD trong phức hợp với Fab CC12,1 (PDB ID 6XC2) và cấu trúc Fab của MR78 (PDB ID 5JRP) với chương trình Phaser⁶⁰. Cấu trúc được tinh chỉnh và được xây dựng lại thủ công lần lượt bằng Phenix⁶¹ hoặc Coot⁶². Các mô hình này đã được nộp lưu vào Ngân Hàng Dữ Liệu Protein (Protein Data Bank). Phần mềm PyMOL⁶³ được sử dụng để tạo ra tất cả các hình vẽ cấu trúc.

Thí nghiệm đo phổ khối hydro đơteri (HDX-MS). Thí nghiệm HDX-MS được tiến hành bằng cách sử dụng người máy xử lý mẫu tự động (công nghệ LEAP, Fort Lauderdale, FL, USA) được ghép nối với hệ thống M-Class Acquity LC và bộ quản lý HDX (Waters Ltd., Wilmslow, UK). 7,6 µl trime gai SARS-CoV-2 S2P 4,3 µM một mình, hoặc với tỉ lệ mol 1:1,12 của AZD1061 hoặc AZD8895 được bổ sung vào 52,4 µl chất đệm nhân (50 mM kali photphat pD 6,2) và được ủ trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ 20°C. Sau khi ủ, 50 µl mẫu này được bổ sung vào 50 µl dung dịch dập tắt (50 mM kali photphat, 200 mM TCEP, 2 M Gdn-HCl, pH 2,3) ở nhiệt độ 1°C. 50 µl mẫu đã được dập tắt được cho đi qua cột BEH pepsin đã được giữ cố định (Waters Ltd., Wilmslow, UK) ở nhiệt độ 20°C ở 100 µl phút⁻¹ (~4,000 psi) trong thời gian 4 phút trước khi peptit thu được được sấy bằng cách sử dụng tiền cột Vanguard cột sấy Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 mm x 5 mm, Waters Ltd., Wilmslow, UK). Sau khi chuyển đổi van, peptit được tách ở nhiệt độ 1°C bằng cách rửa giải gradien từ 0 đến 35% MeCN (0,2% thể tích/thể tích axit formic) trong H₂O (0,2% thể tích/thể tích axit formic) trong thời gian 6 phút ở 40 µl phút⁻¹ bằng cách sử dụng cột phân tích

Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 1 mm x 100 mm). Peptit được phân tích bằng cách sử dụng máy đo phổ khối dung hợp Orbitrap (Thermo Fisher, Bremen, Đức) hoạt động ở chế độ phát hiện orbitrap ở độ phân giải 120K (các mẫu đã được đơteri hóa) hoặc chế độ orbitrap-iontrap DDA (các mẫu $t=0$). Dữ liệu MS/MS peptit được sử dụng để xác định peptit được phân tích bằng cách sử dụng BioPharma Finder v3,0 (Thermo Fisher, Bremen, Đức) và sự hấp thụ đơteri được xác định bằng cách sử dụng HDExaminer v2,0 (Sierra Analytics). Kết quả tập hợp peptit và bảng tóm tắt độ hấp thụ csv xuất ra từ HDExaminer được định dạng lại bằng cách sử dụng bản R: nội bộ để tạo ra hình vẽ đồ thị độ hấp thụ và bản đồ nhiệt cấu trúc bằng cách sử dụng PAVED (University of Leeds)⁶⁴.

Sự liên kết ELISA của các thể đột biến COV2-2196. Các giếng của đĩa vi chuẩn độ 384 giếng được phủ bằng được tinh chế protein S 6P SARS-CoV-2 tái tổ hợp ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các đĩa được phong bế bằng 2% sữa khô không béo và 2% huyết thanh dê bình thường trong DPBS chứa 0,05% Tween-20 (DPBS-T) trong thời gian 1 giờ. Kháng thể được pha loãng đến 10 $\mu\text{g/ml}$ và được chuẩn độ 23 lần hai lần trong DPBS-T và được bổ sung vào các giếng, sau đó là ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng IgG kháng người ở dê được liên hợp với peroxidaza củ cải ngựa (Southern Biotech) và cơ chất TMB (Thermo Fischer Scientific). Các phản ứng được dập tắt bằng axit clohydric 1 N và độ hấp thụ được đo ở 450 nm bằng cách sử dụng máy đo quang phổ (Biotek).

Lập bản đồ tất cả các đột biến mà trốn thoát khỏi sự liên kết kháng thể. Tất cả các đột biến mà trốn thoát sự liên kết kháng thể được lập bản đồ thông qua phương pháp DMS⁴¹. Các tác giả sáng chế sử dụng thư viện thể đột biến RBD hiển thị nấm men được mô tả trước đây^{41,42}. Một cách vắn tắt, thư viện thể đột biến hai bản sao được xây dựng trong miền liên kết thụ thể (RBD) gai từ SARS-CoV-2 (thể phân lập Wuhan-Hu-1, mã số truy cập Genbank MN908947, các gốc N331-T531) và chứa 3,804 trong số 3,819 đột biến axit amin có thể có, với >95% phần trăm dưới dạng các thể đột biến riêng lẻ. Mỗi biến thể RBD được liên kết với trình tự mã vạch 16-nucleotit độc nhất để làm thuận lợi cho việc xác định trình tự xuôi dòng. Như đã mô tả trước đây, các thư viện được phân loại để biểu hiện RBD và ACE2 liên kết để triệt tiêu biến thể RBD mà bị cuộn gập nhầm hoàn toàn hoặc không hoạt động (*tức là*, thiếu ái lực liên kết ACE2 vừa phải⁴¹).

Thí nghiệm lập bản đồ trốn thoát kháng thể được thực hiện trong hai bản sao sinh học sử dụng hai thư viện thể đột biến RBD độc lập, như đã mô tả trước đây⁴¹, với sự cải biến nhỏ. Một cách vắn tắt, các thư viện nấm men thể đột biến được gây cảm ứng để biểu hiện RBD được rửa và được ủ với kháng thể ở 400 ng/ml trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng có khuấy nhẹ. Sau khi ủ kháng thể, các thư viện được gắn nhãn thứ cấp bằng kháng thể kháng MYC được liên hợp FITC 1:100 (Immunology Consultants Lab, CYMC-45F) để gắn nhãn đối với sự biểu hiện RBD và IgG kháng người ở dê được liên hợp PE 1:200 (Jackson ImmunoResearch 109-115-098) để gắn nhãn đối với kháng thể đã liên kết. Tuyển chọn đếm tế bào theo dòng được sử dụng để làm giàu đối với tế bào biểu hiện biến thể RBD với sự liên kết kháng thể giảm đi thông qua cổng chọe lọc được rút ra để bắt giữ tế bào SARS-CoV-2 không đột biến được gắn nhãn ở nồng độ kháng thể 1% của các mẫu thư viện. Đối với mỗi mẫu, xấp xỉ 10 triệu tế bào RBD+ được xử lý trên máy đếm tế bào. Tế bào trốn thoát kháng thể được cho sinh trưởng qua đêm trong SD-CAA (6,7 g/l Nền Nitơ Nấm Men, 5,0 g/l axit Casamino, 1,065 g/l axit MES, và 2% khối lượng/thể tích dextroza) để mở rộng tế bào trước khi chiết plasmit.

Các mẫu plasmit được điều chế từ sự chọn lọc trước và môi trường nuôi cấy qua đêm của tế bào trốn thoát kháng thể (Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep II) như đã mô tả trước đây⁴¹. Các trình tự mã vạch 16-nucleotit xác định mỗi biến thể RBD được khuếch đại bằng PCR và được xác định trình tự trên Illumina HiSeq 2500 với kết quả đọc mỗi đầu 50 bp như đã mô tả^{41,42}.

Các phân đoạn trốn thoát được tính như đã mô tả⁴¹, với sự cải biến nhỏ như lưu ý dưới đây. Các tác giả sáng chế sử dụng gói dms_variants (jbloomlab.github.io/dms_variants/, phiên bản 0.8.2) để xử lý các trình tự Illumina thành số đếm của mỗi biến thể RBD đã được gắn mã vạch trong mỗi quần thể tuyển chọn trước và trốn thoát kháng thể sử dụng bảng tra cứu mã vạch/RBD được mô tả trước đây⁶⁵.

Đối với mỗi sự chọn lọc kháng thể, các tác giả sáng chế tính "phân đoạn trốn thoát" đối với mỗi biến thể đã được gắn mã vạch bằng cách sử dụng số đếm xác định trình tự sâu đối với mỗi biến thể trong các quần thể ban đầu và trốn thoát kháng thể và toàn bộ phân đoạn của thư viện mà trốn thoát sự liên kết kháng thể thông qua công thức được mô tả trước đây⁴¹. Các phân đoạn trốn thoát này thể hiện phân đoạn ước

tính của các tế bào biểu hiện biến thể cụ thể đó mà nằm trong nhóm trốn thoát kháng thể, sao cho giá trị bằng 0 có nghĩa là biến thể luôn luôn được liên kết bởi huyết thanh và giá trị bằng 1 có nghĩa là nó luôn trốn thoát sự liên kết kháng thể. Sau đó các tác giả sáng chế áp dụng bộ lọc tính toán để loại bỏ biến thể có số đếm xác định trình tự thấp hoặc các đột biến có hại ở mức độ cao mà có thể gây ra sự trốn thoát kháng thể đơn giản là bằng cách dẫn đến sự biểu hiện kém của RBD cuộn gập phù hợp trên bề mặt tế bào nấm men^{41,42}. Đặc biệt là, họ đã loại bỏ biến thể mà có (hoặc chứa các đột biến với) điểm liên kết ACE2 $< -2,35$ hoặc điểm biểu hiện < -1 , bằng cách sử dụng điểm quét đột biến sâu cấp độ biến thể và cấp độ đột biến như đã mô tả trước đây⁴². Lưu ý rằng các tiêu chuẩn lọc này nghiêm ngặt hơn một chút so với các tiêu chuẩn lọc được sử dụng trước đây để lập bản đồ bảng của các kháng thể người⁴¹ nhưng giống với các tiêu chuẩn lọc được sử dụng trong các nghiên cứu gần đây định ra các gốc RBD mà ảnh hưởng đến sự liên kết của mAb⁶⁵ và huyết thanh đa dòng⁵⁴.

Các tác giả sáng chế mở cuộn tiếp điểm trốn thoát cấp độ biến thể thành giá trị ước tính phân đoạn trốn thoát đối với các đột biến đơn lẻ bằng cách sử dụng mô hình át gen toàn cầu⁶⁶ được thực hiện trong gói dms_variants, như nêu chi tiết trong (jbloomlab.github.io/dms_variants/dms_variants.globalepistasis.html) và đã được mô tả⁴¹. Các phân đoạn trốn thoát đã được báo cáo trong toàn bộ bài báo là giá trị trung bình của các thư viện (sự tương quan được thể hiện trên các HÌNH 18A-B); các điểm này cũng ở trong Bảng B. Các vị trí của sự trốn thoát mạnh từ mỗi kháng thể để làm nổi bật trong các đồ thị biểu trưng được xác định theo kinh nghiệm dưới dạng các vị trí mà điểm trốn thoát đột biến tổng cộng của chúng bằng ít nhất là 10 lần tổng từng vị trí trung vị của sự chọn lọc, và trong vòng 10 lần của tổng từng vị trí của vị trí được chọn lọc mạnh nhất. Tài liệu đầy đủ về phân tích tính toán có ở github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs. Các kết quả này cũng có sẵn ở dạng tương tác ở https://jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/.

Các thí nghiệm chọn lọc trốn thoát kháng thể với VSV-SARS-CoV-2. Đối với các thí nghiệm chọn lọc trốn thoát với COV2-2196 và COV2-2130, các tác giả sáng chế sử dụng virus VSV tái tổ hợp có khả năng sao chép mã hóa cho protein gai từ SARS-CoV-2 với đột biến mất đầu tận cùng C 21 axit amin⁴³. Virus VSV biểu hiện gai được nhân lên trong tế bào MA104 (khỉ xanh Châu Phi, ATCC CRL-2378,1) như mô

tả trước đây⁴³, và dịch dự trữ virus được chuẩn độ trên môi trường nuôi cấy đơn lớp tế bào Vero E6. Các mảng được trực quan hóa bằng cách sử dụng nhuộm màu đỏ trung tính. Để sàng lọc đối với các đột biến trốn thoát được chọn lọc trong sự có mặt của COV2-2196, COV2-2130, hoặc hỗn hợp gồm có hỗn hợp 1:1 của COV2-2196 và COV2-2130, các tác giả sáng chế sử dụng thử nghiệm phân tích tế bào thời gian thực (RTCA) và xCELLigence RTCA MP Analyzer (ACEA Biosciences Inc.) và sơ đồ chọn lọc trốn thoát được mô tả trước đây⁴¹. Một cách vắn tắt, 50 μ l môi trường nuôi cấy tế bào (DMEM có bổ sung với 2% FBS) được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa E 96 giếng để thu được kết quả đọc mức nền. Mười tám nghìn (18,000) tế bào Vero E6 trong 50 μ l môi trường nuôi cấy tế bào được cấy trong mỗi giếng, và các đĩa được để trên máy phân tích. Các phép đo được thực hiện tự động 15 phút một lần và các sơ đồ cảm biến được trực quan hóa bằng cách sử dụng phần mềm RTCA phiên bản 2.1.0 (ACEA Biosciences Inc). Virus VSV-SARS-CoV-2 (5e3 đơn vị tạo mảng (PFU) cho mỗi giếng, ~0,3 MOI) được trộn với nồng độ trung hòa bão hòa của COV2-2196, COV2-2130, hoặc hỗn hợp 1:1 của kháng thể COV2-2196 và COV2-2130 (5 μ g/ml tổng nồng độ của kháng thể) trong tổng thể tích là 100 μ l và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Ở 16-20 giờ sau khi cấy tế bào, hỗn hợp virus-kháng thể được bổ sung vào đơn lớp tế bào. Các giếng chỉ chứa virus không có kháng thể và các giếng chứa chỉ tế bào Vero E6 trong môi trường được bao gồm trên mỗi đĩa làm đối chứng. Các đĩa được đo liên tục (15 phút một lần) trong thời gian 72 giờ. Các đột biến trốn thoát được nhận diện bằng theo dõi chỉ số tế bào đối với sự sụt giảm của khả năng sống tế bào. Để xác nhận sự trốn thoát khỏi sự chọn lọc kháng thể, các giếng trong đó tác dụng gây bệnh tế bào được quan sát thấy trong sự có mặt của COV2-2130 được đánh giá trong thí nghiệm RTCA tiếp theo trong sự có mặt của 10 μ g/ml của COV2-2130 hoặc COV2-2196. Sau khi xác nhận tính kháng của virus được chọn lọc đối với sự trung hòa bằng COV2-2130, thể phân lập virus được mở rộng trên tế bào Vero E6 trong sự có mặt của 10 μ g/ml của COV2-2130. ARN virus được phân lập bằng cách sử dụng bộ kit chiết ARN Virus QiAmp (QIAGEN) theo quy trình của nhà sản xuất, và gen gai SARS-CoV-2 được phiên mã ngược và được khuếch đại với bộ kit SuperScript IV One-Step RT-PCR (ThermoFisher Scientific) sử dụng các đoạn mồi kẹp hai bên gen S. Sản phẩm PCR đã khuếch đại được tinh chế bằng cách sử dụng hạt từ tính SPRI

(Beckman Coulter) ở tỉ lệ 1:1 và được xác định trình tự bằng phương pháp Sanger, sử dụng các đoạn mồi mang lại kết quả đọc xuôi và ngược của RBD.

Cấy chuyển theo dây và thử nghiệm của SARS-CoV-2 để chọn các đột biến kháng mAb. Chủng SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 được cấy chuyển theo dây trong môi trường nuôi cấy đơn lớp tế bào Vero với AZD8895, AZD1061 hoặc AZD7442, ở nồng độ bắt đầu ở giá trị IC_{50} tương ứng của chúng và tăng lên từng bậc đến giá trị IC_{90} của chúng với mỗi lần cấy chuyển. Để làm đối chứng, virus được cấy chuyển khi không có kháng thể. Sau lần cấy chuyển cuối cùng, virus được đánh giá về tính miễn dịch chống lại kháng thể nghịch đảo ở nồng độ cuối cùng bằng 10 lần nồng độ IC_{90} bằng thử nghiệm mảng. Các mảng ($n=6$) được chọn lọc ngẫu nhiên để nuôi cấy AZD1061, và gen mã hóa cho gai virus của chúng được xác định trình tự.

Phân lập hoặc tạo ra virus SARS-CoV-2 nguyên bản, bao gồm virus có các gốc biến thể. Thể phân lập UK B.1.1.7-OXF được thu lấy từ mẫu phết mũi-họng từ cá thể bị lây nhiễm ở Kent, Anh. Các nghiên cứu lâm sàng để thu được mẫu vật sau khi sự chấp thuận sau khi được giải thích được phê chuẩn bởi John Radcliffe Hospital ở Oxford, Vương Quốc Anh. Mẫu được pha loãng trong DMEM với 2% FBS và được cho đi qua bộ lọc 0,45 μm trước khi bổ sung vào đơn lớp của tế bào Vero-hACE2-TMPRSS2 (món quà của A. Creanga và B. Graham). Hai ngày sau, dịch nổi bề mặt được thu hoạch được thiết lập dịch dự trữ cấy chuyển lần không (p_0). Thể phân lập 2019n-CoV/USA_WA1/2019 của SARS-CoV-2 được thu lấy từ Trung Tâm Kiểm Soát Bệnh Hoa Kỳ (CDC) và được cấy chuyển trên tế bào Vero E6. Các đột biến điểm riêng lẻ trong gen gai (D614G và E484K/D614G) được đưa vào trong dòng cADN lây nhiễm của chủng 2019n-CoV/USA_WA1/2019 như mô tả trước đây⁶⁷. Các đột biến thể nucleotit được đưa vào trong dòng phụ puc57-CoV-2-F6 chứa gen gai của dòng lây nhiễm SARS-CoV-2 kiểu dại⁶⁸. Các dòng cADN lây nhiễm chiều dài đầy đủ của virus SARS-CoV-2 biến thể được lắp ráp bằng cách nối *in vitro* bẫy mảnh cADN tiếp giáp theo quy trình được mô tả trước đây⁶⁸. Sau đó sự phiên mã *in vitro* được thực hiện để tổng hợp ARN hệ gen chiều dài đầy đủ. Để thu hồi virus đột biến, bản phiên mã ARN được đục lỗ điện vào tế bào Vero E6. Virus từ dịch nổi bề mặt của các tế bào được thu thập 40 giờ sau và đóng vai trò làm dịch dự trữ p_0 . Tất cả dịch dự trữ virus được xác nhận bằng cách xác định trình tự.

Thử nghiệm trung hòa làm giảm ổ tập trung. Dịch pha loãng theo dãy của mAb hoặc huyết thanh được ủ với 10^2 đơn vị tạo ổ tập trung (focus-forming unit - FFU) của các chủng hoặc biến thể khác nhau của SARS-CoV-2 trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C . Phức hợp kháng thể-virut được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đơn lớp tế bào Vero-hACE2-TMPRSS2 trong đĩa 96 giếng và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ. Tiếp đó, tế bào được phủ bằng 1% (khối lượng/thể tích) metylxenluloza trong MEM có bổ sung với 2% FBS. Các đĩa được thu lấy 20 giờ sau bằng cách lấy phần phủ và cố định bằng 4% PFA trong PBS trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa và được ủ liên tục với tập hợp có vài dòng của mAb kháng S và IgG kháng người ở dê đã liên hợp HRP trong PBS có bổ sung với 0,1% saponin và 0,1% albumin huyết thanh bò. Ổ tế bào bị lây nhiễm SARS-CoV-2 được trực quan hóa bằng cách sử dụng cơ chất TrueBlue peroxidaza (KPL) và được định lượng trên thiết bị vi phân tích ImmunoSpot (Cellular Technologies).

Sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự. Các tác giả sáng chế tìm kiếm trình tự gen biến đổi kháng thể bắt nguồn từ cùng dấu hiệu như dấu hiệu mã hóa cho COV2-2196 và tìm được các trình tự phù hợp từ kho của mỗi cá thể được xét nghiệm. Họ tìm kiếm các trình tự tương tự trong kho trình tự kháng thể quy mô lớn có sẵn công khai đối với ba cá thể khỏe mạnh và kho máu dây rốn (đã nộp lưu ở SRP174305). Các thông số tìm kiếm đối với chuỗi nặng là các trình tự với *IGHV1-58* và *IGHJ3* có các gốc P99, D108, và F110. Ngoài ra, các thông số tìm kiếm đối với chuỗi nhẹ là các trình tự có các gốc Y92 và W98. Các trình tự từ kiểu dòng vô tính phù hợp mà thuộc về mỗi cá thể được sắp xếp thẳng hàng với ClustalO (chuỗi nặng) hoặc với MUSCLE (chuỗi nhẹ). Sau đó, các đồ thị LOGO của các trình tự được sắp xếp thẳng hàng được tạo ra bằng cách sử dụng WebLogo.

Độ khả dụng dữ liệu và nguyên liệu: Cấu trúc tinh thể được báo cáo trong bài báo này đã được nộp lưu vào Ngân Hàng Dữ Liệu Protein với mã số truy cập 7L7D, 7L7E. Sự nộp lưu Sequence Read Archive đối với bộ dữ liệu kho gen kháng thể người được sắp xếp thẳng hàng được nộp lưu ở NCBI: PRJNA511481. Tất cả dữ liệu khác có sẵn trong văn bản chính hoặc nguyên liệu phụ thêm.

Độ khả dụng phần mềm. Đường ống tính toán đối với phân tích quét đột biến sâu của các đột biến trốn thoát kháng thể có sẵn trên GitHub: github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs. Các tệp FASTQ có sẵn

trên NCBI Sequence Read Archive dưới BioSample SAMN17532001 như là một phần của BioProject PRJNA639956. Các phân đoạn trốn thoát hoán vị có sẵn trên GitHub ([github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-](https://github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/blob/main/results/supp_data/AZ_cocktail_raw_data.csv)

[RBD_MAP_AZ_Abs/blob/main/results/supp_data/AZ_cocktail_raw_data.csv](https://github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/blob/main/results/supp_data/AZ_cocktail_raw_data.csv)) và trong Bảng B.

Ví dụ 4 – Kết Quả Và Thảo Luận

Kháng thể dựa trên COV2-2196 được nghiên cứu để phòng ngừa hoặc trị liệu kết hợp với kháng thể dựa trên kháng thể đặc hiệu RBD không cạnh tranh COV2-2130. Để hiểu về chi tiết phân tử của sự nhận diện của RBD bằng COV2-2196 và COV2-2130, và các cơ chế cấu trúc có thể có nằm dưới tính hiệp đồng được thể hiện trong sự bảo vệ phòng ngừa của hai mAb không cạnh tranh trong mô hình động vật¹, các tác giả sáng chế xác định cấu trúc tinh thể của RBD protein S trong phức hợp với COV2-2196 ở 2,50 Å (các HÌNH 8A-E, Bảng B) và trong phức hợp với cả COV2-2196 và COV2-2130 ở 3,00 Å (các HÌNH 9A-F, Bảng B). Cấu trúc con của RBD-COV2-2196 trong phức hợp RBD-COV2-2196-2130 chồng khít với cấu trúc của phức hợp RBD-COV2-2196 (HÌNH 12). Diện tích bề mặt bị che lấp của mặt phân cách giữa COV2-2196 và RBD là khoảng 650 Å² trong cả hai cấu trúc tinh thể, và diện tích bề mặt bị che lấp của mặt phân cách giữa COV2-2130 và RBD là khoảng 740 Å². COV2-2196 liên kết với cầu nối liên kết thụ thể của RBD, và COV2-2130 liên kết với một bên của rìa RBD xung quanh gốc K444 và vùng hình yên của mô típ liên kết thụ thể (RBM), gồi lên vị trí liên kết ACE2 (các HÌNH 8A-B, các HÌNH 9A-B). Các dấu hiệu này giải thích sự cạnh tranh giữa kháng thể và ACE2 để liên kết RBD từ nghiên cứu trước đây của chúng tôi, *ví dụ như*, cả COV2-2196 và COV2-2130 đều trung hòa virus bằng cách phong bế sự tiếp cận của RBD đến thụ thể người ACE2¹. Góc thorn từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ COV2-2196 tạo thành túi kỵ nước mà bao quanh gốc RBD F486 và các gốc liền kề (G485, N487) (HÌNH 8A, 8D và 8E; các HÌNH 13A-C). Phương thức này của sự tương tác Ab-Ag hiếm gặp trong đó sự tạo thành của gói kháng thể được gây ra bởi sự tách rộng trong không gian của HCDR3 và LCDR3. Ngoài ra, mặc dù vị trí kháng nguyên được nhận diện bởi COV2-2196 không bị che lấp trong mặt phân cách giữa vùng khởi động của *chính* trime S, COV2-2196 không thể liên kết RBD ở hình dạng "xuống" do sự va chạm trong không gian với RBD trong vùng khởi động S liền kề. Do đó, COV2-2196 chỉ liên kết với RBD trong hình dạng

"lên" (HÌNH 8C). Phần phủ của cấu trúc con của RBD trong phức hợp với COV2-2130 (HÌNH 9C) và cấu trúc của RBD trong phức hợp với cả COV2-2196 và COV2-2130 (HÌNH 9D) chỉ ra rằng COV2-2130 có thể liên kết RBD trong cả hai hình dạng "lên" và "xuống" của trimer S. Các phát hiện cấu trúc này thống nhất với kết quả độ phân giải thấp hơn trước đây của chúng tôi đối với phức hợp sử dụng kính hiển vi điện tử bất màu âm tính¹.

Phân tích cấu trúc của COV2-2196 trong phức hợp với RBD khám phá ra làm thế nào COV2-2196 nhận diện được cầu nối liên kết thụ thể trên RBD. Một trong các gốc tiếp xúc chính, F486, nằm ở trung tâm của vị trí liên kết, tương tác rộng rãi với túi kỵ nước (gốc P99 của chuỗi nặng và "lồng thom" được tạo thành bằng 5 chuỗi bên thom) giữa chuỗi nặng/chuỗi nhẹ COV2-2196 thông qua hiệu ứng kỵ nước và sự tương tác van der Waals (các HÌNH 8D-E, các HÌNH 13A-B). Mạng lưới liên kết hydro (liên kết H), được xây dựng với 4 liên kết H Ab-Ag trực tiếp và 16 liên kết H qua trung gian nước, bao quanh gốc F486 và củng cố sự tương tác Ab-Ag (HÌNH 13C). Quan trọng là, đối với tất cả các gốc ngoại trừ một (gốc P99 của chuỗi nặng) mà tương tác rộng rãi với epitop, chúng được mã hóa bởi trình tự dòng mầm (*IGHV1-58*01* và *IGHJ3*02* đối với chuỗi nặng, *IGKV3-20*01* và *IGKJ1*01* đối với chuỗi nhẹ) (HÌNH 10A) hoặc chỉ các nguyên tử khung của chúng tham gia vào sự tương tác Ab-Ag, chẳng hạn như N107 và G99 của chuỗi nặng và S94 của chuỗi nhẹ. Các tác giả sáng chế đã nêu ra kháng thể khác trong tài liệu, S2E12, mà được mã hóa bởi cùng sự tái tổ hợp *IGHV/IGHJ* và *IGKV/IGKJ*, với các gen tương tự nhưng có khả năng nhất là khác biệt *IGHD* với các gen của COV2-2196 (*IGHD2-15* so với *IGHD2-2*)³⁸. So sánh cấu trúc cryo-EM của S2E12 trong phức hợp với protein S (PDB 7K4N) gợi ý rằng mAb S2E12 có khả năng sử dụng sự tương tác Ab-Ag gần như giống hệt như sự tương tác Ab-Ag của COV2-2196, mặc dù các biến đổi trong hình dạng của các chuỗi bên gốc mặt phân cách có thể được nhìn thấy (HÌNH 13D). Ví dụ như, đối với gốc Y92 của chuỗi nhẹ, vòng phenyl trong cấu trúc tinh thể vuông góc với vòng đó trong cấu trúc EM khi làm khớp.

Các tác giả sáng chế đã tra cứu cơ sở dữ liệu di truyền để xác định liệu các dấu hiệu cấu trúc này có mặt trong mAb SARS-CoV-2 khác được phân lập bởi những người khác và tìm thấy các thành viên khác của kiểu dòng vô tính hay không (HÌNH 10A). Hai nghiên cứu khác đã báo cáo cùng một kiểu dòng vô tính hoặc kiểu dòng vô

tính tương tự của kháng thể được phân lập từ nhiều bệnh nhân COVID-19 đang hồi phục^{4,38}, và một nghiên cứu đã tìm thấy ba kháng thể với cùng sự bắt cặp *IGHV1-58* và *IGKV3-20*, mà không cung cấp thông tin về việc sử dụng gen D hoặc J³⁹. Tất cả các kháng thể này được báo cáo là liên kết RBD SARS-CoV-2 mạnh mẽ và trung hòa virus với hiệu lực cao^{1,4,38,39}. Cho đến nay, chỉ có hai cấu trúc phân giải nguyên tử của kháng thể được mã hóa bởi các sự tái tổ hợp $V_H(D_H)J_H$ và V_K-J_K có sẵn, cấu trúc đối với COV2-2196 được thể hiện ở đây và cấu trúc đối với S2E12³⁸. Các tác giả sáng chế thực hiện việc lập mô hình tương đồng đối với hai kháng thể khác của kiểu dòng vô tính này từ bảng của bản thân chúng tôi của kháng thể kháng SARS-CoV-2, được đặt tên là COV2-2072 và COV2-2381. Như mong đợi, với việc các kháng thể này là thành viên của kiểu dòng vô tính di truyền chung, cấu trúc đã được lập mô hình của các phức hợp COV2-2072/RBD và COV2-2381/RBD chồng khít ảo với cấu trúc của COV2-2196/RBD và S2E12/RBD ở mặt phân cách Ab-Ag (các HÌNH 14A-E). Ngoài ra, COV2-2072 mã hóa cho sequon glycosyl hóa được liên kết N trong HCDR3 (HÌNH 14D), đặc điểm hiếm gặp đối với kháng thể, với việc glycosyl hóa của CDR có thể ảnh hưởng xấu đến sự nhận diện kháng nguyên. Tuy nhiên, cấu trúc COV2-2196 cho thấy rằng HCDR3 được đính bằng disulfua trong kiểu dòng vô tính này được tạo góc ra xa từ vị trí liên kết, giải thích việc làm thế nào mà sự glycosyl hóa HCDR3 hiếm gặp này trong COV2-2072 có thể được dung nạp mà không phải thỏa hiệp sự liên kết (HÌNH 14E).

Các tác giả sáng chế xác định tiếp liệu họ có thể xác định được các tiền chất tiềm năng của kiểu dòng vô tính này công khai trong tập hợp gen biến đổi kháng thể của tế bào B tuần hoàn từ cá thể chưa từng nhiễm SARS-CoV-2 hay không. Các tác giả sáng chế tìm kiếm các gen V(D)J và VJ trong bộ dữ liệu kho toàn diện được mô tả trước đây bắt nguồn từ 3 người cho khỏe mạnh, mà không có tiền sử nhiễm SARS-CoV-2, và trong bộ dữ liệu từ máu dây rốn được thu thập trước dịch COVID-19⁴⁰. Tổng cộng 386, 193, 47, hoặc 7 trình tự chuỗi nặng đối với kiểu dòng vô tính chung phản ứng SARS-CoV-2 được phát hiện lần lượt trong mỗi người cho hoặc kho máu dây rốn (HÌNH 15A). Ngoài ra, các tác giả sáng chế tìm thấy 516,738 trình tự kháng thể người có cùng sự tái tổ hợp V-J chuỗi nhẹ (*IGKV3-20-IGKJ1*01*). Tổng cộng 103.534, 191.039, hoặc 222.165 trình tự chuỗi nhẹ được phát hiện đối với kiểu dòng vô tính chung này lần lượt trong mỗi người cho. Do số lượng lớn của các trình tự, năm

trình tự có mặt nhiều nhất được sắp xếp thẳng hàng từ mỗi người cho. Sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự được tạo ra đối với các trình tự của mỗi người cho bằng cách sử dụng ClustalOmega, và các đồ thị biểu trưng được tạo ra. 5 trình tự hàng đầu với cùng một sự kiện tái tổ hợp trong mỗi người cho là giống nhau, dẫn đến cùng đồ thị biểu trưng (các HÌNH 15A-B).

Các tác giả sáng chế thấy rằng 8 trong số 9 gốc phổ biến quan trọng để liên kết trong kháng thể được mã hóa bởi các trình tự gen dòng mầm, và tất cả đều có mặt ở tất cả 14 thành viên của kiểu dòng vô tính chung được liệt kê ở đây từ bốn nhóm nghiên cứu kháng thể khác nhau (HÌNH 10A). Để đánh giá tầm quan trọng của các dấu hiệu này, chúng biểu hiện kháng thể biến thể với các đột biến điểm trong paratop để xác định tác dụng của sự biến đổi ở các gốc được bảo toàn (HÌNH 10B). Việc làm thay đổi gốc D108 thành A, N, hoặc E có ít tác dụng, nhưng việc loại bỏ liên kết disulfua trong HCDR3 mà làm cứng vững vòng đó làm giảm sự liên kết. Gốc P99 mà hướng vòng HCDR3 ra xa khỏi vị trí tương tác với kháng nguyên cũng quan trọng, vì thể đột biến P99G thể hiện sự liên kết giảm, và dạng hồi biến dòng mầm của COV2-2196 với P99 liên kết với kháng nguyên, nhưng P99G trong mức nền hồi biến dòng mầm thì không (HÌNH 10B).

Kháng thể dựa trên vùng biến đổi COV2-2196 được thử nghiệm kết hợp với kháng thể dựa trên vùng biến đổi COV2-2130 trong thử nghiệm lâm sàng. HCDR3 COV2-2130, với 22 gốc axit amin, là tương đối dài đối với kháng thể người, và bị đột biến mức độ cao từ gen *IGHD3* dòng mầm được suy ra. HCDR3 tạo thành vòng có cấu trúc, dài tạo thành bởi các vòng nhỏ, được làm ổn định bằng cách liên kết hydro phạm vi ngắn và sự tương tác kỵ nước/sự xếp chồng thơm ở trong HCDR3, và được củng cố thêm bằng sự tương tác của nó (liên kết hydro và sự xếp chồng thơm) với các gốc của chuỗi nhẹ (các HÌNH 16A-B). Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ COV2-2130 được mã hóa lần lượt bởi các gen dòng mầm *IGHV3-15* và *IGKV4-1*, và hai gen này mã hóa cho các vòng HCDR2 (10 aa) và LCDR1 (12 aa) được mã hóa dòng mầm dài nhất, mà được sử dụng trong COV2-2130. Sự tái tổ hợp V(D)J chuỗi nặng, các đột biến HCDR3, và sự bắt cặp của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ dẫn đến khe liên kết giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, ăn khớp hình dạng của vùng RBD có trọng tâm ở vòng S443 – Y449 (HÌNH 9A, HÌNH 16C). Có liên quan chặt chẽ với các dấu hiệu cấu trúc này là, chỉ HCDR3, LCDR1, HCDR2, và LCDR2 tham gia vào sự tạo thành paratop (các HÌNH 9E-F, các

HÌNH 13E-F). Kiểm tra mặt phân cách Ab-Ag khám phá ra vùng mà có khả năng là dùng nhiều năng lượng sự tương tác. Chuỗi bên gốc K444 của RBD được bao quanh bởi vòng con Y104 – V109 của vòng HCDR3, và điện tích dương trên nguyên tử NZ chuỗi bên được trung hòa bằng chuỗi bên gốc D107 của HCDR3, ba nguyên tử oxy carbonyl chuỗi chính từ Y105, D107, và V109, và mặt giàu điện tử của vòng phenyl Y104 (sự tương tác cation- π) (HÌNH 13E). Vì các nguyên tử tương tác được bảo vệ hoàn toàn khỏi dung môi, sự tương tác tập trung cao ở trong không gian hạn chế này thuận lợi về mặt năng lượng. Ngoài ra, "điểm nóng" của mặt phân cách Ab-Ag được bao quanh bởi hoặc được bảo vệ khỏi dung môi bằng sự tương tác Ab-Ag với sự tăng năng lượng tự do ít hơn, bao gồm cầu muối giữa gốc RBD R346 và D56 HCDR2, sự tương tác tĩnh điện giữa RBD R346 và oxy chuỗi chính của Y106 HCDR3, liên kết hydro giữa N450 RBD và oxy chuỗi chính Y105 HCDR3, liên kết hydro giữa oxy chuỗi chính V445 RBD và chuỗi bên Y104 HCDR3, sự tương tác kỵ nước giữa chuỗi bên V445 và chuỗi bên của L113 và F118 HCDR3 (HÌNH 13E). Ngoài ra, sự xếp chồng thơm giữa gốc Y105 HCDR3 và gốc W56 LCDR2 tham gia vào sự che chắn của "điểm nóng" khỏi dung môi (HÌNH 13E). Ngoài ra, chuỗi nhẹ COV2-2130 LCDR1 và LCDR2 tạo ra sự tiếp xúc rộng với RBD. Trong số chúng, chuỗi bên S32 LCDR1, oxy chuỗi chính S33, chuỗi bên N34, và chuỗi bên Y55 LCDR2 tạo thành liên kết hydro với chuỗi bên E484 RBD, nitơ chuỗi chính S494, oxy chuỗi chính Y449, và nitơ chuỗi chính G446 (HÌNH 13F). Các gốc LCDR1 K36, Y38, và LCDR2 W56 tương tác với RBD Y449 thông qua sự xếp chồng thơm và sự tương tác cation- π , tạo thành "cụm tương tác" (HÌNH 13F), mặc dù các tương tác này có khả năng là không mạnh như trong trường hợp của RBD K444.

Trong cấu trúc tinh thể của RBD trong phức hợp với cả hai COV2-2196 và COV2-2130, các tác giả sáng chế thấy sự tương tác giữa các Fab COV2-2196 và COV2-2130 nằm gần nhau về mặt không gian (HÌNH 17). Có thể là sự tương tác giữa hai Fab trong trạng thái liên kết RBD có thể góp phần vào sự trung hòa hiệp đồng của SARS-CoV-2 được quan sát thấy trước đây¹. Tuy nhiên, không rõ là tác dụng hiệp đồng đóng góp vào sự tương tác Fab-Fab này bao nhiêu.

To better understand the RBD sites critical for binding of COV2-2196 và COV2-2130, the inventors used a deep mutational scanning (DMS) approach to map all mutations to the RBD that escape antibody binding⁴¹; (FIG. 18). For both

antibodies, they identified several key sites, all trong the antibody structural footprint, where RBD mutations strongly disrupted binding (FIGS. 11A-D). The inventors leveraged our previous work quantifying the effects of RBD mutations on ACE2 binding⁴² to overlay the effect on ACE2 binding for mutations that abrogated antibody binding to RBD (FIGS. 11A-B). Đối với COV2-2196, many mutations to F486 và N487 had escape fractions approaching 1 (*i.e.*, those RBD variants completely escaped antibody binding under the conditions tested), reinforcing the importance of the contributions of these two residues to antibody binding. Similarly, for COV2-2130, mutation at site K444 to any of the other 19 amino acids abrogated antibody binding, indicating that the lysine at this position is critical to the Ab-Ag interaction.

Nevertheless, not all antibody contact residues were identified as sites where mutations greatly reduced binding. Several explanations are possible: 1) some binding site residues may be not critical for binding, 2) some residues may use their backbone atoms to interact with their side chain pointing away from the binding interface, hoặc 3) mutations to some sites may not be tolerated⁴². For instance, residues L455, F456, và Q493 are part of the structurally-defined binding site for COV2-2196 (FIG. 8D), but mutations to these sites did not impact antibody binding detectably (FIGS. 11A và 11C), suggesting that these residues do not make critical binding contributions. Superimposition of the COV2-2196/RBD structure onto the S2E12/RBD structure clearly demonstrates a flexible hinge region between the RBD ridge và the rest of the RBD that is maintained when antibody is bound (FIG. 13D). This finding indicates that mutations at these three positions could be well tolerated for Ab-Ag binding và supports the non-essential nature of these particular residues for COV2-2196 hoặc S2E12 binding.

Importantly, COV2-2196 và COV2-2130 do not compete for binding to the RBD¹, suggesting they could comprise an escape-resistant cocktail for prophylactic hoặc therapeutic use. Indeed, the structural binding sites và escape variant maps for these two antibodies are non-overlapping. To test whether there were single mutations that could escape binding of both antibodies, the inventors performed escape variant mapping experiments with a 1:1 mixture of the COV2-2196 và COV2-2130 antibodies, but they did not detect any mutation that had an escape fraction of greater

than 0,2, whereas the mutations with the largest effects for each of the single antibodies was approximately 1 (FIG. 18D).

Although these experiments map all mutations that escape antibody binding to the RBD, the inventors also sought to determine which mutations have the potential to arise during viral growth. To address this question, they first attempted to select escape mutations using a recombinant VSV expressing the SARS-CoV-2 S glycoprotein (VSV-SARS-CoV-2)⁴³; (HÌNH 11E). The inventors expected that the only amino acid mutations that would be selected during viral growth were those 1) arising by single-nucleotide RNA changes, 2) causing minimal deleterious effect on ACE2 binding và expression, và 3) substantially impacting antibody binding^{41,42}. Indeed, the inventors did not detect any COV2-2196-induced mutations that were both single-nucleotide accessible và relatively well-tolerated with respect to effects on ACE2 binding (FIG. 11B), which may explain why escape mutants were not selected trong any of the 88 independent replicates of recombinant VSV growth trong the presence of antibody (FIG. 11E, HÌNH 18G). For COV2-2130, mutations to site K444, a site that is relatively tolerant to mutation⁴², demonstrated the most frequent escape of antibody binding trong the high-throughput antibody escape selection with the VSV chimeric virus. Trong 40% of the antibody selection experiments, two of the single-nucleotide mutations with the greatest effects on antibody binding, K444R (selected trong 6 out of 20 bản sao) và K444E (được chọn lọc ở 2 trong số 20 bản sao) nổi lên trong quá trình sinh trưởng virus (HÌNH 11E, HÌNH 18G).

Để thăm dò tính kháng với virus lây nhiễm nguyên bản, chủng SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 được cấy chuyển theo dãy trong môi trường nuôi cấy đơn lớp tế bào Vero với kháng thể lâm sàng dựa trên COV2-2196 (AZD8895), COV2-2130 (AZD1061) hoặc dạng kết hợp 1:1 của chúng (AZD7442), ở nồng độ bắt đầu ở giá trị IC₅₀ tương ứng của chúng và tăng từng bậc đến giá trị IC₉₀ của chúng với mỗi lần cấy chuyển (HÌNH 19). Để làm đối chứng, virus được cấy chuyển khi không có kháng thể. Sau lần cấy chuyển cuối cùng, virus được đánh giá về tính miễn cảm chống lại kháng thể nghịch đảo ở nồng độ cuối cùng bằng 10 lần nồng độ IC₉₀ bằng thử nghiệm mảng. Các tác giả sáng chế không phát hiện ra mảng bất kỳ kháng với sự trung hòa bằng AZD8895 (dựa trên COV2-2196) hoặc hỗn hợp AZD7442. Virus mà được cấy chuyển theo dãy trong AZD1061 tạo thành các mảng đến độ chuẩn bằng $1,2 \times 10^7$ pfu/ml

trong sự có mặt của 10 lần nồng độ giá trị IC_{90} của AZD1061, nhưng các mảng không được tạo thành với AZD7442. Các mảng ($n=6$) được chọn lọc ngẫu nhiên, và gen mã hóa cho gai virus của chúng được xác định trình tự, khám phá ra cùng một sự thay đổi 3 axit amin ở cả 6 mảng được chọn lọc và được xác định trình tự độc lập: N74K, R346I và S686G (HÌNH 11F). Sự thay đổi S686G đã được báo cáo trước đây là kết hợp với sự cấy chuyển theo dây của SARS-CoV-2 ở tế bào Vero⁴⁴, được phân lập từ nghiên cứu thử thách ở chồn sương⁴⁵ hoặc NHP⁴⁶, và được dự đoán là làm giảm hoạt tính furin⁴⁴. Góc N74K nằm trong miền đầu tận cùng N bên ngoài vị trí liên kết AZD1061 và dẫn đến sự mất đi của glycan⁴⁷. Góc R346I nằm trong vị trí liên kết của AZD1061 và có thể liên quan đến tính kháng AZD1061. Sự ảnh hưởng của sự thay đổi R346I lên AZD1061 (COV2-2130) liên kết với protein S được thể hiện trên HÌNH 11G. Các đột biến thể K444R và K444E được chọn lọc trong hệ thống VSV-SARS-CoV-2 và đột biến thể R346I được chọn lọc bằng sự cấy chuyển với SARS-CoV-2 nguyên bản có thể tiếp cận được bằng đột biến thể nucleotit đơn lẻ và bảo toàn hoạt tính liên kết ACE2 (HÌNH 11G), chỉ ra rằng phân tích DMS của chúng tôi đã dự đoán các đột biến được chọn lọc trong sự có mặt của kháng thể COV2-2130. Cùng nhau, các kết quả này lập bản đồ toàn diện các tác dụng của tất cả các đột biến thể axit amin trên sự liên kết của COV2-2196 và COV2-2130 và xác định các vị trí của lo ngại có thể có về sự tiến hóa virus. Điều đó nói lên rằng, biến thể chứa các đột biến ở các góc K444 và R346 là hiếm gặp trong số tất cả virus được xác định trình tự có mặt trong cơ sở dữ liệu GISAID (đều $\leq 0,01\%$ khi truy cập vào 12/23/20).

Gần đây, biến thể virus có khả năng lây truyền tăng lên và các đột biến kháng nguyên tiềm năng đã được báo cáo trong các thể phân lập lâm sàng⁴⁸⁻⁵¹. Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm liệu một số góc biến thể trong các chủng mới nổi nhanh chóng này có triệt tiêu hoạt tính của kháng thể trung hòa hiệu nghiệm hay không. Họ đã thử nghiệm thể phân lập virus từ mẫu mũi thu được ở Oxford ở Vương Quốc Anh (virus B.1.1.7 được đặt tên là UK B.1.1.7-OXF), mà chứa dòng B.1.1.7 xác định sự thay đổi gen gai bao gồm các đột biến mất 69-70 và 144-145 trong NTD, và các đột biến thể ở N501Y, A570D, D614G, và P681H⁴⁹. Các tác giả sáng chế cũng đã thử nghiệm các biến thể D614G và E484K cùng nguồn gốc trong mức nền chủng WA-1 (2019n-CoV/USA_WA1/2019, [WA-1]), tất cả được điều chế dưới dạng virus SARS-CoV-2 nguyên bản và được sử dụng trong thử nghiệm trung hòa làm giảm ổ tập trung⁴³. Đột

biến E484K được đặc biệt quan tâm, vì gốc này nằm ở trong 4,5 Å của mỗi mAb trong phức hợp của Fab và RBD, mặc dù ở ngoài cùng đầu chân Fab, có mặt trong các dòng mới nổi B.1.351 (501Y.V2)⁵⁰ và P.1 (501Y.V3)⁵¹, và đã được chứng minh là làm thay đổi sự liên kết của một số kháng thể đơn dòng^{52,53} cũng như là kháng thể huyết thanh đa dòng người⁵⁴. Biến thể chứa E484K cũng đã được chứng minh là được trung hòa ít hơn một cách hiệu quả bằng huyết thanh và huyết tương đang hồi phục từ những người sống sót sau khi nhiễm SARS-CoV-2^{55,56}. Đối với COV2-2196, COV2-2130, và COV2-2050 (kháng thể trung hòa thứ ba các tác giả sáng chế bao gồm để so sánh vì nó tương tác với gốc E484), họ đã phát hiện ra gần như không ảnh hưởng đến của đột biến D614G hoặc tập hợp đột biến có mặt trong chủng UK B.1.1.7-OCF; nếu có, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy xu hướng về phía được cải thiện một chút (giảm từ 2 đến 3 lần ở giá trị IC₅₀) chống lại virus tuần hoàn muộn hơn (HÌNH 11H). Tuy nhiên, họ không quan sát thấy tác dụng trên sự trung hòa với virus D614G/E484K. COV2-2050 mất hoàn toàn hoạt tính trung hòa, thống nhất với nghiên cứu trước đây của chúng tôi xác định E484K là đột biến phá hủy sự liên kết COV2-2050⁴¹. Ngược lại, COV2-2196, COV2-2130, và COV2-2196 + COV2-2130 chỉ thể hiện khả năng ức chế giảm đi một chút (tăng từ 2 đến 5 lần ở giá trị IC₅₀).

Thảo Luận. Các phân tích cấu trúc này xác định cơ sở phân tử để chọn lọc thường xuyên kiểu dòng vô tính chung của kháng thể người có chung sự tái tổ hợp V-D-J chuỗi nặng và V-J chuỗi nhẹ mà nhắm đích cùng một vùng của RBD S SARS-CoV-2. Các gốc được mã hóa bằng gen kháng thể dòng mầm trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đóng vai trò sống còn trong sự nhận diện kháng nguyên, gợi ý rằng một số ít đột biến sinh dưỡng là cần thiết đối với sự trưởng thành kháng thể của kiểu dòng vô tính này. Liên kết disulfua được mã hóa bởi gen *IGHD2* tạo ra sự kiểm chế bổ sung đối với HCDR3 để chấp nhận hình dáng với hình dạng và sự bổ sung hóa học với vị trí kháng nguyên trên RBD. Dường như là ba gen *IGHD2* khác nhau (*IGHD2-2*, *IGHD2-8*, và *IGHD2-15*) mã hóa cho các phần của HCDR3 mà có thể hoạt động trong trường hợp của kiểu dòng vô tính này. Các tác giả sáng chế gợi ý rằng sự xuất hiện này của kháng thể được mã hóa bởi gen dòng mầm chung với các dấu hiệu cấu trúc đã được định hình từ trước giúp cho có được độ đặc hiệu cao và hoạt tính trung hòa hiệu nghiệm là dấu hiệu bất ngờ và có lợi của đáp ứng miễn dịch người sơ cấp với SARS-CoV-2. Sự chọn lọc tế bào B từ kiểu dòng vô tính chung này giúp cho có thể phân lập

nhánh kháng thể trung hòa cực kỳ hiệu nghiệm mà chống lại sự trốn thoát và có thể giải thích cho một phần của hiệu quả đáng chú ý của vắc xin dựa trên protein S mà được quan sát thấy trong lâm sàng. Người ta có thể lường tượng ra cơ hội để gây tạo ra độ chuẩn kháng thể trung hòa huyết thanh với hiệu lực trung hòa thậm chí là cao hơn bằng cách sử dụng thiết kế vắc xin dựa trên miền hoặc mô típ đối với vị trí kháng nguyên này để mời cho đáp ứng miễn dịch người để gây tạo ra kiểu dòng vô tính này.

Phân tích cấu trúc của các phức hợp RBD-COV2-2196 và RBD-COV2-2130 được thể hiện ở đây gợi ý rằng hai kháng thể liên kết với kháng nguyên RBD bằng cách tạo thành sự tương tác "giống đinh tán" với mật độ năng lượng cao cho mỗi đơn vị của diện tích bề mặt phân cách, và phát hiện này giải thích kháng thể hiệu nghiệm này có thể có diện tích bề mặt được che giấu tương đối nhỏ ($< 750 \text{ \AA}^2$) trong mặt phân cách Ab-Ag như thế nào. Việc lập bản đồ của các đột biến trốn thoát đối với hai kháng thể được nghiên cứu ở đây được chỉ ra các locut của các đột biến trốn thoát thống nhất với vị trí liên kết xác định bởi cấu trúc tinh thể Ab-Ag của chúng tôi, xác nhận thêm sự chính xác của phương pháp DMS. Các tác giả sáng chế gợi ý rằng dữ liệu phân đoạn trốn thoát có thể được sử dụng trong tương lai làm sự ràng buộc cho sự lắp ghép tính toán của kháng thể trên kháng nguyên hoặc thông thường hơn là protein trên protein, vì ví dụ như, các gốc K444 hoặc F486 với các phân đoạn trốn thoát cao nhất lần lượt đối với COV2-2130 hoặc COV2-2196, thể hiện sự tương tác mạnh mẽ nhất với kháng thể trong cấu trúc của phức hợp kháng nguyên-kháng thể.

Sự nổi lên gần đây của các dòng virus biến thể có khả năng lây truyền tăng lên và các trình tự đã được thay đổi ở nhiều vị trí đã biết của sự trung hòa gây lo ngại về khả năng của SARS-CoV-2 tránh khỏi biện pháp đối phó bằng kháng thể hiện nay đang được phát triển và thử nghiệm. Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm hoạt tính của kháng thể và hỗn hợp của cả hai và phát hiện ra hoạt tính được duy trì chống lại một vài biến thể quan trọng, bao gồm virus chứa đột biến E484K và virus B.1.1.7 có nhiều biến đổi gen S. Cơ sở di truyền và cấu trúc đối với hoạt tính rộng này được phát hiện ra trong cấu trúc tinh thể và nghiên cứu DMS mà các tác giả sáng chế trình bày ở đây. Sự nhận diện trọng tâm của gốc F486 tương đối không thay đổi bằng miền "lòng thỏ" trong COV2-2196 là có lợi, vì sự thay đổi của gốc này liên quan đến sự vừa vặn của virus giảm đi. Việc nhắm đích vị trí liên kết này dường như là đặc biệt hữu hiệu trong việc thiết lập sự trung hòa hiệp đồng ở dạng kết hợp với mAb COV2-2130 mà

nhận diện cả hai trime S "mở" và "đóng". Do đó, dạng kết hợp này dường như mang lại cơ chế rộng và hiệu nghiệm của sự ức chế mà cản trở trốn thoát.

Bảng Dữ Liệu Mở Rộng 1. Thu thập dữ liệu và thống kê tinh về tinh thể của các phức hợp RBD-COV2-2196 và RBD-COV2-2196-2130

Thu thập dữ liệu		
Tinh thể	RBD-COV2-2196	RBD-COV2-2196-2130
PDB ID	7L7D	7L7E
Chiều Dài Bước Sóng (Å)	0,97872	0,97857
Nhóm không gian	P2 ₁	P2 ₁
Kích thước tế bào đơn vị		
a, b, c (Å)	44,1, 81,6, 101,2	97,2, 152,5, 199,2
α , β , γ	90,0, 96,6, 90,0	90,0, 94,7, 90,0
Độ phân giải (Å)	43,98 – 2,50	35,21 – 3,00
Độ phản xạ đơn nhất	24896 (13417)	115751 (16908)
Độ nhiễu	3,7 (3,7)	7,7 (7,7)
Tính hoàn chỉnh (%)	99,9 (99,6)	99,9 (100)
R _{gộp} (%)	4,6 (24,5)	23,1 (81,0)
I/ σ (I)	19,2 (4,8)	6,4 (2,3)
Thống kê tinh		
R _{yếu tố} (%)	18,5	21,5
R _{tự do} (%)	23,1	27,3
R.m.s.d (liên kết) (%)	0,0030	0,0023

R.m.s.d (góc) (độ)	0,563	0,598
Đồ thị Ramachandran		
Được ưu tiên (%)	95,82	95,34
Được cho phép (%)	4,18	4,37
Khoảng lệch (%)	0,00	0,09

$R_{\text{góp}} = \sum \sum |I_{\text{hkl}} - I_{\text{hkl(j)}}| / \sum I_{\text{hkl}}$, trong đó $I_{\text{hkl(j)}}$ là cường độ được quan sát thấy và I_{hkl} là cường độ trung bình cộng cuối cùng.

$R_{\text{hoạt động}} = \sum ||\text{Fobs}| - |\text{Fcalc}|| / \sum ||\text{Fobs}|$ và $R_{\text{tự do}} = \sum ||\text{Fobs}| - |\text{Fcalc}|| / \sum |\text{Fobs}|$, trong đó $R_{\text{tự do}}$ và $R_{\text{hoạt động}}$ được tính bằng cách sử dụng lần lượt bộ thử nghiệm được chọn ngẫu nhiên của 5% dữ liệu và tất cả các độ phản xạ ngoại trừ bộ thử nghiệm 5%. Số lượng trong ngoặc là đối với lớp vỏ phản xạ cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO ĐỐI VỚI CÁC VÍ DỤ 1 VÀ 2

1. ter Meulen, J., *et al.* Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet* 363, 2139-2141 (2004).
2. Zhou, P., *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270-273 (2020).
3. Robbiani, D.F., *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 infection in convalescent individuals. *bioRxiv*, 2020.2005.2013.092619 (2020).
4. Brouwer, P.J.M., *et al.* Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *bioRxiv*, 2020.2005.2012.088716 (2020).
5. Niu, P., *et al.* Ultrapotent human neutralizing antibody repertoires against Middle East Respiratory Syndrome coronavirus from a recovered patient. *J Infect Dis* 218, 1249-1260 (2018).

6. Wang, L., *et al.* Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape. *J Virol* 92, e02002-17 (2018).

TÀI LIỆU THAM KHẢO ĐỐI VỚI CÁC VÍ DỤ 3 VÀ 4

- 1 Zost, S. J. *et al.* Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature* 584, 443-449, doi:10.1038/s41586-020-2548-6 (2020).
- 2 Yuan, M. *et al.* Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. *Science* 369, 1119-1123, doi:10.1126/science.abd2321 (2020).
- 3 Nielsen, S. C. A. *et al.* Human B Cell Clonal Expansion and Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 28, 516-525 e515, doi:10.1016/j.chom.2020.09.002 (2020).
- 4 Robbiani, D. F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* 584, 437-442, doi:10.1038/s41586-020-2456-9 (2020).
- 5 Brouwer, P. J. M. *et al.* Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science* 369, 643-650, doi:10.1126/science.abc5902 (2020).
- 6 Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7 (2020).
- 7 Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382, 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017 (2020).
- 8 Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271-280 e278, doi:10.1016/j.cell.2020.02.052 (2020).
- 9 Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* 5, 562-569, doi:10.1038/s41564-020-0688-y (2020).

- 10 Wahba, L. *et al.* An Extensive Meta-Metagenomic Search Identifies SARS-CoV-2-Homologous Sequences in Pangolin Lung Viromes. *mSphere* 5, doi:10.1128/mSphere.00160-20 (2020).
- 11 Walls, A. C. *et al.* Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 11157-11162, doi:10.1073/pnas.1708727114 (2017).
- 12 Algaissi, A. *et al.* SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients. *Sci Rep* 10, 16561, doi:10.1038/s41598-020-73491-5 (2020).
- 13 Long, Q. X. *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 26, 845-848, doi:10.1038/s41591-020-0897-1 (2020).
- 14 Piccoli, L. *et al.* Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2020.09.037 (2020).
- 15 Cao, Y. *et al.* Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. *Cell* 182, 73-84 e16, doi:10.1016/j.cell.2020.05.025 (2020).
- 16 Hansen, J. *et al.* Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science* 369, 1010-1014, doi:10.1126/science.abd0827 (2020).
- 17 Ju, B. *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* 584, 115-119, doi:10.1038/s41586-020-2380-z (2020).
- 18 Liu, L. *et al.* Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 584, 450-456, doi:10.1038/s41586-020-2571-7 (2020).
- 19 Rogers, T. F. *et al.* Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science* 369, 956-963, doi:10.1126/science.abc7520 (2020).
- 20 Shi, R. *et al.* A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature* 584, 120-124, doi:10.1038/s41586-020-2381-y (2020).

- 21 Weitkamp, J. H. *et al.* Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires. *J Immunol* 171, 4680-4688, doi:10.4049/jimmunol.171.9.4680 (2003).
- 22 Benton, D. J. *et al.* Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2772-0 (2020).
- 23 Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).
- 24 Wrobel, A. G. *et al.* SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nat Struct Mol Biol* 27, 763-767, doi:10.1038/s41594-020-0468-7 (2020).
- 25 Zost, S. J. *et al.* Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Med* 26, 1422-1427, doi:10.1038/s41591-020-0998-x (2020).
- 26 Tian, C. *et al.* Immunodominance of the VH1-46 antibody gene segment in the primary repertoire of human rotavirus-specific B cells is reduced in the memory compartment through somatic mutation of nondominant clones. *J Immunol* 180, 3279-3288, doi:10.4049/jimmunol.180.5.3279 (2008).
- 27 Wu, X. *et al.* Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 333, 1593-1602, doi:10.1126/science.1207532 (2011).
- 28 Zhou, T. *et al.* Structural Repertoire of HIV-1-Neutralizing Antibodies Targeting the CD4 Supersite in 14 Donors. *Cell* 161, 1280-1292, doi:10.1016/j.cell.2015.05.007 (2015).
- 29 Huang, C. C. *et al.* Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1 coreceptor-binding site on gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2706-2711, doi:10.1073/pnas.0308527100 (2004).
- 30 Williams, W. B. *et al.* HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science* 349, aab1253, doi:10.1126/science.aab1253 (2015).

- 31 Joyce, M. G. *et al.* Vaccine-Induced Antibodies that Neutralize Group 1 and Group 2 Influenza A Viruses. *Cell* 166, 609-623, doi:10.1016/j.cell.2016.06.043 (2016).
- 32 Pappas, L. *et al.* Rapid development of broadly influenza neutralizing antibodies through redundant mutations. *Nature* 516, 418-422, doi:10.1038/nature13764 (2014).
- 33 Sui, J. *et al.* Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol* 16, 265-273, doi:10.1038/nsmb.1566 (2009).
- 34 Wheatley, A. K. *et al.* H5N1 Vaccine-Elicited Memory B Cells Are Genetically Constrained by the IGHV Locus in the Recognition of a Neutralizing Epitope in the Hemagglutinin Stem. *J Immunol* 195, 602-610, doi:10.4049/jimmunol.1402835 (2015).
- 35 Bailey, J. R. *et al.* Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *JCI Insight* 2, doi:10.1172/jci.insight.92872 (2017).
- 36 Giang, E. *et al.* Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6205-6210, doi:10.1073/pnas.1114927109 (2012).
- 37 Rappuoli, R., Bottomley, M. J., D'Oro, U., Finco, O. & De Gregorio, E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med* 213, 469-481, doi:10.1084/jem.20151960 (2016).
- 38 Tortorici, M. A. *et al.* Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms. *Science*, doi:10.1126/science.abe3354 (2020).
- 39 Kreer, C. *et al.* Longitudinal Isolation of Potent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients. *Cell* 182, 843-854 e812, doi:10.1016/j.cell.2020.06.044 (2020).
- 40 Soto, C. *et al.* High frequency of shared clonotypes in human B cell receptor repertoires. *Nature* 566, 398-402, doi:10.1038/s41586-019-0934-8 (2019).

- 41 Greaney, A. J. *et al.* Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain that escape antibody recognition. *Cell Host Microbe*, doi:10.1016/j.chom.2020.11.007 (2020).
- 42 Starr, T. N. *et al.* Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell* 182, 1295-1310 e1220, doi:10.1016/j.cell.2020.08.012 (2020).
- 43 Case, J. B. *et al.* Neutralizing antibody and soluble ACE2 inhibition of a replication-competent VSV-SARS-CoV-2 and a clinical isolate of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 28, 475-485 e475, doi:10.1016/j.chom.2020.06.021 (2020).
- 44 Klimstra, W. B. *et al.* SARS-CoV-2 growth, furin-cleavage-site adaptation and neutralization using serum from acutely infected hospitalized COVID-19 patients. *J Gen Virol* 101, 1156-1169, doi:10.1099/jgv.0.001481 (2020).
- 45 Sawatzki, K. *et al.* Ferrets not infected by SARS-CoV-2 in a high-exposure domestic setting. *bioRxiv*, 2020.2008.2021.254995, doi:10.1101/2020.08.21.254995 (2020).
- 46 Baum, A. *et al.* REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science* 370, 1110-1115, doi:10.1126/science.abe2402 (2020).
- 47 Li, Q. *et al.* The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell* 182, 1284-1294 e1289, doi:10.1016/j.cell.2020.07.012 (2020).
- 48 Galloway, S. E. *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 70, 95-99, doi:10.15585/mmwr.mm7003e2 (2021).
- 49 Leung, K., Shum, M. H., Leung, G. M., Lam, T. T. & Wu, J. T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill* 26, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106 (2021).

- 50 Tegally, H. *et al.* Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *medRxiv*, 2020.2012.2021.20248640, doi:10.1101/2020.12.21.20248640 (2020).
- 51 Voloch, C. M. *et al.* Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *medRxiv*, 2020.2012.2023.20248598, doi:10.1101/2020.12.23.20248598 (2020).
- 52 Liu, Z. *et al.* Landscape analysis of escape variants identifies SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *bioRxiv*, 2020.2011.2006.372037, doi:10.1101/2020.11.06.372037 (2021).
- 53 Weisblum, Y. *et al.* Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife* 9, doi:10.7554/eLife.61312 (2020).
- 54 Greaney, A. J. *et al.* Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies. *bioRxiv*, 2020.2012.2031.425021, doi:10.1101/2020.12.31.425021 (2021).
- 55 Wibmer, C. K. *et al.* SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *bioRxiv*, 2021.2001.2018.427166, doi:10.1101/2021.01.18.427166 (2021).
- 56 Andreano, E. *et al.* SARS-CoV-2 escape *in vitro* from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *bioRxiv*, 2020.2012.2028.424451, doi:10.1101/2020.12.28.424451 (2020).
- 57 Huo, J. *et al.* Neutralization of SARS-CoV-2 by destruction of the prefusion spike. *Cell Host Microbe* 28, 445-454 e446, doi:10.1016/j.chom.2020.06.010 (2020).
- 58 Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125-132, doi:10.1107/S0907444909047337 (2010).
- 59 Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 235-242, doi:10.1107/S0907444910045749 (2011).

- 60 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658-674, doi:10.1107/S0021889807021206 (2007).
- 61 Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221, doi:10.1107/S0907444909052925 (2010).
- 62 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132, doi:10.1107/S0907444904019158 (2004).
- 63 Schrodinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8* (2015).
- 64 Cornwell, O., Radford, S. E., Ashcroft, A. E. & Ault, J. R. Comparing hydrogen deuterium exchange and fast photochemical oxidation of proteins: a structural characterisation of wild-type and deltaN6 beta2-microglobulin. *J Am Soc Mass Spectrom* 29, 2413-2426, doi:10.1007/s13361-018-2067-y (2018).
- 65 Starr, T. N. *et al.* Prospective mapping of viral mutations that escape antibodies used to treat COVID-19. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.11.30.405472 (2020).
- 66 Otwinowski, J., McCandlish, D. M. & Plotkin, J. B. Inferring the shape of global epistasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E7550-E7558, doi:10.1073/pnas.1804015115 (2018).
- 67 Plante, J. A. *et al.* Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2895-3 (2020).
- 68 Xie, X. *et al.* An infectious cDNA clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 27, 841-848 e843, doi:10.1016/j.chom.2020.04.004 (2020).

Bảng A – Dữ Liệu Hoạt Tính

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM LIÊN KẾT				KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM TRUNG HÒA						
ELISA - IgG được tinh chế (OD 450nm)				(thử nghiệm định lượng Có/Không, hoặc giá trị IC50 (ng/ml))						
ID dòng (COV2-xxxx)	Trime Gai SARS-CoV-2	RBD SARS-CoV-2	NTD SARS-CoV-2	Trime Gai SARS-CoV?	Phong bế hACE2	Thử nghiệm trung hòa SARS-CoV-2 (trở kháng tế bào)		Thử nghiệm làm giảm ổ tập trung SARS-CoV-2	Thử nghiệm làm giảm vi rút nano-luciferaza	
						Định tính	IC50 ước tính		SARS-CoV-2	SARS
2196	4,2	4,2	0,05	0,09	Có		không được thử nghiệm	29	<100	không được thử nghiệm
2838	3,67	3,62	0,12	0,21	không được thử	Có	<60	14	không được	không được

						nghiệm			thử nghiệm	thử nghiệm
2952	3,54	3,55	0,1	0,15	không được thử nghiệm	Có	>304	89	NT	không được thử nghiệm
2514	3,56	3,56	0,09	3,6	không được thử nghiệm	Có	<200	84	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm
2165	4,2	4,2	0,05	0,17	không được thử nghiệm	Có	không được thử nghiệm	185	<400	không được thử nghiệm
2391	3,57	3,65	0,1	0,1	không được thử nghiệm	Có	<600	45	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm

3025	3,70	3,70	NT	0,21	Có	Có	không được thử nghiệm	31	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm
2094	4,3	4,3	0,1	4,1	Có	Có	không được thử nghiệm	151	<50	>1,000
2096	4,3	4,3	0,12	0,11	Có	Có	không được thử nghiệm	290	<200	không được thử nghiệm
2130	4,3	4,2	0,18	0,1	Có	Có	không được thử nghiệm	121	<100	không được thử nghiệm

Ví dụ 5: Kháng thể người trung hòa hiệu nghiệm mà phong bế sự liên kết thụ thể SARS-CoV-2 và bảo vệ động vật

TÁC GIẢ: Seth J. Zost^{1*}, Pavlo Gilchuk^{1*}, James Brett Case³, Elad Binshtein¹, Rita E. Chen^{2,3}, Joseph X. Reidy¹, Andrew Trivette¹, Rachel S. Nargi¹, Rachel E. Sutton¹, Naveenchandra Suryadevaral¹, Lauren E. Williamson⁴, Elaine C. Chen⁴, Taylor Jones¹, Samuel Day¹, Luke Myers¹, Ahmed O. Hassan³, Natasha M. Kafai^{2,3}, Emma S. Winkler^{2,3}, Julie M. Fox³, James J. Steinhardt⁶, Kuishu Ren⁷, Yueh-Ming Loo⁷, Nicole L. Kallewaard⁷, David R. Martinez⁵, Alexandra Schäfer⁵, Lisa E. Gralinski⁵, Ralph S. Baric⁵, Larissa B. Thackray³, Michael S. Diamond^{2,3,8,9}, Robert H. Carnahan^{1,10**}, James E. Crowe, Jr.^{1,4,10**}

Tổ chức tham gia:

¹Vanderbilt Vaccine Center, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, 37232, USA

²Department of Pathology & Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, 63110, USA

³Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, 63110, MO, USA ⁴Department of Pathology, Microbiology, and Immunology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, 37232, USA

⁵Department of Epidemiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, 27599, USA

⁶Antibody Discovery and Protein Engineering, BioPharmaceuticals R&D, AstraZeneca, Gaithersburg, Maryland, 20878, USA

⁷Microbial Sciences, BioPharmaceuticals R&D, AstraZeneca, Gaithersburg, Maryland, 20878, USA

⁸Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, 63110, USA

⁹Andrew M. and Jane M. Bursky Center for Human Immunology and Immunotherapy Programs, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, 63110, USA

10Department of Pediatrics, Vanderbilt University Medical Center, Nashville,
TN, 37232, USA

Thông tin liên hệ:

James E. Crowe, Jr., M.D. [*NGƯỜI LIÊN HỆ ĐẦU MỐI*]

Departments of Pediatrics, Pathology, Microbiology, and Immunology, and the
Vanderbilt Vaccine Center

Địa chỉ gửi thư:

Vanderbilt Vaccine Center

11475 Medical Research Building IV

2213 Garland Avenue

Nashville, TN 37232-0417, USA

Điện thoại (615) 343-8064

Email james.crowe@vumc.org

Chú Thích Cuối Trang Tiêu Đề Bỏ Sung

* Các tác giả này đóng góp ngang nhau

**Các tác giả liên hệ

Từ khóa: Coronavirus; SARS-CoV-2; SARS-CoV; COVID-19; Kháng thể, Đơn dòng;
Người; Miễn Dịch Thích Ứng.

Dịch COVID-19 là đe dọa chính cho y tế toàn cầu mà chỉ có các biện pháp ứng phó y tế hạn chế đối với nó, và chúng ta thiếu hiểu biết thấu đáo về cơ chế của miễn dịch dịch thể^{1,2}. Từ bảng của kháng thể đơn dòng (mAb) nhắm đích gai

Glycoprotein (S) được phân lập từ tế bào B của đối tượng bị lây nhiễm, chúng tôi đã nhận diện một vài mAb mà thể hiện hoạt tính trung hòa hiệu nghiệm với giá trị IC₅₀ thấp bằng 0,9 hoặc 15 ng/ml lần lượt ở thử nghiệm trung hòa SARS-CoV-2 virus giả hoặc kiểu dại (*wt*). mAb hiệu nghiệm nhất phong bế đầy đủ miền liên kết thụ thể của S (SRBD) khỏi tương tác với ACE2 người. Các nghiên cứu liên kết cạnh tranh, cấu trúc,

và chức năng cho phép kết cụm mAb vào các lớp xác định nhận diện các epitop khác biệt ở trong các vị trí kháng nguyên chính trên SRBD. Nghiên cứu bằng kính hiển vi điện tử phát hiện ra rằng các mAb này nhận diện các trạng thái hình dạng khác biệt của protein S dạng trime. mAb trung hòa hiệu nghiệm nhận diện các vị trí độc nhất, COV2-2196 và COV2-2130, được liên kết đồng thời với S và trung hòa hiệp đồng virus SARS-CoV-2 nguyên bản. Trong hai mô hình chuột nhất của sự nhiễm SARS-CoV-2, việc chuyển thụ động của COV2-2196 hoặc COV2-2130 một mình hoặc dạng kết hợp của cả hai mAb bảo vệ chuột nhất khỏi sự giảm khối lượng nghiêm trọng và làm giảm gánh nặng virus và sự viêm trong phổi. Kết quả này xác định epitop bảo vệ trên SRBD và tạo ra khung dựa trên cấu trúc đối với thiết kế vắc xin hợp lý và sự chọn lọc của hỗn hợp trị liệu miễn dịch mạnh mẽ.

Protein S của SARS-CoV-2 là yếu tố quyết định phân tử của sự gắn, sự dung hợp, và sự đi vào của virus vào tế bào chủ³. Cấu trúc cryo-EM của miền ngoại bào protein S dạng trime được làm ổn định bằng cách dung hợp từ trước (S2Pecto) đối với SARS-CoV-2 khám phá ra các dấu hiệu tương tự với các dấu hiệu của protein S4 SARS-CoV. Protein màng tích hợp loại I này và protein dung hợp lớp I mang tiểu đơn vị đầu tận cùng N (S1) mà làm trung gian cho sự liên kết với thụ thể và tiểu đơn vị đầu tận cùng C (S2) mà làm trung gian cho sự dung hợp virus-màng tế bào. Tiểu đơn vị S1 chứa miền đầu tận cùng N (SNTD) và miền liên kết thụ thể (SRBD). SARS-CoV-2 và SARS-CoV, mà có chung độ tương đồng trình tự xấp xỉ 78% trong hệ gen của chúng¹ cả hai sử dụng enzym chuyển hóa angiotensin người 2 (hACE2) làm thụ thể xâm nhập⁵⁻⁷. Các nghiên cứu trước đây của miễn dịch người đối với betacoronavirus lây truyền từ động vật sang người có khả năng gây bệnh cao khác bao gồm SARS-CoV⁸⁻¹² và hội chứng hô hấp Trung Đông (MERS)¹³⁻²² cho thấy rằng Ab đối với glycoprotein gai bề mặt virus (S) làm trung gian cho sự miễn dịch bảo vệ. mAb đặc hiệu protein S hiệu nghiệm nhất dường như trung hòa betacoronavirus bằng cách phong bế sự gắn của virus vào tế bào chủ bằng cách liên kết với vùng trên SRBD mà làm trung gian trực tiếp cho sự ăn khớp của thụ thể. Có khả năng là Ab người hứa hẹn để sử dụng trong việc cải biến bệnh trong sự nhiễm SARS-CoV-2, khi được sử dụng để phòng ngừa, phòng ngừa sau phơi nhiễm, hoặc điều trị sự nhiễm SARS-CoV-2²³. Nhiều nghiên cứu bao gồm thử nghiệm đối chứng ngẫu nhiên hóa đánh giá huyết tương hồi phục và một thử nghiệm đánh giá globulin miễn dịch tăng miễn dịch đang diễn ra,

nhưng vẫn chưa rõ ràng rằng liệu việc điều trị này có thể làm giảm tỷ lệ mắc bệnh hoặc tỉ lệ tử vong hay không²⁴.

Chúng tôi đã phân lập bảng lớn của mAb phản ứng protein S SARS-CoV-2 từ tế bào B của hai cá thể mà trước đây bị nhiễm SARS-CoV-2 ở Vũ Hán Trung Quốc²⁵. Tập hợp con của các kháng thể này liên kết với miền liên kết thụ thể của S (SRBD) và thể hiện hoạt tính trung hòa trong thử nghiệm sàng lọc nhanh với SARS-CoV-2 nguyên bản²⁵. Ở đây, chúng tôi xác định khu vực có tính kháng nguyên của SARS-CoV-2 và xác định rằng các vị trí của SRBD là đích của mAb bảo vệ. Chúng tôi đã thử nghiệm bảng của 40 mAb người kháng S trước đây chúng tôi đã chọn lọc trước bằng thử nghiệm sàng lọc trung hòa nhanh trong thử nghiệm trung hòa làm giảm ổ tập trung định lượng (FRNT) với chủng SARS-CoV-2 WA1/2020. Các thử nghiệm này phát hiện ra bảng này thể hiện khoảng giá trị của các giá trị nồng độ ức chế nửa tối đa (IC₅₀), từ 15 đến hơn 4.000 ng/ml (được trực quan hóa dưới dạng bản đồ nhiệt trên HÌNH 20a, các giá trị được thể hiện trong Bảng B, và các đường cong đầy đủ được thể hiện trên HÌNH 24). Chúng tôi giả thiết rằng nhiều mAb phản ứng SRBD này trung hòa sự nhiễm virus bằng cách phong bế SRBD liên kết với hACE2. Quả thực, hầu hết mAb trung hòa mà chúng tôi đã thử nghiệm ức chế sự tương tác của hACE2 với protein S dạng trimer một cách trực tiếp (HÌNH 20a, HÌNH 25). Thống nhất với các kết quả này, các mAb này cũng liên kết mạnh mẽ với protein miền ngoại bào S dạng trimer (S2Pecto) hoặc SRBD dạng monome (HÌNH 20a, HÌNH 26). Chúng tôi đánh giá liệu sự liên kết S2Pecto hoặc SRBD hoặc hiệu lực phong bế hACE2 có dự đoán hiệu lực trung hòa liên kết một cách độc lập hay không, nhưng không số đo nào trong số các số đo này tương quan với hiệu lực trung hòa (HÌNH 20b-d). Tuy nhiên, mỗi mAb trong bậc hiệu lực trung hòa cao nhất (IC₅₀ < 150 ng/ml) cũng cho thấy hoạt tính phong bế mạnh nhất chống lại hACE2 (IC₅₀ < 150 ng/ml) và hoạt tính liên kết khác thường (EC₅₀ < 2 ng/ml) đối với trimer S2Pecto và SRBD (HÌNH 20e). Đường cong trung hòa đại diện đối với hai mAb trung hòa hiệu nghiệm được đặt tên là COV2-2196 và COV2-2130 được thể hiện trong (HÌNH 20f). Sự trung hòa hiệu nghiệm được xác nhận bằng cách sử dụng thử nghiệm trung hòa virus giả, mà phát hiện ra kiểu hình trung hòa nhạy cảm hơn nhiều so với virus *wt* và chứng tỏ nhu cầu đối với việc sử dụng thử nghiệm virus sống để đánh giá độ hiệu nghiệm mAb (HÌNH 20g). Cả hai mAb này liên kết mạnh mẽ với trimer S2Pecto và phong bế đầy đủ sự liên kết hACE2

(HÌNH 20h-i).

Chúng tôi xác định tiếp các vị trí kháng nguyên chính trên SRBD đối với mAb trung hòa bằng phân tích liên kết cạnh tranh. Trước hết chúng tôi sử dụng thử nghiệm cạnh tranh dựa trên phép đo cản trở lớp sinh học với miền SRBD tối thiểu để sàng lọc đối với mAb mà cạnh tranh để liên kết với mAb trung hòa hiệu nghiệm COV2- 2196 hoặc phiên bản tái tổ hợp của mAb SARS-CoV được mô tả trước đây CR3022, mà nhận diện epitop bí ẩn được bảo toàn^{10,26}. Chúng tôi đã nhận diện ba nhóm chính của mAb cạnh tranh (HÌNH 21a). Nhóm lớn nhất của mAb phong bế COV2-2196 nhưng không phong bế rCR3022, trong khi một số mAb được phong bế bằng rCR3022 nhưng không được phong bế bằng COV2-2196. Hai mAb, bao gồm COV2-2130, không được phong bế bằng một trong các mAb tham chiếu. Hầu hết các mAb cạnh tranh với hACE2 để liên kết, gợi ý rằng chúng liên kết ở gần vị trí liên kết hACE2 của SRBD. Chúng tôi đã sử dụng COV2-2196, COV2-2130, và rCR3022 trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh dựa trên ELISA với protein S2Pecto dạng trime và cũng phát hiện thấy rằng SRBD chứa ba vị trí kháng nguyên chính, với một số mAb có khả năng là tạo ra sự tiếp xúc ở hơn một vị trí (HÌNH 21b). Hầu hết các mAb trung hòa hiệu nghiệm cạnh tranh trực tiếp để liên kết với COV2-2196.

Vì COV2-2196 và COV2-2130 không cạnh tranh để liên kết với SRBD, chúng tôi đã đánh giá liệu các mAb này có hiệp đồng đối với sự trung hòa virus hay không, hiện tượng trước đây được quan sát thấy đối với mAb SARS-CoV10. Chúng tôi đã thử nghiệm đáp ứng kết hợp (xem chất nền trung hòa đáp ứng liều lượng, HÌNH 21c) trong FRNT bằng cách sử dụng SARS-CoV-2 và so sánh các giá trị thí nghiệm này với đáp ứng kỳ vọng được tính bằng mô hình tính điểm tính hiệp đồng²⁷. Sự so sánh này phát hiện ra rằng dạng kết hợp của COV2-2196 + COV2-2130 có tính hiệp đồng (với điểm của tính hiệp đồng bằng 17,4, trong đó điểm bất kỳ >10 chỉ ra tính hiệp đồng). Dữ liệu trên HÌNH 21c thể hiện ma trận hiệp đồng đáp ứng liều lượng và chứng minh rằng liều lượng mAb kết hợp bằng 79 ng/ml trong hỗn hợp (16 ng/ml của COV2-2196 và 63 ng/ml của COV2-2130) có cùng hoạt tính như 250 ng/ml của mỗi mAb riêng lẻ (xem HÌNH 21c). Phát hiện này cho thấy rằng bằng cách sử dụng hỗn hợp liều lượng của mỗi mAb có thể được làm giảm hơn ba lần để đạt được cùng hiệu lực của sự trung hòa virus *in vitro*.

Chúng tôi xác định tiếp epitop được nhận diện bởi mAb đại diện trong hai

nhóm liên kết cạnh tranh chính mà hiệp đồng để trung hòa. Chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu gây đột biến của SRBD bằng cách sử dụng đột biến thể alanin hoặc arginin để xác định các gốc thiết yếu để liên kết của mAb trung hòa (HÌNH 27). Nghiên cứu sự mất đi của liên kết phát hiện ra F486A hoặc N487A là các gốc thiết yếu đối với COV2-2196 và N487A là gốc thiết yếu đối với COV2-2165, mà cạnh tranh với nhau để liên kết, và cũng như vậy nghiên cứu gây đột biến đối với COV2-2130 bằng cách sử dụng các thể đột biến K444A và G447R xác định các gốc này là thiết yếu cho sự nhận diện (HÌNH 22a). Nghiên cứu cấu trúc trước đây đã xác định sự tương tác giữa SRBD và hACE2 (HÌNH 22b)²⁸. Hầu hết các gốc tương tác trong SRBD được chứa ở trong peptit tuyến tính có 60 axit amin mà xác định mô típ nhận diện hACE2 (HÌNH 22c). Chúng tôi thử nghiệm tiếp sự liên kết của mAb người với peptit rất nhỏ này và phát hiện ra rằng thành viên trung hòa hiệu nghiệm của nhóm liên kết cạnh tranh lớn nhất bao gồm COV2-2196, COV2-2165, và COV2-2832 nhận diện peptit này (HÌNH 22c), gợi ý các mAb này tạo ra sự tiếp xúc thiết yếu ở trong mô típ nhận diện hACE2.

Chúng tôi đã sử dụng việc soi kính hiển vi điện tử bắt màu âm tính của phức hợp trime S2Pecto/Fab để xác định cấu trúc epitop đối với các mAb này. Các kháng thể trung hòa hiệu nghiệm COV2-2196 và COV2-2165 liên kết với mô típ nhận diện hACE2 của SRBD và nhận diện trạng thái hình dáng 'mở' của trime S2Pecto (HÌNH 22d). Tuy nhiên, phương thức ăn khớp của hai kháng thể này khác biệt, vì tư thế liên kết và góc tương quan với 'thân' gai đối với một kháng thể là khác so với kháng thể kia. COV2-2130, mà thể hiện nhóm liên kết cạnh tranh thứ hai, liên kết với RBD trong trime S2Pecto ở vị trí 'đóng' (HÌNH 22d). Vì COV2-2196 và COV2-2130 không cạnh tranh để liên kết, chúng tôi cố gắng tạo ra phức hợp của cả hai Fab được liên kết cùng lúc với trime S2Pecto. Chúng tôi đã phát hiện ra rằng cả hai Fab được liên kết đồng thời khi trime S2Pecto ở vị trí mở, chỉ ra rằng COV2-2130 có thể nhận diện SRBD trong cả hai hình dạng (HÌNH 22e). Bằng cách gộp lên phức hợp hai Fab bằng cấu trúc của phức hợp RBD:CR3022²⁶, chúng tôi quan sát thấy rằng các kháng thể này liên kết với ba vị trí khác biệt trên SRBD, như đã dự đoán dựa trên các nghiên cứu liên kết cạnh tranh của chúng tôi (HÌNH 22f).

Tiếp theo, chúng tôi đã thử nghiệm hiệu quả phòng ngừa của đơn trị liệu COV2-2196 hoặc COV2-2130 hoặc dạng kết hợp của COV2-2196 + COV2-2130 trong mô hình nhiễm SARS-CoV-2 mới phát triển ở chuột nhắt BALB/c trong đó

hACE2 được biểu hiện trong phổi sau khi tải nạp adenovirut (AdV- hACE2) trong mũi. Trong mô hình bệnh tương đối nghiêm ngặt này, chúng tôi cũng dùng liều lượng đơn lẻ của kháng thể kháng Ifnar1 để gia tăng sự nhiễm virut và sự phát sinh bệnh, mà dẫn đến bệnh viêm phổi kẽ rải rác (A. Hassan and M. Diamond, được nộp để công bố). Chúng tôi đã bị động chuyển liều lượng đơn lẻ của mAb COV2-2196 (10 mg/kg), COV2-2130 (10 mg/kg), dạng kết hợp của COV2-2196 + COV2-2130 (5 mg/kg mỗi chất), hoặc mAb đối chứng isotýp (10 mg/kg) cho chuột nhắt đã được tải nạp AdV-hACE2 một ngày trước khi thử thách trong mũi bằng 4×10^5 PFU của SARS-CoV-2. Việc phòng ngừa bằng COV2-2196 hoặc COV2-2130 hoặc dạng kết hợp của chúng ngăn chặn sự giảm khối lượng nghiêm trọng do SARS-CoV-2 gây ra qua tuần thứ nhất của sự nhiễm (HÌNH 23a). Hàm lượng ARN virut được làm giảm đáng kể ở 7 dpi trong phổi và các vị trí ở xa bao gồm tim và lách (HÌNH 23b). Sự biểu hiện của các gen xytokin và chemokin interferon gamma (INF-g), IL-6, CXCL10 và CCL2, mà là chất chỉ thị của viêm, cũng được làm giảm trong phổi của chuột nhắt được điều trị ở 7 dpi —đỉnh của bệnh (HÌNH 23c).

Chúng tôi cũng đã thử nghiệm COV2-2196 hoặc COV2-2130 hoặc dạng kết hợp của chúng về hiệu quả phòng ngừa trong mô hình thẩm quyền miễn dịch bằng cách sử dụng virut SARS-CoV-2 đã thích ứng chuột nhắt (MA)29 (HÌNH 23d). Thử nghiệm *in vitro* cho thấy rằng giá trị IC₅₀ đối với sự trung hòa có thể so sánh được đối với virut SARS-CoV-2 *wt* và MA đối với các mAb này (dữ liệu không được thể hiện). Mỗi việc điều trị mAb được phân phối ở liều lượng 200 µg/con chuột nhắt (~ 8 mg/kg) làm giảm hàm lượng ARN virut lên đến 105 lần ở 2 dpi trong phổi khi được so sánh với nhóm đối chứng isotýp (HÌNH 23e, bên trái). Phù hợp là, tất cả các con vật từ các nhóm điều trị COV2-2196 và COV2-2196 + COV2-2130 và 8 trong số 10 con vật từ việc điều trị COV2-2130 không còn có virut lây nhiễm ở 2 dpi trong phổi như đo được bằng độ chuẩn màng của mô phổi (HÌNH 23e, bên phải). Tóm lại, các kết quả này ở chuột nhắt đưa ra giả thiết COV2-2196 hoặc COV2-2130 một mình hoặc ở dạng kết hợp là các ứng viên hứa hẹn để điều trị hoặc ngăn ngừa COVID-19.

Ở đây, chúng tôi đã xác định khu vực có tính kháng nguyên đối với bảng lớn của mAb có hiệu lực cao chống lại SARS-CoV-2. Các nghiên cứu chi tiết này và các nghiên cứu sàng lọc mà nhận diện bảng này của mAb từ bảng lớn hơn của hàng trăm mAb25 chứng minh rằng mặc dù kháng thể trung hòa người đa dạng được gây tạo ra

bởi sự lây nhiễm SARS-CoV-2 tự nhiên, chỉ tập hợp con nhỏ của các mAb có hiệu lực cao ($IC_{50} < 50$ ng/ml chống lại virus SARS-CoV-2 sống), và do đó, thích hợp để phát triển trị liệu. Phân tích sinh hóa và cấu trúc của các mAb hiệu nghiệm này xác định ba vị trí kháng nguyên chính của khả năng bị tấn công đối với sự trung hòa bằng mAb người được gây ra bởi sự lây nhiễm SARS-CoV tự nhiên trên SRBD. mAb đại diện từ hai vị trí kháng nguyên hiệu nghiệm nhất được thể hiện là hiệp đồng *in vitro* và bảo vệ dưới dạng hỗn hợp *in vivo*. Phát hiện này cho thấy các dấu hiệu thiết yếu của miễn dịch dịch thể hữu hiệu đối với SARS-CoV-2 và gợi ý rằng vai trò của hoạt tính trung hòa hiệp đồng trong đáp ứng đa dòng cần được nghiên cứu thêm. Hơn nữa, vì SARS-CoV-2 tiếp tục lưu hành, miễn dịch cộng đồng được gây ra bởi sự lây nhiễm tự nhiên có thể bắt đầu để chọn biến thể có tính kháng nguyên mà trốn thoát khỏi áp lực chọn lọc của kháng thể trung hòa, cũng có nhu cầu phải nhắm đích nhiều epitop của protein S trong vắc xin hoặc liệu pháp miễn dịch.

Biến thể gen S phổ biến trên toàn cầu được báo cáo cho đến nay nằm ở vị trí D614G, V483A, L5F, Q675H, H655Y và S939F³⁰, xa khỏi biến thể axit amin ở các gốc 486 hoặc 487 được nhận diện trong nghiên cứu đột biến của chúng tôi đối với các mAb dẫn đầu được nghiên cứu ở đây. Các hỗn hợp trị liệu được chọn lọc hợp lý như hỗn hợp được mô tả ở đây có thể mang lại tính kháng lớn hơn nữa đối với sự trốn thoát SARS-CoV-2. Các nghiên cứu này thiết lập giai đoạn để đánh giá và phát triển tiền lâm sàng của mAb được nhận diện dưới dạng các ứng viên để sử dụng làm liệu pháp miễn dịch COVID-19 ở người.

Độ khả dụng dữ liệu. Bản đồ EM đã được nộp lưu ở Ngân Hàng Dữ Liệu Kính Hiển Vi Điện Tử (Electron Microscopy Data Bank) với mã số truy cập EMBD 21965 (S2Pecto apo), EMD-21974 (S2Pecto + Fab COVs-2165), EMD-21975 (S2Pecto + Fab COVs-2196), EMD-21976 (S2Pecto + Fab COVs-2130) và EMD-21977 (S2Pecto + Fab COV2-2196 + Fab COV2-2130). Nguyên liệu được báo cáo trong nghiên cứu này có sẵn nhưng có thể đòi hỏi phải thực thi Hợp Đồng Chuyển Giao Nguyên Liệu.

Lời cảm ơn. Chúng tôi xin cảm ơn Angela Jones và nhân viên của phòng thí nghiệm lõi Vanderbilt VANTAGE vì đã xác định trình tự nhanh chóng, Ross Trosseth vì giúp đỡ quản lý và phân tích dữ liệu, Robin Bombardi và Cinque Soto of VUMC vì tư vấn kỹ thuật về phương pháp nghiên cứu hệ gen, Arthur Kim, Adam Bailey, Laura VanBlargan, James Earnest, Broc McCune và Swathi Shrihari of WUSTL vì sự trợ

giúp thí nghiệm và các chất phản ứng quan trọng, và Kevin M. Tuffy, Seme Diallo, Patrick M. McTamney, và Lori Clarke of AstraZeneca vì đã tạo ra các chất phản ứng protein và virus giả và dữ liệu liên quan. Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi các khoản trợ cấp của Cơ Quan Chỉ Đạo Các Dự Án Nghiên Cứu Quốc Phòng Tiên Tiến (DARPA) HR0011-18-2-0001 và HR00 11-18-3-0001, các hợp đồng NIH 75N93019C00074 và 75N93019C00062 và Quỹ Nghiên Cứu Dolly Parton COVID-19 ở Vanderbilt. Công trình này được hỗ trợ bởi khoản trợ cấp NIH 1S10RR028106-01A1 đối với Bộ Xác Định Trình Tự Axit Nucleic Thế Hệ Tiếp Theo, nằm ở Vanderbilt Technologies for Advanced Genomics (VANTAGE) và Vanderbilt Institute for Clinical and Translational Research với sự hỗ trợ trợ cấp từ (UL1TR002243 từ NCATS/NIH). S.J.Z. được hỗ trợ bởi NIH T32 AI095202. J.B.C. được hỗ trợ bởi học bổng sau tiến sĩ Helen Hay Whitney Foundation. D.R.M. được hỗ trợ bởi NIH T32 AI007151 và Burroughs Wellcome Fund Postdoctoral Enrichment Program Award. J.E.C. là người nhận của 2019 Future Insight Prize từ Merck KGaA, Darmstadt Đức, mà hỗ trợ nghiên cứu này với khoản trợ cấp nghiên cứu. Nội dung này chỉ là trách nhiệm của các tác giả và không nhất thiết thể hiện quan điểm chính thức của chính phủ Hoa Kỳ hoặc các nhà tài trợ khác.

Sự đóng góp của tác giả. Trình bày dự án: S.J.Z., P.G., R.H.C., L.B.T., M.S.D., J.E.C.; Nhận tài trợ: J.E.C. và M.S.D. Thực hiện thí nghiệm trong phòng thí nghiệm: S.J.Z., P.G., J.B.C., E.B., R.E.C., J.X.R., A.T., R.S.N., R.E.S., N.S., L.E.W., A.O.H., N.M.K., E.W., J.M.F., L.B.T., J.J.S., K.R., Y.-M.L., A.S., L.E.G., D.R.M.; Thực hiện công việc tính toán: E.C.C., T.J., S.D., L.M.; Giám sát nghiên cứu: N.L.K., M.S.D., L.B.T., R.S.B., R.H.C., J.E.C. Viết bản thảo đầu tiên của bài báo: S.J.Z., P.G., R.H.C., J.E.C.; Tất cả các tác giả đã xem xét và phê chuẩn bản thảo cuối cùng.

Xung đột lợi ích. R.S.B. đóng vai trò làm người tư vấn cho Takeda và Sanofi Pasteur về các vấn đề liên quan đến vắc xin. M.S.D. là người tư vấn cho Inbios, Vir Biotechnology, NGM Biopharmaceuticals, Eli Lilly, và trên Scientific Advisory Board of Moderna, người nhận trước đây của khoản tài trợ nghiên cứu không liên quan từ Moderna và người nhận hiện nay của khoản tài trợ nghiên cứu không liên quan Emergent BioSolutions. J.E.C. đóng vai trò làm người tư vấn cho Sanofi và trên Scientific Advisory Boards of CompuVax và Meissa Vaccines, là người nhận của các khoản tài trợ nghiên cứu không liên quan trước đây từ Moderna và Sanofi và là

Founder of IDBiologics, Inc. Vanderbilt University đã nộp đơn sáng chế cho kháng thể SARS-CoV-2 mà có liên quan đến công trình này. AstraZeneca đã nộp đơn sáng chế cho nguyên liệu/phát hiện liên quan đến công trình này. J.J.S., K.R., Y.-M.L., và N.L.K. là nhân viên của AstraZeneca và hiện đang giữ cổ phiếu hoặc quyền mua bán cổ phiếu AstraZeneca. Tất cả các tác giả khác tuyên bố không có xung đột lợi ích.

Thông tin bổ sung

Thông tin bổ sung có sẵn cho bài báo này.

Thư từ và yêu cầu về nguyên liệu cần được gửi cho J.E.C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhou, P., *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270-273 (2020).
2. Zhu, N., *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382, 727-733 (2020).
3. Pillay, T.S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *J Clin Pathol* (2020).
4. Wrapp, D., *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263 (2020).
5. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R.S. & Li, F. Receptor recognition by the novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol* 94(2020).
6. Hoffmann, M., *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181, 271-280 e278 (2020).
7. Li, W., *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450-454 (2003).
8. Sui, J., *et al.* Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor

- association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2536-2541 (2004).
9. ter Meulen, J., *et al.* Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet* 363, 2139-2141 (2004).
 10. ter Meulen, J., *et al.* Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants. *PLoS Med* 3, e237 (2006).
 11. Zhu, Z., *et al.* Potent cross-reactive neutralization of SARS coronavirus isolates by human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12123-12128 (2007).
 12. Rockx, B., *et al.* Structural basis for potent cross-neutralizing human monoclonal antibody protection against lethal human and zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus challenge. *J Virol* 82, 3220-3235 (2008).
 13. Chen, Z., *et al.* Human neutralizing monoclonal antibody inhibition of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in the common marmoset. *J Infect Dis* 215, 1807-1815 (2017).
 14. Choi, J.H., *et al.* Characterization of a human monoclonal antibody generated from a B- cell specific for a prefusion-stabilized spike protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS One* 15, e0232757 (2020).
 15. Niu, P., *et al.* Ultrapotent human neutralizing antibody repertoires against Middle East respiratory syndrome coronavirus from a recovered patient. *J Infect Dis* 218, 1249-1260 (2018).
 16. Wang, L., *et al.* Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape. *J Virol* 92(2018).
 17. Wang, N., *et al.* Structural definition of a neutralization-sensitive epitope on the MERS- CoV S1-NTD. *Cell Rep* 28, 3395-3405 e3396 (2019).
 18. Zhang, S., *et al.* Structural definition of a unique neutralization epitope on the receptor- binding domain of MERS-CoV spike glycoprotein. *Cell Rep* 24, 441-452 (2018).

19. Corti, D., *et al.* Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10473-10478 (2015).
20. Jiang, L., *et al.* Potent neutralization of MERS-CoV by human neutralizing monoclonal antibodies to the viral spike glycoprotein. *Sci Transl Med* 6, 234ra259 (2014).
21. Tang, X.C., *et al.* Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2018-2026 (2014).
22. Ying, T., *et al.* Exceptionally potent neutralization of Middle East respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies. *J Virol* 88, 7796-7805 (2014).
23. Jiang, S., Hillyer, C. & Du, L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol* 41, 355-359 (2020).
24. Valk, S.J., *et al.* Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a rapid review. *Cochrane Database Syst Rev* 5, CD013600 (2020).
25. Zost, S.J., *et al.* Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *bioRxiv*, 2020.2005.2012.091462 (2020).
26. Yuan, M., *et al.* A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 368, 630-633 (2020).
27. Ianevski, A., He, L., Aittokallio, T. & Tang, J. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data. *Bioinformatics* 33, 2413-2415 (2017).
28. Lan, J., *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215-220 (2020).
29. Dinno, K.H., *et al.* A mouse-adapted SARS-CoV-2 model for the evaluation of COVID- 19 medical countermeasures. *bioRxiv*, 2020.2005.2006.081497 (2020).

30. Laha, S., *et al.* Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. *bioRxiv*, 2020.2005.2003.066266 (2020).

Bảng B. IC50 trung hòa, IC50 phong bế hACE2, và giá trị EC50 đối với sự liên kết với S2Pecto hoặc kháng nguyên SRBD đối với bảng mAb

MAb	IC50 trung hòa, ng/ml	IC50 phong bế hACE2, ng/ml	EC50 liên kết S2Pecto, ng/ml	EC50 liên kết SRBD, ng/ml	EC50 liên kết S2Pecto SARS-CoV, ng/ml
COV2-2094	154	53	1,8	1,4	11,7
COV2-2096	59	67	1,0	1,0	—
COV2-2130	107	61	1,5	0,7	—
COV2-2165	332	62	1,4	0,6	—
COV2-2196	15	48	1,2	1,1	—
COV2-3025	37	41	1,1	1,1	—

rCR3022	—	—	10,2	1,1	5,2
r2D22	—	—	—	—	—

Bảng C. Tóm tắt bộ sưu tập dữ liệu soi kính hiển vi điện tử và thống kê protein SARS-CoV-2 S2Pecto apo hoặc trong phức hợp với Fab người

		Cấu trúc của protein SARS-CoV-2 S2Pecto trong phức hợp với Fab được chỉ ra				
Thiết lập Bộ phát hiện kính hiển vi	EMDB #:	Không Fab*	Fab COV2-2165	Fab COV2-2196	Fab COV2-2130	Fab COV2-2196 + Fab COV2-2130
	Kính hiển vi	EMD-21965	EMD-21974	EMD-21975	EMD-21976	EMD-21977
	Điện áp (kV)	TF-20	TF-20	TF-20	TF-20	TF-20
		200	200	200	200	200
		US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD
Thiết lập Bộ phát hiện kính hiển vi	Độ phóng đại	50.000x	50.000x	50.000x	50.000x	50.000x
	Kích thước pixel	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18
	Sự phơi sáng (e-/Å ²)	25	25	25	30	38
	Phạm vi lệch tiêu (µm)	từ 1,5 đến 1,8	từ 1,5 đến 1,8	từ 1,5 đến 1,8	từ 1,5 đến 1,8	từ 1,5 đến 1,8
	Ảnh hiển vi, #	122	83	190	550	466

MS	Hạt, #	3,836	3,705	5,471	10,000	9,434
	Hạt #, sau khi 2D	2,718	1,868	3,595	2,684	4,231
	Hạt cuối cùng, #	2,188	1,057	2,737	1,385	3,018
	Tính đối xứng	C1	C1	C1	C1	C1
Lắp ghép mô hình	CoV-2-S CC	PDB: 6VXX	PDB: 6VYB 0,836	PDB: 6VYB 0,828	PDB: 6VXX	PDB: 6VYB
	Fab (PDB: 12E8) CC	0,895	không có sẵn	0,905	0,900	0,8952
			0,916		0,91	0,8648 / 0,8929

*Đã báo cáo trước đây, Zost *et al.*, 2020 (tài liệu tham khảo 25).

Phương pháp

Kháng thể. Kháng thể người được nghiên cứu trong bài báo này được phân lập từ các mẫu máu từ hai đối tượng ở Bắc Mỹ với với sự nhiễm SARS-CoV-2 có triệu chứng được xác nhận trong phòng thí nghiệm từ trước mà mắc phải ở Trung Quốc. Các nghiên cứu lâm sàng ban đầu để thu được mẫu vật sau khi có sự chấp thuận sau khi được giải thích được mô tả trước đây¹ và đã được phê chuẩn bởi Hội Đồng Xét Duyệt Y Sinh Học của Vanderbilt University Medical Center và Ban Đạo Đức Trong Nghiên Cứu của University of Toronto. Các đối tượng (nam giới 56 tuổi và phụ nữ 56 tuổi) là cặp đôi đã kết hôn và cư trú ở Vũ Hán, Trung Quốc đã đi đến Toronto, Canada, trong đó PBMC được thu lấy bằng cách gạn bạch cầu 50 ngày sau khi khởi phát triệu chứng. Kháng thể được phân lập bằng cách sử dụng các công cụ đa dạng để phân lập và tách dòng tế bào B đặc hiệu kháng nguyên đơn lẻ và các gen biến đổi kháng thể mã hóa cho kháng thể đơn dòng¹.

Nuôi cấy tế bào. Vero E6 (CRL-1586, Bảo Tàng Giống Chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection, ATCC), Vero CCL81 (ATCC), HEK293 (ATCC), và HEK293T (ATCC) được duy trì ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5% trong môi trường thiết yếu tối thiểu Dulbecco (DMEM) chứa 10% (thể tích/thể tích) huyết thanh thai bò (FBS) bị bất hoạt bởi nhiệt, 10 mM HEPES độ pH 7,3, 1 mM natri pyruvat, 1× axit amin không thiết yếu, và 100 U/ml của penicillin–streptomycin. Tế bào Vero-furin được thu lấy từ T. Pierson (NIH) và đã được mô tả trước đây². Tế bào Expi293F (ThermoFisher Scientific, A1452) được duy trì ở nhiệt độ 37°C trong 8% CO₂ trong môi trường biểu hiện Expi293F (ThermoFisher Scientific, A1435102). Tế bào ExpiCHO (ThermoFisher Scientific, A29127) được duy trì ở nhiệt độ 37°C trong 8% CO₂ trong môi trường biểu hiện ExpiCHO (ThermoFisher Scientific, A2910002). Thử nghiệm mycoplasma của các môi trường nuôi cấy Expi293F và ExpiCHO được thực hiện trên cơ sở hàng tháng bằng cách sử dụng bộ kit phát hiện mycoplasma dựa trên PCR (ATCC, 30-1012K).

Virut. Chủng SARS-CoV-2 2019 n-CoV/USA_WA1/2020 được thu lấy từ Trung Tâm

Kiểm Soát và Phòng Ngừa Bệnh (món quà từ Natalie Thornburg). Virut được cấy chuyển trong tế bào Vero CCL81 và được chuẩn độ bằng thử nghiệm mảng trên tế bào Vero E6. Tất cả các công việc với SARS-CoV-2 lây nhiễm được phê chuẩn bởi Washington University School of Medicine hoặc UNC-Chapel Hill Institutional Biosafety Committees và được tiến hành trong nhà máy BSL3 đã được phê chuẩn bằng cách sử dụng máy hút làm sạch không khí được cấp nguồn thích hợp và thiết bị bảo hộ cá nhân.

Kháng nguyên và protein tái tổ hợp. Gen mã hóa cho miền ngoại bào của protein gai SARS-CoV-2 đã được làm ổn định hình dạng dung hợp từ trước (S2Pecto) được tổng hợp và tách dòng vào vector biểu hiện plasmid ADN đối với tế bào động vật có vú. Kháng nguyên protein S được thiết kế tương tự với hai prolin và việc loại bỏ vị trí phân cắt furin để làm ổn định dạng dung hợp từ trước của S được báo cáo trước đây³. Một cách vắn tắt, gen này bao gồm miền ngoại bào của SARS-CoV-2 (đến gốc 1.208), miền trime hóa T4 fibritin, trình tự biotinylation đặc hiệu vị trí AviTag, và 8x-đuôi His đầu tận cùng C. Để làm ổn định cấu trúc trong hình dạng đã dung hợp từ trước, chúng tôi bao gồm các đột biến thế K986P và V987P và gây đột biến vị trí phân cắt furin ở các gốc 682-685 từ RRAR thành ASVG. Protein đã được làm ổn định gai 2P tái tổ hợp (được đặt tên là ở đây là S2Pecto) được phân lập bằng sắc ký ái lực kim loại trên cột HisTrap Excel (GE Healthcare), và các chế phẩm protein được tinh chế thêm bằng sắc ký loại trừ kích thước trên cột Superose 6 Increase 10/300 (GE Healthcare). Sự có mặt của protein S có hình dạng đã dung hợp từ trước, dạng trime được xác nhận bằng cách soi kính hiển vi điện tử bất màu âm tính¹. Để soi kính hiển vi điện tử với S và Fab, chúng tôi đã biểu hiện biến thể của S2Pecto thiếu AviTag nhưng chứa đuôi Twin-Strep đầu tận cùng C, tương tự với dạng được mô tả trước đây³. Protein đã được biểu hiện được phân lập bằng sắc ký ái lực kim loại trên cột HisTrap Excel (GE Healthcare), sau đó là tinh chế thêm trên cột StrepTrap HP (GE Healthcare) và sắc ký loại trừ kích thước trên TSKgel G4000SW XL (TOSOH). Để biểu hiện miền con SRBD của protein S SARS-CoV-2, các gốc 319-541 được tách dòng vào vector biểu hiện động vật có vú xuôi dòng của peptid tín hiệu IL-2 và ngược dòng của vị trí phân cắt thrombin, AviTag, và đuôi 6x-His. Protein RBD dung hợp với miền Fc IgG1 chuột nhắt (được đặt tên là RBD-mFc), được mua từ Sino Biological (40592-V05H). Để lập bản đồ

epitop bằng cách quét alanin, RBD SARS-CoV-2 (các gốc 334-526) hoặc biến thể có một đột biến RBD được tách dòng với trình tự dẫn đầu CD33 ở đầu tận cùng N và cầu nối GSSG ở đầu tận cùng C, AviTag, cầu nối GSSG, và 8xHisTag. Protein gai được biểu hiện trong tế bào FreeStyle 293 (Thermo Fisher) và được phân lập bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng cột HisTrap (GE Healthcare), sau đó là sắc ký loại trừ kích thước với cột Superdex200 (GE Healthcare). Protein được tinh chế được phân tích bằng SDS-PAGE để đảm bảo độ tinh khiết và khối lượng phân tử thích hợp.

Điều chế lưới nhuộm màu kính hiển vi điện tử (EM), chụp ảnh và xử lý protein SARS-CoV-2 S2Pecto hoặc phức hợp S2Pecto/Fab. Để thực hiện chụp ảnh EM, Fab được sản xuất bằng cách phân cắt IgG tái tổ hợp được tinh chế bằng sắc ký sử dụng enzym xystein proteaza được giữ cố định bằng nhựa (FabALACTICA, Genovis). Sự phân cắt xảy ra ở 100 mM natri photphat, 150 mM NaCl độ pH 7,2 trong thời gian ~16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Để loại bỏ Fc đã phân cắt và IgG nguyên vẹn, hỗn hợp phân cắt được ủ với nhựa Fc CaptureSelect (Genovis) trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng trong chất đệm PBS. Nếu cần, Fab được trao đổi đệm vào chất đệm Tris bằng cách ly tâm với cột quay Zeba (Thermo Scientific).

Để sàng lọc và chụp ảnh protein SARS-CoV-2 S2Pecto bắt màu âm tính (NS) trong phức hợp với Fab người, các protein được ủ trong thời gian ~1 giờ và xấp xỉ 3 μ l của mẫu ở nồng độ bằng khoảng từ 10 đến 15 μ g/ml được cho vào lưới phóng điện phát sáng với màng cacbon liên tục trên lưới EM đồng 400 mesh vuông (Electron Microscopy Sciences). Các lưới này được nhuộm màu bằng 0,75% uranyl format (UF)⁴. Các ảnh được ghi lại trên máy ảnh Gatan US4000 4k $\times$ 4k CCD bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử truyền FEI TF20 (TFS) hoạt động ở 200 keV và điều khiển bằng SerialEM⁵. Tất cả các ảnh được chụp ở độ phóng đại 50.000x với kích thước pixel của 2,18 Å/pix ở chế độ liều thấp ở độ lệch tiêu từ 1,5 đến 1,8 μ m. Tổng liều lượng đối với ảnh hiển vi là từ ~25 đến 38 e-/Å². Việc xử lý ảnh được thực hiện bằng cách sử dụng gói phần mềm cryoSPARC⁶. Ảnh được nhập vào, và hạt được ước tính CTF. Sau đó ảnh được khử nhiễu và được nhặt bằng Topaz⁷. Hạt được trích xuất với kích thước khung bằng 256 pixel và được gom vào 128 pixel. Tính trung bình lớp 2D

được thực hiện và các lớp tốt được chọn lọc cho mô hình *ngay từ đầu* và làm tinh mà không có tính đối xứng. Để lắp ghép mô hình EM của protein SARS-CoV-2 S2Pecto, mô hình đóng (PDB: 6VXX) được sử dụng ở Chimera⁸ để lắp ghép vào bản đồ EM (cũng xem chi tiết trong Bảng C). Đối với các phức hợp SARS-CoV-2 S2Pecto/Fab COV2-2165 và SARS-CoV-2 S2Pecto/Fab COV2-2165, mô hình mở của SARS-CoV-2 (PDB: 6VYB) và Fab (Fab: 12E8) được sử dụng ở Chimera để lắp ghép vào bản đồ EM (cũng xem chi tiết trong Bảng C). Đối với phức hợp SARS-CoV-2 S2Pecto/Fab COV2-2130, mô hình đóng và Fab (PDB: 12E8) được sử dụng ở Chimera để lắp ghép vào bản đồ EM (cũng xem chi tiết trong Bảng C). Tất cả các ảnh được tạo ra bằng Chimera.

Sản xuất và tinh chế MAb. Các trình tự của mAb mà đã được tổng hợp (Twist Bioscience) và tách dòng vào vector biểu hiện đơn cistron IgG1 (được đặt tên là pTwist-mCis_G1) được sử dụng để tiết mAb trong nuôi cấy tế bào động vật có vú. Vector này chứa trình tự 2A được tăng cường và cầu nối GSG mà cho phép sự biểu hiện đồng thời của các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mAb từ cấu trúc đơn lẻ khi chuyển nạp⁹. Chúng tôi đã mô tả trước đây sự biểu hiện quy mô nhỏ của mAb trong 1 ml môi trường nuôi cấy ExpiCHO trong đĩa 96 giếng¹. Để biểu hiện mAb quy mô lớn hơn, chúng tôi đã thực hiện sự chuyển nạp (từ 1 đến 300 ml của mỗi kháng thể) của môi trường nuôi cấy tế bào CHO sử dụng Hệ Thống Biểu Hiện Gibco™ ExpiCHO™ và quy trình đối với ống bình phản ứng nhỏ 50 ml (Corning) như mô tả bởi nhà cung cấp. Dịch nổi bề mặt nuôi cấy được tinh chế bằng cách sử dụng HiTrap mAbselect SuRe (Cytiva, trước đây là GE Healthcare Life Sciences) trên hệ thống sắc ký protein song song 24 cột (Protein BioSolutions). mAb đã được tinh chế được trao đổi chất đệm vào PBS, cô bằng cách sử dụng Đơn Vị Lọc Ly Tâm Amicon® Ultra4 50KDa (Millipore Sigma) và lưu trữ ở nhiệt độ 4°C đến khi sử dụng.

Thử nghiệm liên kết ELISA. Các giếng của đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được phủ bằng protein S SARS-CoV-2 tái tổ hợp đã được tinh chế hoặc protein SARS-CoV-2 SRBD ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các đĩa được phong bế bằng 2% sữa khô không béo và 2% huyết thanh dê bình thường trong DPBS chứa 0,05% Tween-20 (DPBS-T) trong thời

gian 1 giờ. Kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng IgG kháng người ở dê được liên hợp với HRP (peroxidaza củ cải ngựa) (Southern Biotech) và cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) (Thermo Fisher Scientific). Sự phát triển màu được theo dõi, axit clohydric 1N được bổ sung để làm dừng phản ứng, và độ hấp thụ được đo ở 450 nm sử dụng máy đo quang phổ (Biotek). Đối với thử nghiệm đáp ứng liều lượng, dịch pha loãng theo dãy của mAb đã được tinh chế được cho vào các giếng trong ba bản sao, và sự liên kết mAb được phát hiện như nêu chi tiết ở trên. Các giá trị nồng độ hữu hiệu nửa tối đa (EC50) đối với sự liên kết được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism v8.0 (GraphPad) sau sự biến đổi log của nồng độ mAb bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính đáp ứng liều lượng dạng xích ma.

ELISA liên kết peptit mô típ liên kết ACE2 tối thiểu RBD. Các giếng của đĩa vi chuẩn độ 384 giếng được phủ bằng 1 $\mu\text{g/ml}$ streptavidin ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các đĩa được phong bế bằng 0,5% BSA trong DPBS chứa 0,05% Tween-20 (DPBS-T) trong thời gian 1 giờ. Các đĩa được rửa 4x bằng 1x PBST và 2 $\mu\text{g/ml}$ peptit mô típ liên kết ACE2 đã được biotinyl hóa (cat. # LT5578, từ LifeTein, LLC) được bổ sung để liên kết streptavidin trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. mAb đã được tinh chế được pha loãng trong chất đệm phong bế, được bổ sung vào các giếng, và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng IgG kháng người ở dê được liên hợp với HRP (peroxidaza củ cải ngựa) (cat. # 2014-05, Southern Biotech) và cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) (ThermoFisher Scientific). Sự phát triển màu được theo dõi, axit clohydric 1N được bổ sung để làm dừng phản ứng, và độ hấp thụ được đo ở 450 nm sử dụng máy đo quang phổ (Biotek). Đối với thử nghiệm đáp ứng liều lượng, các dịch pha loãng 3 lần theo dãy bắt đầu ở nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ của mAb đã được tinh chế được cho vào các giếng trong ba bản sao, và sự liên kết mAb được phát hiện như nêu chi tiết ở trên.

Phân tích về sự liên kết của kháng thể với protein RBD biến thể có các đột biến điểm alanin hoặc arginin. Phép đo giao thoa ánh sáng lớp sinh học (biolayer light interferometry - BLI) được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị Octet RED96 (ForteBio; Pall Life Sciences) và protein RBD kiểu dại hoặc protein RBD đột biến với

sự thay đổi axit amin đơn lẻ ở vị trí xác định thành alanin hoặc arginin. Sự liên kết của protein RBD được xác nhận bằng cách trước hết bắt giữ protein kiểu đại hoặc đột biến RBD được gắn đuôi octa-His từ dung dịch 10 $\mu\text{g/ml}$ (≈ 200 nM) trên cảm biến sinh học Penta-His trong thời gian 300 giây. Sau đó đầu cảm biến sinh học được nhúng chìm trong chất đệm liên kết (PBS/0,2% Tween 20) để rửa 60 giây, sau đó là ngâm trong dung dịch chứa 150 nM của mAb trong thời gian 180 giây (kết hợp), sau đó là ngâm tiếp trong chất đệm liên kết trong thời gian 180 giây (phân ly). Đáp ứng đối với mỗi protein đột biến RBD được chuẩn hóa đối với đáp ứng của protein RBD kiểu đại.

Thử nghiệm trung hòa làm giảm ổ tập trung (FRNT). Dịch pha loãng theo dãy của mAb được ủ với 102 FFU của SARS-CoV-2 trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Phức hợp mAb-virus được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đơn lớp tế bào Vero E6 trong đĩa 96 giếng trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Tiếp đó, tế bào được phủ bằng 1% (khối lượng/thể tích) metylxenluloza trong Môi Trường Thiết Yếu Tối Thiểu (MEM) được bổ sung để chứa 2% FBS đã được bất hoạt bằng nhiệt. Các đĩa được cố định 30 giờ sau bằng cách lấy phần phủ và cố định bằng 4% PFA trong PBS trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được ủ liên tục với 1 $\mu\text{g/ml}$ của kháng thể kháng S rCR3022¹⁰ và IgG kháng người ở dê đã liên hợp peroxidaza củ cải ngựa (HRP) trong PBS có bổ sung với 0,1% (khối lượng/thể tích) saponin (Sigma) và 0,1% albumin huyết thanh bò (BSA). Ở tế bào bị lây nhiễm SARS-CoV-2 được trực quan hóa bằng cách sử dụng cơ chất TrueBlue peroxidaza (KPL) và được định lượng trên ImmunoSpot 5.0.37 Macro Analyzer (Cellular Technologies). Dữ liệu được xử lý bằng cách sử dụng phần mềm Prism phiên bản 8.0 (GraphPad).

Tạo ra lentivirus kiểu giả protein S. Huyền phù tế bào 293 được cấy và được chuyển nạp với vector lentivirus dựa trên HIV thế hệ thứ ba biểu hiện luciferaza cùng với plasmid đóng gói mã hóa cho các thành phần sau: Protein gai SARS-CoV-2 với 19 đột biến mất axit amin ở đầu tận cùng C, Rev, và Gag-pol. Môi trường được thay đổi từ 16 đến 20 giờ sau khi chuyển nạp, và dịch nổi bề mặt chứa virus được thu hoạch 24 giờ sau. Mảnh vụn tế bào được loại bỏ bằng ly tâm tốc độ thấp, và dịch nổi bề mặt được cho đi qua bộ lọc 0,45 μm . Virus giả được tạo viên bằng siêu ly tâm và tái tạo huyền

phủ trong PBS cho dịch dự trữ được cô 100 lần.

Thử nghiệm trung hòa virus giả. Dịch pha loãng theo dãy của mAb được điều chế trong đĩa vi chuẩn độ 384 giếng và được ủ trước với virus giả trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C, mà tế bào 293 mà biểu hiện ổn định ACE2 người được bổ sung vào đó. Đĩa được đưa trở lại thiết bị ủ 37°C, và sau đó 48 giờ sau hoạt tính luciferaza được đo trên Máy Đọc Đĩa Đa Chế Độ EnVision 2105 (Perkin Elmer) sử dụng Hệ Thống Thử Nghiệm Luciferaza Bright-Glo™ (Promega), theo các khuyến nghị của nhà sản xuất. Phần trăm sự ức chế được tính tương quan với đối chứng có một mình virus giả. Giá trị IC50 được xác định bằng hồi quy không tuyến tính bằng cách sử dụng phần mềm Prism phiên bản 8.1.0 (GraphPad). Giá trị IC50 trung bình đối với mỗi kháng thể được xác định từ tối thiểu 3 thí nghiệm độc lập.

Đo sự trung hòa hiệp đồng bằng dạng kết hợp kháng thể. Tính hiệp đồng được xác định dưới dạng hoạt tính trung hòa cao hơn qua trung gian hỗn hợp của hai mAb khi được so sánh với hoạt tính trung hòa qua trung gian mAb riêng lẻ ở cùng một nồng độ tổng cộng của các kháng thể *in vitro*. Để đánh giá liệu hai mAb có hiệp đồng trong hỗn hợp để trung hòa SARS-CoV-2 hay không, chúng tôi đã sử dụng phương pháp được báo cáo trước đây để định lượng tính hiệp đồng¹¹. Để đánh giá mức ý nghĩa của tác dụng có lợi từ việc kết hợp các mAb, đáp ứng kết hợp được quan sát thấy (chất nền đáp ứng liều lượng) được so sánh với đáp ứng kỳ vọng được tính bằng mô hình tính điểm tính hiệp đồng¹¹. Sự trung hòa virus được đo trong thử nghiệm xét nghiệm trung hòa làm giảm tập trung thông thường (FRNT) sử dụng SARS-CoV-2 kiểu đại và đơn lớp nuôi cấy tế bào Vero E6. Các mAb riêng lẻ COV2- 2196 và COV2-2130 được trộn ở các nồng độ khác nhau để đánh giá hoạt tính trung hòa của các tỉ lệ khác nhau của các mAb trong hỗn hợp. Đặc biệt là, mỗi dịch pha loãng bảy lần của mAb COV22130 (bắt đầu từ 500 ng/ml) được trộn với mỗi trong số chín dịch pha loãng của mAb COV2-2196 (bắt đầu từ 500 ng/ml) trong tổng thể tích 50 µl của mỗi điều kiện và sau đó được ủ với 50 µl SARS-CoV-2 sống trong môi trường nuôi cấy tế bào (môi trường RPMI-1640 có bổ sung với 2% FBS) trước khi cho vào tế bào Vero E6 hợp lưu sinh trưởng trong đĩa 96 giếng. Các giá trị đối chứng bao gồm các giá trị để xác định đáp

ứng liều lượng của hoạt tính trung hòa được đo một cách riêng rẽ đối với các mAb riêng lẻ COV2-2196 hoặc COV2-2130, mà được đánh giá ở cùng một liều lượng như trong hỗn hợp. Mỗi phép đo được thực hiện trong hai bản sao. Chúng tôi tính tiếp phần trăm trung hòa virus đối với mỗi điều kiện và sau đó tính điểm của giá trị tính hiệp đồng, mà xác định sự tương tác giữa hai mAb này trong hỗn hợp. Điểm của tính hiệp đồng nhỏ hơn - 10 chỉ ra hiện tượng đối kháng, điểm từ -10 đến 10 chỉ ra tác dụng cộng gộp, và điểm lớn hơn 10 chỉ ra tác dụng hiệp đồng¹¹.

Định lượng mAb. Sự định lượng của mAb đã được tinh chế được thực hiện bằng phép đo quang phổ UV bằng cách sử dụng máy đo quang phổ NanoDrop và lý giải cho hệ số tắt của IgG người.

Phân tích liên kết cạnh tranh thông qua phép đo cản trở lớp sinh học. Cảm biến sinh học bắt giữ Fc IgG kháng chuột nhất (FortéBio 18-5089) trên thiết bị đo cản trở lớp sinh học Octet HTX (FortéBio) được ngâm trong thời gian 10 phút trong 1x chất đệm động học (Molecular Devices 18-1105), sau đó là phép đo tín hiệu đường cơ sở trong thời gian 60 giây. RBD SARS-CoV-2 tái tổ hợp dung hợp với IgG1 chuột nhất (RBD-mFc, Sino Biological 40592- V05H) được giữ cố định lên trên đầu cảm biến sinh học trong thời gian 180 giây. Sau bước rửa trong 1x chất đệm động học trong thời gian 30 giây, kháng thể tham chiếu (5 µg/ml) được ủ với cảm biến sinh học chứa kháng nguyên trong thời gian 600 giây. Kháng thể tham chiếu bao gồm mAb người SARS-CoV CR3022 và COV2-2196. Sau bước rửa trong 1x chất đệm động học trong thời gian 30 giây, sau đó đầu cảm biến sinh học được ngâm trong kháng thể thứ hai (5 µg/ml) trong thời gian 300 giây. Sự liên kết lớn nhất của mỗi kháng thể được chuẩn hóa đối với đối chứng chỉ chứa chất đệm. Sự tự phong bế được trừ đi. So sánh giữa tín hiệu lớn nhất của mỗi kháng thể được sử dụng để xác định phần trăm liên kết của mỗi kháng thể. Sự giảm đi của tín hiệu lớn nhất xuống <33% của tín hiệu không cạnh tranh được coi là sự cạnh tranh đầy đủ của sự liên kết đối với kháng thể thứ hai trong sự có mặt của kháng thể tham chiếu. Sự giảm đi của tín hiệu lớn nhất đến từ 33 đến 67% của sự không cạnh tranh được coi là sự cạnh tranh trung gian của sự liên kết đối với kháng thể thứ hai trong sự có mặt của kháng thể tham chiếu. Phần trăm liên kết của tín hiệu

lớn nhất >67% được coi là không có sự cạnh tranh của sự liên kết đối với kháng thể thứ hai trong sự có mặt của kháng thể tham chiếu.

Phân tích ức chế liên kết ACE-2 thông lượng cao. Các giếng của đĩa vi chuẩn độ 384 giếng được phủ bằng protein SARS-CoV-2 S2Pecto tái tổ hợp đã được tinh chế ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các đĩa được phong bế bằng 2% sữa khô không béo và 2% huyết thanh dê bình thường trong DPBS-T trong thời gian 1 giờ. Các mAb đã được tinh chế từ sự biểu hiện quy mô nhỏ được pha loãng hai lần trong chất đệm phong bế bắt đầu từ 10 µg/ml trong ba bản sao, được bổ sung vào các giếng (20 µl/giếng), và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ môi trường. ACE2 người tái tổ hợp với protein đuôi FLAG đầu tận cùng C được bổ sung vào các giếng ở 2 µg/ml trong thể tích 5 µl/giếng (nồng độ cuối cùng 0,4 µg/ml của ACE2) mà không rửa kháng thể và sau đó được ủ trong thời gian 40 phút ở nhiệt độ môi trường. Các đĩa được rửa, và ACE2 đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng FLAG đã liên hợp HRP (Sigma) và cơ chất TMB. Sự liên kết ACE2 mà không có kháng thể đóng vai trò làm đối chứng. Tín hiệu thu được đối với sự liên kết của ACE2 trong sự có mặt của mỗi dịch pha loãng của kháng thể được thử nghiệm được biểu diễn dưới dạng tỉ lệ phần trăm của sự liên kết ACE2 mà không có kháng thể sau khi trừ đi tín hiệu nền. Các giá trị nồng độ ức chế nửa tối đa (IC50) đối với sự ức chế bằng mAb của protein S2Pecto liên kết với ACE2 được xác định sau sự biến đổi log của nồng độ kháng thể bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính đáp ứng liều lượng dạng xích ma (phần mềm Prism, GraphPad Prism phiên bản 8.0).

Thử nghiệm phong bế ACE2 sử dụng cảm biến sinh học đo cản trở lớp sinh học. Cảm biến sinh học IgG kháng chuột nhất trên thiết bị đo cản trở lớp sinh học Octet HTX (FortéBio) được ngâm trong thời gian 10 phút trong 1x chất đệm động học, sau đó là phép đo tín hiệu đường cơ sở trong thời gian 60 giây. RBD SARS-CoV-2 tái tổ hợp dung hợp với IgG1 chuột nhất (RBD-mFc, Sino Biological 40592-V05H) được giữ cố định lên trên đầu cảm biến sinh học trong thời gian 180 giây. Sau bước rửa trong 1x chất đệm động học trong thời gian 30 giây, kháng thể (5 µg/ml) được ủ với cảm biến sinh học được phủ kháng nguyên trong thời gian 600 giây. Sau bước rửa trong 1x chất

đệm động học trong thời gian 30 giây, sau đó đầu cảm biến sinh học được ngâm vào thụ thể ACE2 (20 µg/ml) (Sigma-Aldrich SAE0064) trong thời gian 300 giây. Sự liên kết lớn nhất của ACE2 được chuẩn hóa đối với đối chứng chỉ chứa chất đệm. Phần trăm liên kết của ACE2 trong sự có mặt của kháng thể được so sánh với sự liên kết lớn nhất ACE2. Sự giảm đi của tín hiệu lớn nhất xuống <30% được coi là phong bế ACE2.

Phân tích liên kết cạnh tranh thông lượng cao. Các giếng của đĩa vi chuẩn độ 384 giếng được phủ bằng protein S SARS-CoV-2 tái tổ hợp đã được tinh chế ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các đĩa được phong bế bằng 2% BSA trong DPBS chứa 0,05% Tween-20 (DPBS-T) trong thời gian 1 giờ. Các mAb không được gắn nhãn đã được tinh chế quy mô nhỏ được pha loãng mười lần trong chất đệm phong bế, được bổ sung vào các giếng (20 µl/giếng) trong bốn bản sao, và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ môi trường. Chế phẩm đã được biotinyl hóa của mAb tái tổ hợp dựa trên trình tự gen biến đổi của mAb được mô tả trước đây CR302212 và cũng như là mAb mới được nhận diện COV2-2096, -2130, và -2196 mà nhận diện các vùng có tính kháng nguyên khác biệt của protein S SARS-CoV-2 được bổ sung vào mỗi giếng trong số bốn giếng với mAb tương ứng ở 2,5 µg/ml trong thể tích 5 µl/giếng (nồng độ cuối cùng 0,5 µg/ml của mAb đã được biotinyl hóa) mà không rửa kháng thể không gắn nhãn và sau đó được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ môi trường. Các đĩa được rửa, và kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng avidin đã liên hợp HRP (Sigma) và cơ chất TMB. Tín hiệu thu được về sự liên kết của kháng thể tham chiếu đã gắn nhãn biotin trong sự có mặt của kháng thể được thử nghiệm không được gắn nhãn được biểu diễn dưới dạng tỉ lệ phần trăm của sự liên kết của kháng thể tham chiếu một mình sau khi trừ đi tín hiệu nền. mAb được thử nghiệm được coi là cạnh tranh nếu sự có mặt của chúng làm giảm sự liên kết của kháng thể tham chiếu xuống nhỏ hơn 41% của sự liên kết lớn nhất của nó và không cạnh tranh nếu tín hiệu lớn hơn 71%. Mức 40–70% được coi là sự cạnh tranh trung gian.

Phân tích liên kết của mAb với các thể đột biến RBD alanin hoặc arginin. Phép đo giao thoa ánh sáng lớp sinh học được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị Octet RED96 (ForteBio; Pall Life Sciences). Sự liên kết được xác nhận bằng cách trước hết

bắt giữ các thể đột biến RBD được gắn đuôi octa-His 10 $\mu\text{g/ml}$ (≈ 200 nM) trên cảm biến sinh học Penta-His trong thời gian 300 giây. Sau đó cảm biến sinh học được nhúng chìm trong chất đệm liên kết (PBS/0,2% TWEEN 20) để rửa trong thời gian 60 giây sau đó là ngâm trong dung dịch chứa 150 nM của mAb trong thời gian 180 giây (kết hợp), sau đó là ngâm tiếp trong chất đệm liên kết trong thời gian 180 giây (phân ly). Đáp ứng đối với mỗi thể đột biến RBD được chuẩn hóa đối với đáp ứng của RBD kiểu dại.

Thí nghiệm chuột nhất sử dụng chuột nhất đã được tải nạp *hACE2* người. Các nghiên cứu động vật được tiến hành theo khuyến nghị trong Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm của Viện Y Tế Quốc Gia. Các quy trình được phê chuẩn bởi Ủy Ban Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm ở Washington University School of Medicine (mã số bảo đảm A3381-01). Sự gây nhiễm virus được thực hiện dưới điều kiện gây mê mà được gây ra và được duy trì bằng ketamin hydroclorua và xylazin, và tất cả nỗ lực được tạo ra để làm giảm thiểu sự mắc ở động vật.

Chuột nhất BALB/c được mua từ Jackson Laboratories (chủng 000651). Chuột nhất cái (10-11 tuần tuổi) được cung cấp liều tiêm trong màng bụng đơn lẻ của 2 mg mAb kháng Ifnar1 (MAR1-5A3 13, Leinco) một ngày trước khi dùng trong mũi $2,5 \times 10^8$ PFU của AdV-hACE2. Năm ngày sau khi tải nạp AdV, chuột nhất được gây nhiễm với 4×10^5 PFU của SARS-CoV-2 bằng đường trong mũi. mAb người kháng SARS-CoV-2 hoặc mAb đối chứng isotyp được dùng 24 giờ trước khi gây nhiễm SARS-CoV-2. Khối lượng được theo dõi trên cơ sở hàng ngày, và động vật bị giết chết vào ngày 5 hoặc 7 sau khi lây nhiễm, và mô được thu lấy.

Đo gánh nặng virus. Mô được cân và được đồng nhất hóa bằng hạt zirconi trong thiết bị MagNA Lyser (Roche Life Science) trong 1 ml môi trường DMEM có bổ sung với 2% FBS đã bị bất hoạt bằng nhiệt. Dịch đồng nhất hóa mô được làm trong bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong thời gian 5 phút và lưu trữ ở nhiệt độ -80°C . ARN được chiết bằng cách sử dụng bộ kit phân lập ARN tổng số MagMax mirVana

(Thermo Scientific) và máy chiết 96 giếng Kingfisher Flex (Thermo Scientific). Các đoạn mồi TaqMan được thiết kế để nhắm đích vùng bảo toàn của gen N bằng cách sử dụng trình tự SARS-CoV-2 (MN908947) làm trình tự dẫn (Đoạn mồi L: ATGCTGCAATCGTGCTACAA; đoạn mồi R: GACTGCCGCCTCTGCTC; đoạn dò: /56-FAM/TCAAGGAAC/ZEN/AACATTGCCAA/3IABkFQ/). Để thiết lập đường cong chuẩn ARN, chúng tôi tạo ra các đoạn ghép với nhau của gen N trong mảnh gBlock (IDT) và tách dòng nó vào vector PCR-II topo (Invitrogen). Vector được tạo mạch thẳng, và sự phiên mã ARN phụ thuộc ADN T7 *in vitro* được thực hiện để tạo ra nguyên liệu cho đường cong chuẩn định lượng.

Các phép đo mRNA cytokin và chemokin. ARN được phân lập từ dịch đồng nhất hóa phổi ở 7 dpi như mô tả ở trên. cADN được tổng hợp từ ARN đã được xử lý bằng ADNaza bằng cách sử dụng bộ kit Phiên Mã Ngược cADN Năng Lực Cao (Thermo Scientific) với việc bổ sung chất ức chế ARNaza, theo quy trình của nhà sản xuất. Sự biểu hiện cytokin và chemokin được xác định bằng cách sử dụng hỗn hợp chính TaqMan Fast Universal PCR (Thermo Scientific) với các bộ đoạn mồi/đoạn dò thương mại đặc hiệu đối với *IFN γ* (IDT: Mm.PT.58.41769240), *IL-6* (Mm.PT.58.10005566), *CXCL10* (Mm.PT.58.43575827), *CCL2* (Mm.PT.58.42151692) và kết quả được chuẩn hóa đối với hàm lượng *GAPDH* (Mm.PT.39a.1). Số lần thay đổi được xác định bằng cách sử dụng phương pháp $2^{-\Delta\Delta C_t}$ so sánh chuột nhất được điều trị bằng mAb đặc hiệu kháng SARS-CoV-2 hoặc mAb đối chứng isotyp với đối chứng nguyên bản.

Thí nghiệm chuột nhất sử dụng chuột nhất kiểu đại. Các nghiên cứu động vật được tiến hành theo khuyến nghị trong Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm của Viện Y Tế Quốc Gia. Các quy trình được phê chuẩn bởi Ủy Ban Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm ở UNC Chapel Hill School of Medicine (Mã Số Bảo Đảm Bảo Vệ Động Vật Thí Nghiệm NIH/PHS là D16-00256 (A3410-01)). Sự gây nhiễm virus được thực hiện dưới điều kiện gây mê mà được gây ra và được duy trì bằng ketamin hydroclorua và xylazin, và tất cả nỗ lực được tạo ra để làm giảm thiểu sự mắc ở động vật.

Virut SARS-CoV-2 (MA-SARS-CoV-2) đã thích ứng chuột nhất. Virut được tạo ra như mô tả trước đây¹⁴. Virut được nhân lên trong tế bào Vero E6 sinh trưởng trong DMEM với 10% Dòng Thai II và 1% Pen/Strep. Độ chuẩn virut được xác định bằng thử nghiệm mảng. Một cách vắn tắt, virut được pha loãng theo dãy và được gây nhiễm trên đơn lớp hợp lưu của tế bào Vero E6, sau đó là phủ agarosa. Các mảng được trực quan hóa vào ngày 2 sau khi lây nhiễm sau khi nhuộm màu bằng thuốc nhuộm đỏ trung tính.

Chuột nhất kiểu đại. Chuột nhất BALB/c 12 tháng tuổi từ Envigo được sử dụng ở thí nghiệm. Chuột nhất được để cho thích nghi trong BSL3 trong ít nhất là 72 giờ trước khi bắt đầu thí nghiệm. Vào 6 giờ trước khi lây nhiễm, chuột nhất được điều trị phòng ngừa bằng 200 μ g kháng thể đơn dòng người thông qua tiêm trong màng bụng. Ngày hôm sau, chuột nhất được gây mê bằng hỗn hợp của ketamin và xylazin và được gây nhiễm trong mũi 105 PFU của MA-SARS-CoV-2 đã pha loãng trong PBS. Sự giảm khối lượng hàng ngày được đo, và vào hai ngày sau khi lây nhiễm chuột nhất bị giết chết bằng cách dùng quá liều isofluran trước khi thu hoạch mô.

Thử nghiệm mảng của dịch đồng nhất hóa mô phổi. Thùy dưới của phổi bên phải được đồng nhất hóa trong 1 ml PBS bằng cách sử dụng MagnaLyser (Roche). Dịch pha loãng theo dãy của virut được chuẩn độ trên đơn lớp nuôi cấy tế bào Vero E6, và các mảng virut được trực quan hóa bằng cách nhuộm màu đỏ trung tính ở hai ngày sau khi gây nhiễm. Giới hạn phát hiện đối với thử nghiệm là 100 PFU cho mỗi phổi.

Sự định lượng và phân tích thống kê. Thống kê mô tả trung bình $\pm$ SEM hoặc trung bình $\pm$ SD được xác định đối với các biến liên tiếp như đã nêu. Bản sao kỹ thuật và sinh học được mô tả trong chú thích hình vẽ. Trong nghiên cứu chuột nhất, phân tích về sự thay đổi khối lượng và gánh nặng virut *in vivo* được xác định lần lượt bằng các kiểm định ANOVA hai chiều và Mann-Whitney. Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng Prism v8.0 (GraphPad).

Tài liệu tham khảo đối với các Phương Pháp Trục Tuyến

- 1 Zost SJ, G. P., Chen RE, Case JB, Reidy JX, Trivette A, Nargi RS, Sutton RE, Suryadevara N, Chen EC, Binshtein E, Shrihari S, Ostrowski M, Chu HY, Didier JE, MacRenaris KW, Jones T, Day S, Myers L, Lee FE-H, Nguyen DC, Sanz I, Martinez DR, Baric RS, Thackray LB,. Diamond MS, Carnahan RH, Crowe JE Jr.. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *bioRxiv* 2020.05.12.091462; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.12.091462> (2020)
- 2 Mukherjee, S. *et al.* Enhancing dengue virus maturation using a stable furin over-expressing cell line. *Virology* 497, 33-40, doi:10.1016/j.virol.2016.06.022 (2016).
- 3 Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).
- 4 Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y. & Walz, T. Negative staining and image classification - Powerful tools in modern electron microscopy. *Biol Proced Online* 6, 23-34, doi:10.1251/bpo70 (2004).
- 5 Mastronarde, D. N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol* 152, 36-51, doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007 (2005).
- 6 Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat Methods* 14, 290-296, doi:10.1038/nmeth.4169 (2017).
- 7 Bepler, T., Noble, A. J., and Berger, B. Topaz-Denoise: general deep denoising models for cryoEM. *bioRxiv*. doi:10.1101/838920 (2019).
- 8 Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612, doi:10.1002/jcc.20084 (2004).
- 9 Chng, J. *et al.* Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs* 7, 403-412, doi:10.1080/19420862.2015.1008351 (2015).

- 10 Yuan, M. *et al.* A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 368, 630-633, doi:10.1126/science.abb7269 (2020).
- 11 Ianevski, A., He, L., Aittokallio, T. & Tang, J. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data. *Bioinformatics* 33, 2413-2415, doi:10.1093/bioinformatics/btx162 (2017).
- 12 ter Meulen, J. *et al.* Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet* 363, 2139-2141, doi:10.1016/S0140-6736(04)16506-9 (2004).
- 13 Sheehan, K. C. *et al.* Blocking monoclonal antibodies specific for mouse IFN-alpha/beta receptor subunit 1 (IFNAR-1) from mice immunized by in vivo hydrodynamic transfection. *J Interferon Cytokine Res* 26, 804-819 (2006).
- 14 Dinno KH, *et al.* A mouse-adapted SARS-CoV-2 model for the evaluation of COVID- 19 medical countermeasures. *bioRxiv* 2020.05.06.081497; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.06.081497> (2020).

BẢNG 1 - CÁC TRÌNH TỰ NUCLEOTIT ĐỐI VỚI VÙNG BIẾN ĐỔI KHÁNG THỂ

D ò n g	S e q u ẽ n c h i n h	C	Vùng Trình Tự Biến Đổi
C O V 2 - 2 1 6 5	1	n ặ n g	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCGTC CGTAGCAACTACATGACCTGGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGG GGCTGGAATGGGTGTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGCACATTC TACGCAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACA ATTCCAAGAACACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCGTGACTT ACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCA
	2	n h ẹ	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGGCCAGTCAGGGCATT GCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGACAGCCCC TAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCC CATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCATCTC ACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTG TCAACTACTTAATAGTCACCCCCTCACCTTCGGCCAAGGGACAC GACTGGAGATTAAA
	3	n ặ n g	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCACCTTT ATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAAC GCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTGGTAACAC AAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGG

2 8 3 8			GACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCCCCATATTGT AGTAGTATCAGCTGCAATGATGGTTTTGATATCTGGGGCCAAGG GACAATGGTCACCGTCTCTTCAG
	4	n h e	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGC ATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGGGTTGGACGTTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
C O V 2 -	5	n ă n g	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCGTC CGTAGCAACTACATGACCTGGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGG GGCTGGAATGGGTGTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGCACATTC TACGCAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACA ATTCCAAGAACACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCGTGACTT ACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCA
	2 9 5 2	6 n h e	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATT GCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGACAGCCCC TAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCC CATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTC ACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTG TCAACTACTTAATAGTCACCCCCTCACCTTCGGCCAAGGGACAC GACTGGAGATTAAAC

C O V 2 -	7	n ă n g	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCATCTTT GATGATTATGACATGACCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACA GGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGA GCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTGCAGTGATTATGTCTCC AATCCCCCGTTATAGTGGCTACGATTGGGCGGGTGATGCTTTTG ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAG
			TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGC TATTATGCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGTCCCTA TACTTGTCTATGATAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCA GACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGAC CATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT AACTCCCGGGACAGCAGTGGTAACGCCGTGGTATTCGGCGGAG GGACCAAGCTGACCGTCCTAG
C O V 2 -	9	n ă n g	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTC GGCAGCTTTGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGACGGATGAACTCTAACAGTGGGAACAC AGCCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACTATGACCAGG GACACCTCCACAAATACAGCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGAGAATGCGCAG TGGCTGGCCCACACATGGCCGCCCCGGATGACTTCTGGGGCCGG GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
			CAGTCTGTGCTGACTCAGGCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGG GCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAACTCCAATATCG GAAGTTATACTATAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGC CCCCAACTCCTCATTTATGGTAATGATCAGCGGACCTCAGGGG

			TCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTTTGGCACCTCGGCCTCC CTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAAAATAATTATTA CTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTGAATGGCCTGGTATTCGGCG GAGGGACCAAAGTACCGTCCTAG
C O V 2 - 3 0 2 5	1 1 n ă n g		GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTACCTTT ATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAAC GCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTGGTAACAC AAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGG GACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCCCCATATTGT AGTAGTATCAGCTGCAATGATGGTTTTGATATCTGGGGCCAAGG GACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	1 2 h e	n	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAGAGAGTCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGC ATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGGGTTGGACGTTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
C O V 2 - 3 2 1 9 6	1 3 n ă n g		CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTACCTTT ATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAAC GCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTGGTAACAC AAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGG GACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGA GATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCCCCATATTGT AGTAGTATCAGCTGCAATGATGGTTTTGATATCTGGGGCCAAGG GACAATGGTCACCGTCTCTTCA

	14	n h e	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGC ATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGGGTTGGACGTTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
C O V 2 -	15	n ă n g	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCATCTTT GATGATTATGACATGACCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACA GGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGA GCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTGCAGTGATTATGTCTCC AATCCCCCGTTATAGTGGCTACGATTGGGCGGGTGATGCTTTTG ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
2 0 9 4	16	n h e	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGC TATTATGCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGTCCCTA TACTTGTCATCTATGATAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCA GACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGAC CATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT AACTCCCGGGACAGCAGTGGTAACGCCGTGGTATTCGGCGGAG GGACCAAGCTGACCGTCCTA
C O V 2 -	17	n ă n g	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTC GGCAGCTTTGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAG GGCTTGAGTGGATGGGACGGATGAACTCTAACAGTGGGAACAC AGCCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACTATGACCAGG

2096			GACACCTCCACAAATACAGCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGAGAATGCGCAG TGGCTGGCCACACATGGCCGCCCGGATGACTTCTGGGGCCGG GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
	18	n h e	CAGTCTGTGCTGACTCAGGCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGG GCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAACTCCAATATCG GAAGTTATACTATAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGC CCCCAACTCCTCATTTATGGTAATGATCAGCGGACCTCAGGGG TCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTTTGGCACCTCGGCCTCC CTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAAAATAATTATTA CTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTGAATGGCCTGGTATTCGGCG GAGGGACCAAACCTGACCGTCCTA
C O V 2 - 2 1 3 0	9	n ă n g	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTG GGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC AGAGACGTCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAGCAAAATTGATGGTGG GACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATC TCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCACAGC GGGAAGCTATTACTATGATACTGTTGGTCCAGGCCTCCCAGAGG GAAAATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
	20	n h e	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTT TTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCA GAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATGTACTGGGCATCTA CCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTC TGGGGCAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAA GATGTGGCAATTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACCCTCAC TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

BẢNG 2 - CÁC TRÌNH TỰ PROTEIN ĐỐI VỚI VÙNG BIẾN ĐỔI KHÁNG THỂ

D	S	C	Vùng Trình Tự Biến Đổi
ò	e	h	
n	q	u	
g	I	ỗ	
	D	i	
C		n	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTVRSNYMTWVRQTPG
O	2	ặ	KGLEWVSVIYSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL
V	1	n	RAEDTAVYYCARDLV TYGLDVWGQGTTVTVSS
2		g	
-			
2		n	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGTAP
1	2	h	NLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQ
6	2	ẹ	LLNSHPLTFGQGTRLEIK
5			
C		n	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKV SCKASGFTFMSSAVQWVRQAR
O	2	ặ	GQRLEWIGWIVIGSGNTNYAQKFQERV TITRDMSTSTAYMELS
V	3	n	SLRSED TAVYYCAAPYCSSISCNDGFDI WGQGTMTVTVSS
2		g	
-			
2		n	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA
8	2	h	PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
3	4	ẹ	QHYGSSRGWTFGQGTKVEIK
8			
C		n	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTVRSNYMTWVRQTPG
O	2	ặ	KGLEWVSVIYSGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL
V	5	n	RAEDTAVYYCARDLV TYGLDVWGQGTTVTVSS
2		g	
-			
2	2	n	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGTAP

9 5 2	6	h e	NLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQ LLNSHPLTFGQGTRLEIK
C O V 2	2 7	n ă n g	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFIFDDYDMTWVRQAPG KGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTALYHCAVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDIWGQGTMTVT VSS
- 2 5 1 4	2 8	n h e	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQV PILVIYDKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED EADYYC NSRDSSGNAVVFGGGTKLTVL
C O V 2	2 9	n ă n g	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGSFDINWVRQATG QGLEWMGRMNSNSGNTAYA QKFQGRVTMTRDTSTNTAYME LSSLRSED TAMY YCARMRSGWPTHGRPDDFWGRGTLTVSS
- 2 3 9 1	3 0	n h e	QSVLTQAPSASGTPGQRTVITSCSGSNSNIGSYTINWYQQLPGTA PKLLIYGNDQRTSGVPDRFSGSKFGTSASLAISGLQSE DENYY CAVWDDSLNGLVFGGGTKLTVL
C O V 2	3 1	n ă n g	EVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFMSSAVQWVRQARG QRLEWIGWIVIGSGNTNYA QKFQERVITITRDMSTSTAYMELSS LRSED TAVYYCAAPYCSSISCNDGFDIWGQGTMTVTVSS
- 3 0 2 5	3 2	n h e	EIVLTQSPGTLSLSPGERVTLS CRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QHYGSSRGWTFGQGTKVEIK

C O V 2	3 3	n ă n g	QMQLVQSGPEVKKPGTsvkvSCKASGFTFMSSAVQWVRQAR GQRLEWIGWIVIGSGNTNYAQKFQERVtITRDMSTSTAYMELS SLRSEDtAVYYCAAPYCSSISCNDGFDIWGQGTMVTVSS
- 2 1 9 6	3 4	n h e	EIVLTQSPGTLsLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLliYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QHYGSSRGWTFGQGtKVEIK
C O V 2	3 5	n ă n g	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFIFDDYDMTWVRQAPG KGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNakNSLYLQMN SLRAEDtALYHCAVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDIWGQGTMVT VSS
- 2 0 9 4	3 6	n h e	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQV PILVIYDKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDeADYYC NSRDSSGNAVVFGGGtKLTVL
C O V 2	3 7	n ă n g	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCkASGYTFGSFDINWVRQATG QGLEWMGRMNSNSGNTAYAQKFQGRVTMTRDTSTNTAYME LSSLRSEDtAMYYCARMRSGWPTHGRPDDFWGRGTLVTVSS
- 2 0 9 6	3 8	n h e	QSVLTQAPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSYtINWYQQLPgTA PKLLiYGNDQRTSGVPDRFSGSKFGTSASLAISGLQSEDENNY CAVWDDSLNGLVFGGGtKLTVL
C O	3	n ă	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDVWMSWVRQAP GKGLEWVGRIKSKIDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ

V	9	n	MNSLKTEDTAVYYCTTAGSYYYDTVGPGLPEGKFDYWGQGT
2		g	LVTVSS
-			
2			DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ
1	4	n	QKPGQPPKLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGAEFTLTISSLQAE
3	0	h	DVAIYYCQYYSTLTFGGGTKVEIK
0		e	

BẢNG 3 - CÁC TRÌNH TỰ CHUỖI NẶNG

Dòng	CDRH1	CDRH2	CDRH3
COV2- 2165	GLTVRSNY	IYSGGST	ARDLVTYGLDV
	41	42	43
COV2- 2838	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	44	45	46
COV2- 2952	GLTVRSNY	IYSGGST	ARDLVTYGLDV
	47	48	49
COV2- 2514	GFIFDDYD	INWNGGST	AVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDI
	50	51	52
COV2- 2391	GYTFGSFD	MNSNSGNT	ARMRSGWPTHGRPDDF
	53	54	55
COV2- 3025	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	56	57	58
COV2- 2196	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	59	60	61
COV2- 2094	GFIFDDYD	INWNGGST	AVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDI
	62	63	64
COV2- 2096	GYTFGSFD	MNSNSGNT	ARMRSGWPTHGRPDDF
	65	66	67
COV2- 2130	GFTFRDVW	IKSKIDGGTT	TTAGSYYYDTVGPGLPEGKFDY
	68	69	70

BẢNG 4 - CÁC TRÌNH TỰ CHUỖI NHẸ

Dòng	CDRL1	CDRL2	CDRL3
COV2-2165	QGISNY	AAS	QLLNSHPLT
	71	72	73
COV2-2838	QSVSSSY	GAS	QHYGSSRGWT
	74	75	76
COV2-2952	QGISNY	AAS	QLLNSHPLT
	77	78	79
COV2-2514	SLRSYY	DKN	NSRDSSGNAV
	80	81	82
COV2-2391	NSNIGSYT	GND	AVWDDSLNGLV
	83	84	85
COV2-3025	QSVSSSY	GAS	QHYGSSRGWT
	86	87	88
COV2-2196	QSVSSSY	GAS	QHYGSSRGWT
	89	90	91
COV2-2094	SLRSYY	DKN	NSRDSSGNAV
	92	93	94
COV2-2096	NSNIGSYT	GND	AVWDDSLNGLV
	95	96	97
COV2-2130	QSVLYSSNNKNY	WAS	QQYYSTLT
	98	99	100

Tất cả các hợp phần và phương pháp được bộc lộ và được yêu cầu bảo hộ trong sáng chế này có thể được tạo ra và thi hành mà không có thí nghiệm phi lý dựa trên bản mô tả sáng chế này. Mặc dù hợp phần và phương pháp theo sáng chế đã được mô tả ở các phương án ưu tiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng các biến thể có thể được áp dụng đối với hợp phần và phương pháp này và theo các bước hoặc theo trình tự các bước của phương pháp được mô tả trong bản mô tả này mà không nằm ngoài ý tưởng, tinh thần và phạm vi của sáng chế. Cụ thể hơn là, cần hiểu rõ rằng các chất nhất định mà có liên quan cả về mặt hóa học và sinh lý học có thể được thay thế cho các chất được mô tả trong bản mô tả này trong khi đạt được cùng kết quả hoặc kết quả tương tự. Tất cả các dạng thể và cải biến tương tự này rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực được cho là nằm trong tinh thần, phạm vi, và ý tưởng của sáng chế như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Các tài liệu tham khảo sau đây, đến phạm vi mà chúng cung cấp các chi tiết quy trình ví dụ hoặc các chi tiết khác bổ sung cho những gì nêu trong bản mô tả này, được kết hợp cụ thể ở đây để tham khảo.

Bằng Sáng Chế Mỹ 3,817,837

Bằng Sáng Chế Mỹ 3,850,752

Bằng Sáng Chế Mỹ 3,939,350

Bằng Sáng Chế Mỹ 3,996,345

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,196,265

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,275,149

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,277,437

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,366,241

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,472,509

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,554,101

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,680,338

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,816,567

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,867,973

Bằng Sáng Chế Mỹ 4,938,948

Bằng Sáng Chế Mỹ 5,021,236

Bằng Sáng Chế Mỹ 5,141,648

Bằng Sáng Chế Mỹ 5,196,066

Bằng Sáng Chế Mỹ 5,563,250

Bằng Sáng Chế Mỹ 5,565,332

Bằng Sáng Chế Mỹ 5,856,456

Bằng Sáng Chế Mỹ 5,880,270

Bằng Sáng Chế Mỹ 6,485,982

"Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Abbondanzo *et al.*, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990.

Allred *et al.*, *Arch. Surg.*, 125(1), 107-113, 1990.

Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.

Barzon *et al.*, *Euro Surveill.* 2016 Aug 11; 21(32).

Beltramello *et al.*, *Cell Host Microbe* 8, 271-283, 2010.

Brown *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 12;130(1), :111-121, 1990.

Campbell, *In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.

Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.

De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.

Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.

Diamond *et al.*, *J Virol* 77, 2578-2586, 2003.

Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.

Duffy *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543, 2009.

Elder *et al.* Infections, infertility and assisted reproduction. Part II: Infections in reproductive medicine & Part III: Infections and the assisted reproductive laboratory. Cambridge UK: Cambridge University Press; 2005.

Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Gornet *et al.*, *Semin Reprod Med.* 2016 Sep; 34(5):285-292. Epub 2016 Sep 14.

Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.

Halfon *et al.*, *PLoS ONE* 2010; 5 (5) e10569

Hessell *et al.*, *Nature* 449, 101–4, 2007.

Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.

King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.

- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Mansuy *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1106-7.
- Nakamura *et al.*, In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.
- O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Persic *et al.*, *Gene* 187:1, 1997
- Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- Purpura *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1107-8. Epub 2016 Sep 19.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 3:624-652, 1990.
- Tang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28324-28330, 1996.
- Wawrzynczak & Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.
- Yu *et al.*, *J Immunol Methods* 336, 142-151, doi:10.1016/j.jim.2008.04.008, 2008.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể mà gắn kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể này bao gồm CDRH1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:59, CDRH2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:60, CDRH3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:61, CDRL1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:89, CDRL2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:90, CDRL3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:91.
2. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa trình tự biến đổi chuỗi nặng và nhẹ có ít nhất 70%, 80%, 90%, hoặc 95% độ tương đồng với trình tự axit amin SEQ ID NO:33 và trình tự axit amin SEQ ID NO:34.
3. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể bao gồm trình tự biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:33 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:34.
4. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể mà gắn kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể bao gồm CDRH1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:68, CDRH2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:69, CDRH3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:70, CDRL1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:98, CDRL2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:99, CDRL3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:100.
5. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa trình tự biến đổi chuỗi nặng và nhẹ có ít nhất 70%, 80%, 90%, hoặc 95% độ tương đồng với trình tự axit amin SEQ ID NO:39 và trình tự axit amin SEQ ID NO:40.
6. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể bao gồm trình tự biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:39 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:40.
7. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể bao gồm đột biến YTE.
8. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể là kháng thể hoặc đoạn kháng thể IgG.
9. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể IgG là kháng thể IgG.
10. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó dược phẩm này tùy ý được bào chế để dùng trong tĩnh

mạch.

11. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất mà là kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 và kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai là kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6.

12. Dược phẩm theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất bao gồm đột biến YTE và kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai bao gồm đột biến YTE.

13. Dược phẩm theo điểm 11 hoặc 12, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất là kháng thể IgG1 và kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai là kháng thể IgG1 .

14. Hỗn hợp kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất mà gắn kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2 và kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai mà gắn kết với protein gai bề mặt SARS-CoV-2 để sử dụng trong phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng nhiễm ngừa SARS-CoV-2 ở đối tượng, trong đó

kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất bao gồm CDRH1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:59, CDRH2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:60, CDRH3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:61, CDRL1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:89, CDRL2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:90, CDRL3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:91; và kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai bao gồm CDRH1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:68, CDRH2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:69, CDRH3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:70, CDRL1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:98, CDRL2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:99, CDRL3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 100.

15. Hỗn hợp để sử dụng theo điểm 14, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất bao gồm trình tự biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:33 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:34.

16. Hỗn hợp để sử dụng theo điểm 14 hoặc 15, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai bao gồm trình tự biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:39 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:40.

17. Hỗn hợp để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất bao gồm đột biến YTE và kháng thể hoặc

đoạn kháng thể thứ hai bao gồm đột biến YTE.

18. Hỗn hợp để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất là kháng thể hoặc đoạn kháng thể IgG và kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai là kháng thể hoặc đoạn kháng thể IgG.

19. Hỗn hợp để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 18, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất là kháng thể IgG1; và kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai là kháng thể IgG1 .

20. Hỗn hợp để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất được bào chế để dùng trong tĩnh mạch và/hoặc kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai được bào chế để dùng trong tĩnh mạch.

21. Hỗn hợp để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 20, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ nhất và kháng thể hoặc đoạn kháng thể thứ hai là trong cùng một dược phẩm.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Vanderbilt University
 Crowe, James E Jr.
 Zost, Seth
 Carnahan, Robert
 Gilchuk, Pavlo
- <120> Kháng Thể Đơn Đồng Người Đối Với
 Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Gây Hội Chứng Hô Hấp Cấp Tính Nặng
- <130> 4815.001PCOD
- <150> US 63/000,299
- <151> 2020-03-26
- <150> US 63/002,896
- <151> 2020-03-31
- <150> US 63/003,716
- <151> 2020-04-01
- <150> US 63/023,545
- <151> 2020-05-12
- <150> US 63/024,204
- <151> 2020-05-13
- <150> US 63/024,248
- <151> 2020-05-13
- <150> US 63/027,173
- <151> 2020-05-19
- <150> US 63/037,984
- <151> 2020-06-11
- <150> US 63/040,224
- <151> 2020-06-17
- <150> US 63/040,246
- <151> 2020-06-17
- <150> US 63/142,196
- <151> 2021-01-27
- <150> US 63/161,890
- <151> 2021-03-16
- <160> 187
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
- <211> 351
- <212> ADN
- <213> Trình tự Nhân tạo
- <220>
- <223> Chuỗi Nặng COV2-2165
- <400> 1
- | | |
|---|-----|
| gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc tctgagactc | 60 |
| tcctgtgcag cctctggact caccgtccgt agcaactaca tgacctgggt ccgccagact | 120 |
| ccagggaagg ggctggaatg ggtgtcagtt atttatagcg gtggtagcac attctacgca | 180 |
| gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac ggtgtatctt | 240 |
| caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatctcgtg | 300 |
| acttacgggtt tggacgtctg gggccaagg accacggtca ccgtctcctc a | 351 |
- <210> 2
- <211> 321
- <212> ADN
- <213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi Nhẹ COV2-2165

<400> 2

gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggccagtc gggcattagc aattatttag cctggatatca gcaaaaacca	120
gggacagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcaactctca caatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacta cttaatagtc acccctcac cttcgccaa	300
gggacacgac tggagattaa a	321

<210> 3

<211> 370

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi Nặng COV2-2838

<400> 3

caaatgcagc tggcgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggatt cacctttatg agctctgctg tgcagtgggt gcgacaggct	120
cgtggacaac gccttgagtg gataggatgg atcgctattg gcagtggtaa cacaaactac	180
gcacagaagt tccaggaaag agtcaccatt accagggaca tgtccacaag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atccgaggac acggcctgtg attactgtgc ggcccatat	300
tgtagtagta tcagctgcaa tgatggtttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc	360
gtctcttcag	370

<210> 4

<211> 328

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi Nhẹ COV2-2838

<400> 4

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga gagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccaçcagaaa	120
cctggccagg cttccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cactatggta gctcacgggg ttggacgttc	300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaac	328

<210> 5

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2952

<400> 5

gaggtgcagc tggcggagtc tgggggaggg ttgggtccagc ctggggggtc tctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggact caccgtccgt agcaactaca tgacctgggt ccgccagact	120
ccagggaagg ggcctggaatg ggtgtcagtt atttatagcg gtggttagcac attctacgca	180
gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac ggtgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacag gctgtgtatt actgtgcgag agatctcgtg	300
acttacggtt tggacgtctg ggccaagggg accacgggtca ccgtctctc a	351

<210> 6

<211> 322

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2952

<400> 6

gacatccagt tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggccagtc gggcattagc aattatttag cctggatatca gcaaaaacca	120
gggacagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacta cttaatagtc accccctcac cttcggccaa	300
gggacacgac tggagattaa ac	322

<210> 7

<211> 388

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2514

<400> 7

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt catctttgat gattatgaca tgacctgggt ccgccaagct	120
ccaggaagg ggcctggagtg ggtctctggt attaatgga atggtggtag cacaggttat	180
gcagactctg tgaagggcgg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat	240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt atcactgtgc agtgattatg	300
tctccaatcc ccggttatag tggctacgat tgggcgggtg atgcttttga tatctggggc	360
caagggacaa tggtcaccgt ctcttcag	388

<210> 8

<211> 325

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2514

<400> 8

tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc	60
acatgccaaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagtt ggtaccagca gaagccagga	120
caggtcccta tacttgtcat ctatgataaa aacaaccggc cctcagggat ccagaccga	180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcaactgggc tcaggcggaa	240
gatgaggctg actattactg taactcccg gacagcagtg gtaacgccgt ggtattcggc	300
ggagggacca agctgaccgt cctag	325

<210> 9

<211> 370

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2391

<400> 9

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggata caccttcggc agctttgata tcaactgggt gcgacaggcc	120
actggacaag ggcttgagtg gatgggacgg atgaactcta acagtgggaa cacagcctat	180
gcacagaagt tccagggcag agtcactatg accagggaca cctccacaaa tacagcctac	240
atggagttga gcagcctgag atctgaggac acggccatgt attactgtgc gagaatgcgc	300
agtggctggc ccacacatgg ccgcccggat gacttctggg gccggggaac cctggtcacc	360
gtctcctcag	370

<210> 10

<211> 331

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2391

<400> 10

cagtctgtgc tgactcaggc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcttgttctg gaagcaactc caatatcgga agttatacta taaactggta ccagcagctc	120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatatat ggtaatgac agcggacctc aggggtccct	180
gaccgattct ctggctccaa gtttggcacc tcggcctccc tggccatcag tgggctccag	240
tctgaggatg aaaataatta ttactgtgca gtatgggatg acagcctgaa tggcctggta	300
ttcggcggag ggaccaaact gaccgtccta g	331

<210> 11

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-3025

<400> 11

gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggatt cacctttatg agctctgctg tgcagtgggt gcgacaggct	120
cgtggacaac gccttgagtg gataggatgg atcgctattg gcagtggtaa cacaaactac	180
gcacagaagt tccaggaaag agtcaccatt accagggaca tgtccacaag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggccccatat	300
tgtagtagta tcagctgcaa tgatggtttt gatctctggg gccaaaggac aatggtcacc	360
gtctcttca	369

<210> 12

<211> 327

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-3025

<400> 12

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga gagagtcacc	60
ctctcctgca ggccagtcga gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatoca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cactatggta gctcacgggg ttggacgttc	300
ggccaaggga ccaagggtga aatcaaa	327

<210> 13

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2196

<400> 13

caaatgcagc tgggtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggatt cacctttatg agctctgctg tgcagtgggt gcgacaggct	120
cgtggacaac gccttgagtg gataggatgg atcgctattg gcagtggtaa cacaaactac	180
gcacagaagt tccaggaaag agtcaccatt accagggaca tgtccacaag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggccccatat	300
tgtagtagta tcagctgcaa tgatggtttt gatctctggg gccaaaggac aatggtcacc	360
gtctcttca	369

<210> 14

<211> 327

<212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ COV2-2196
 <400> 14
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga gagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cactatggta gctcacgggg ttggacgttc 300
 ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaa 327
 <210> 15
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng COV2-2094
 <400> 15
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt catctttgat gattatgaca tgacctgggt ccgccaagct 120
 ccagggaagg ggtctggagt ggtctctggt attaatgga atggtggtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaata acagtctgag agccgaggac acggccttgt atcactgtgc agtgattatg 300
 tctccaatcc cccgttatag tggctacgat tgggcgggtg atgcttttga tatctggggc 360
 caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 387
 <210> 16
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ COV2-2094
 <400> 16
 tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
 acatgccaa gagacagcct cagaagctat tatgcaagtt ggtaccagca gaagccagga 120
 caggtcccta tacttgtcat ctatgataaa aacaaccggc cctcagggat ccagaccga 180
 ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcaactgggc tcaggcgga 240
 gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagtg gtaacgccgt ggtattcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324
 <210> 17
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng COV2-2096
 <400> 17
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcggc agctttgata tcaactgggt gcgacaggcc 120
 actggacaag ggcttgagt gatgggacgg atgaactcta acagtgggaa cacagcctat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcactatg accagggaca cctccacaaa tacagcctac 240
 atggagttga gcagcctgag atctgaggac acggccatgt attactgtgc gagaatgcgc 300
 agtggctggc ccacacatgg ccgcccgat gacttctggg gccggggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369
 <210> 18

<211> 330
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ COV2-2096
 <400> 18
 cagtctgtgc tgactcaggc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgtttctg gaagcaactc caatatcgga agttatacta taaactggta ccagcagctc 120
 ccaggaacgg ccccaaaact cctcatttat ggtaatgatc agcggacctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctgggtccaa gtttggcacc tcggcctccc tggccatcag tgggtccag 240
 tctgaggatg aaaataatta ttactgtgca gtatgggatg acagcctgaa tggcctggta 300
 ttcggcggag ggaccaaact gaccgtccta 330
 <210> 19
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng COV2-2130
 <400> 19
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcaga gacgtctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggttggagtg ggttggccgt attaaaagca aaattgatgg tgggacaaca 180
 gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgatgc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
 gcgggaagct attactatga tactgttggc ccaggcctcc cagagggaaa atttgactac 360
 tggggccagg gaacctggt caccgtctcc tca 393
 <210> 20
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ COV2-2130
 <400> 20
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtcga tgtactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgacgg attcagtggc agcgggtctg gggcagagtt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca atttattact gtcagcaata ttatagtacc 300
 ctcactttcg gcggaggac caaggtggag atcaaa 336
 <210> 21
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng COV2-2165
 <400> 21
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Val Arg Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Leu Val Thr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ COV2-2165
 <400> 22
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Leu Leu Asn Ser His Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 23
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng COV2-2838
 <400> 23
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser
 20 25 30
 Ala Val Gln Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2838

<400> 24

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg

85 90 95

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2952

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Val Arg Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Leu Val Thr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2952

<400> 26

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Leu Leu Asn Ser His Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27

<211> 129

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2514

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Val Ile Met Ser Pro Ile Pro Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Ala
 100 105 110
 Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2514

<400> 28

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu

65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Ala
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 29

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2391

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Phe
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Met Asn Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Arg Ser Gly Trp Pro Thr His Gly Arg Pro Asp Asp Phe
 100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 30

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2391

<400> 30

Gln Ser Val Leu Thr Gln Ala Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Thr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Phe Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Asn Asn Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Asn Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 31

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-3025

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser
 20 25 30
 Ala Val Gln Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-3025

<400> 32

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg
 85 90 95
 Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 33

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2196

<400> 33

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser
 20 25 30
 Ala Val Gln Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2196

<400> 34

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg
 85 90 95
 Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 35

<211> 129

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2094

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Val Ile Met Ser Pro Ile Pro Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Ala
 100 105 110
 Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser

115 120 125
 Ser
 <210> 36
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ COV2-2094
 <400> 36
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Ala
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 37
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng COV2-2096
 <400> 37
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Phe
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Met Asn Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Arg Ser Gly Trp Pro Thr His Gly Arg Pro Asp Asp Phe
 100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 38
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ COV2-2096

<400> 38

Gln Ser Val Leu Thr Gln Ala Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Thr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Phe Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Asn Asn Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Asn Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 39

<211> 131

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng COV2-2130

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Val
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Thr Val Gly Pro Gly
 100 105 110
 Leu Pro Glu Gly Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser
 130

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ COV2-2130

<400> 40

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Met Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2165 CDRH1

<400> 41

Gly Leu Thr Val Arg Ser Asn Tyr

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2165 CDRH2

<400> 42

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2165 CDRH3

<400> 43

Ala Arg Asp Leu Val Thr Tyr Gly Leu Asp Val

1 5 10

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2838 CDRH1

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser Ala

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2838 CDRH2

<400> 45

Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2838 CDRH3
<400> 46
Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15
<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2952 CDRH1
<400> 47
Gly Leu Thr Val Arg Ser Asn Tyr
1 5
<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2952 CDRH2
<400> 48
Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5
<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2952 CDRH3
<400> 49
Ala Arg Asp Leu Val Thr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10
<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2514 CDRH1
<400> 50
Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr Asp
1 5
<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2514 CDRH2
<400> 51
Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr

1 5
<210> 52
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2514 CDRH3
<400> 52
Ala Val Ile Met Ser Pro Ile Pro Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Ala
1 5 10 15
Gly Asp Ala Phe Asp Ile
20
<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2391 CDRH1
<400> 53
Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Phe Asp
1 5
<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2391 CDRH2
<400> 54
Met Asn Ser Asn Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 55
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2391 CDRH3
<400> 55
Ala Arg Met Arg Ser Gly Trp Pro Thr His Gly Arg Pro Asp Asp Phe
1 5 10 15
<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-3025 CDRH1
<400> 56
Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser Ala
1 5
<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>

<223> COV2-3025 CDRH2

<400> 57

Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-3025 CDRH3

<400> 58

Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2196 CDRH1

<400> 59

Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser Ala

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2196 CDRH2

<400> 60

Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2196 CDRH3

<400> 61

Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2094 CDRH1

<400> 62

Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr Asp

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> COV2-2094 CDRH2
<400> 63
Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr
1 5
<210> 64
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2094 CDRH3
<400> 64
Ala Val Ile Met Ser Pro Ile Pro Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Ala
1 5 10 15
Gly Asp Ala Phe Asp Ile
20
<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2096 CDRH1
<400> 65
Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Phe Asp
1 5
<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2096 CDRH2
<400> 66
Met Asn Ser Asn Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2096 CDRH3
<400> 67
Ala Arg Met Arg Ser Gly Trp Pro Thr His Gly Arg Pro Asp Asp Phe
1 5 10 15
<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2130 CDRH1
<400> 68
Gly Phe Thr Phe Arg Asp Val Trp
1 5
<210> 69

<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2130 CDRH2
<400> 69
Ile Lys Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr
1 5 10
<210> 70
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2130 CDRH3
<400> 70
Thr Thr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Thr Val Gly Pro Gly Leu Pro
1 5 10 15
Glu Gly Lys Phe Asp Tyr
20
<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2165 CDRL1
<400> 71
Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
1 5
<210> 72
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2165 CDRL2
<400> 72
Ala Ala Ser
1
<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2165 CDRL3
<400> 73
Gln Leu Leu Asn Ser His Pro Leu Thr
1 5
<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2838 CDRL1
<400> 74

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5
<210> 75
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2838 CDRL2
<400> 75

Gly Ala Ser

1
<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2838 CDRL3
<400> 76

Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg Gly Trp Thr

1 5 10
<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2952 CDRL1
<400> 77

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

1 5
<210> 78
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2952 CDRL2
<400> 78

Ala Ala Ser

1
<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2952 CDRL3
<400> 79

Gln Leu Leu Asn Ser His Pro Leu Thr

1 5
<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2514 CDRL1

<400> 80
Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr
1 5
<210> 81
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2514 CDRL2
<400> 81
Asp Lys Asn
1
<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2514 CDRL3
<400> 82
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Ala Val Val
1 5 10
<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2391 CDRL1
<400> 83
Asn Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Thr
1 5
<210> 84
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2391 CDRL2
<400> 84
Gly Asn Asp
1
<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2391 CDRL3
<400> 85
Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Leu Val
1 5 10
<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>

<223> COV2-3025 CDRL1
<400> 86
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5
<210> 87
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-3025 CDRL2
<400> 87
Gly Ala Ser
1
<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-3025 CDRL3
<400> 88
Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg Gly Trp Thr
1 5 10
<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2196 CDRL1
<400> 89
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5
<210> 90
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2196 CDRL2
<400> 90
Gly Ala Ser
1
<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2196 CDRL3
<400> 91
Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg Gly Trp Thr
1 5 10
<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> COV2-2094 CDRL1
<400> 92
Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr
1 5
<210> 93
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2094 CDRL2
<400> 93
Asp Lys Asn
1
<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2094 CDRL3
<400> 94
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Ala Val Val
1 5 10
<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2096 CDRL1
<400> 95
Asn Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Thr
1 5
<210> 96
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2096 CDRL2
<400> 96
Gly Asn Asp
1
<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2096 CDRL3
<400> 97
Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Leu Val
1 5 10
<210> 98
<211> 12
<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2130 CDRL1
<400> 98
Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10
<210> 99
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2130 CDRL2
<400> 99
Trp Ala Ser
1
<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2130 CDRL3
<400> 100
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr
1 5
<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGHV1-58 FR2-HCDR2
<400> 101
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 102
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGHV1-58 HCDR3-FR4
<400> 102
Cys Ala Ala
1
<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGHD2-2 HCDR3-FR4
<400> 103
Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Ala
1 5 10
<210> 104
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGHD2-8 HCDR3-FR4
<400> 104
Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Tyr Ala
1 5 10
<210> 105
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGHD2-15 HCDR3-FR4
<400> 105
Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser
1 5 10
<210> 106
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGHJ3*02 HCDR3-FR4
<400> 106
Asp Ala Phe Asp Ile Trp
1 5
<210> 107
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGKV3-20 LCDR1-FR2
<400> 107
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGKV3-20 LCDR3-FR4
<400> 108
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
1 5
<210> 109
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> IGKJ1*01 LCDR3-FR4
<400> 109
Trp Thr Phe Gly
1
<210> 110

<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2196 FR2-HCDR2
<400> 110
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 111
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2196 HCDR3-FR4
<400> 111
Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp

<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2196 LCDR1-FR2
<400> 112
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2196 LCDR3-FR4
<400> 113
His Tyr Gly Ser Ser Arg Gly Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 114
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2381 FR2-HCDR2
<400> 114
Ile Gly Trp Ile Ala
1 5
<210> 115
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV2-2381 HCDR3-FR4
<400> 115

Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Arg Thr Ser Cys His Asp Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile Trp

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2381 LCDR1-FR2

<400> 116

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp

1 5

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2381 LCDR3-FR4

<400> 117

His Phe Gly Ser Ser Ser Gln Trp Thr Phe Gly

1 5 10

<210> 118

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2072 FR2-HCDR2

<400> 118

Ile Gly Trp Ile Val

1 5

<210> 119

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2072 HCDR3-FR4

<400> 119

Cys Ala Ala Pro His Cys Asn Arg Thr Ser Cys Tyr Asp Ala Phe Asp

1 5 10 15

Leu Trp

<210> 120

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV2-2072 LCDR1-FR2

<400> 120

Ser Ser Tyr Leu Gly Trp

1 5

<210> 121

<211> 10

```

<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  COV2-2072 LCDR3-FR4
<400>  121
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1           5           10

<210>  122
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  MnC5t2p1_G1 FR2-HCDR2
<400>  122
Ile Gly Trp Ile Val
1           5

<210>  123
<211>  18
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  MnC5t2p1_G1 HCDR3-FR4
<400>  123
Cys Ala Ala Pro Arg Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Gly Phe Asp
1           5           10           15
Ile Trp

<210>  124
<211>  6
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  MnC5t2p1_G1 LCDR1-FR2
<400>  124
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1           5

<210>  125
<211>  10
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  MnC5t2p1_G1 LCDR3-FR4
<400>  125
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1           5           10

<210>  126
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  HbnC3t1p2_C6 FR2-HCDR2
<400>  126
Ile Gly Trp Ile Val

```

```

1                5
<210> 127
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> HbnC3t1p2_C6 HCDR3-FR4
<400> 127
Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Thr Arg Cys Tyr Asp Ala Phe Asp
1                5                10                15
Ile Trp

<210> 128
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> HbnC3t1p2_C6 LCDR1-FR2
<400> 128
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1                5
<210> 129
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> HbnC3t1p2_C6 LCDR3-FR4
<400> 129
Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1                5                10
<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> HbnC3t1p1_C6 FR2-HCDR2
<400> 130
Ile Gly Trp Ile Val
1                5
<210> 131
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> HbnC3t1p1_C6 HCDR3-FR4
<400> 131
Cys Ala Ala Pro His Cys Ser Ser Thr Ile Cys Tyr Asp Gly Phe Asp
1                5                10                15
Ile Trp

<210> 132
<211> 6
<212> PRT

```

```

<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  HbnC3t1p1_C6 LCDR1-FR2
<400>  132
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1           5
<210>  133
<211>  10
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  HbnC3t1p1_C6 LCDR3-FR4
<400>  133
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1           5           10
<210>  134
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  S2E12 FR2-HCDR2
<400>  134
Val Gly Trp Ile Val
1           5
<210>  135
<211>  18
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  S2E12 HCDR3-FR4
<400>  135
Cys Ala Ser Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Ser Asp Gly Phe Asp
1           5           10           15
Ile Trp

<210>  136
<211>  6
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  S2E12 LCDR1-FR2
<400>  136
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1           5
<210>  137
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo
<220>
<223>  S2E12 LCDR3-FR4
<400>  137
Gln Tyr Val Gly Leu Thr Gly Trp Thr Phe Gly
1           5           10

```


<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV107_1 FR2-HCDR2
<400> 138
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 139
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV107_1 HCDR3-FR4
<400> 139
Cys Ala Ala Pro His Cys Ser Ser Thr Ser Cys Phe Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp

<210> 140
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV107_1 LCDR1-FR2
<400> 140
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV107_1 LCDR3-FR4
<400> 141
Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV107_2 FR2-HCDR2
<400> 142
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 143
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV107_2 HCDR3-FR4

<400> 143

Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Ser Asp Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile Trp

<210> 144

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV107_2 LCDR1-FR2

<400> 144

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp

1 5

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV107_2 LCDR3-FR4

<400> 145

Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly

1 5 10

<210> 146

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV72 FR2-HCDR2

<400> 146

Ile Gly Trp Ile Val

1 5

<210> 147

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV72 HCDR3-FR4

<400> 147

Cys Ala Ala Val Asp Cys Asn Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile Trp

<210> 148

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV72 LCDR1-FR2

<400> 148

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp

1 5

<210> 149

<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV72 LCDR3-FR4
<400> 149
Gln Tyr Asp Ile Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 150
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV21_1 FR2-HCDR2
<400> 150
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 151
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV21_1 HCDR3-FR4
<400> 151
Cys Ala Ala Pro His Cys Ser Gly Gly Ser Cys Leu Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp

<210> 152
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV21_1 LCDR1-FR2
<400> 152
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 153
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV21_1 LCDR3-FR4
<400> 153
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 154
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV21_2 FR2-HCDR2
<400> 154

Ile Gly Trp Ile Val

1 5

<210> 155

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV21_2 HCDR3-FR4

<400> 155

Cys Ala Ala Pro His Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile Trp

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV21_2 LCDR1-FR2

<400> 156

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp

1 5

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV21_2 LCDR3-FR4

<400> 157

Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly

1 5 10

<210> 158

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV57_1 FR2-HCDR2

<400> 158

Ile Gly Trp Ile Val

1 5

<210> 159

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> COV57_1 HCDR3-FR4

<400> 159

Cys Ala Ala Asn His Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Gly Phe Asp

1 5 10 15

Ile Trp

<210> 160

<211> 6

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV57_1 LCDR1-FR2
<400> 160
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 161
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV57_1 LCDR3-FR4
<400> 161
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Met Phe Gly
1 5 10
<210> 162
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV57_2 FR2-HCDR2
<400> 162
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 163
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV57_2 HCDR3-FR4
<400> 163
Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Asn Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp

<210> 164
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV57_2 LCDR1-FR2
<400> 164
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 165
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> COV57_2 LCDR3-FR4
<400> 165
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly

1	5	10
<210>	166	
<211>	129	
<212>	PRT	
<213>	Trình tự Nhân tạo	
<220>		
<223>	CHUỖI NẶNG HIP1	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(81)..(81)	
<223>	Xaa có thể là Met, Val	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(100)..(100)	
<223>	Xaa có thể là Trp, Ser, Arg	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(101)..(101)	
<223>	Xaa có thể là Asp, Arg, Val	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(102)..(102)	
<223>	Xaa có thể là Leu, Arg, Ala	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(103)..(103)	
<223>	Xaa có thể là Ala, Gly	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(104)..(104)	
<223>	Xaa có thể là Tyr, Ile	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(107)..(107)	
<223>	Xaa có thể là Val, Cys	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(108)..(108)	
<223>	Xaa có thể là Val, Tyr, Thr	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(109)..(109)	
<223>	Xaa có thể là Gly, Val	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(110)..(110)	
<223>	Xaa có thể là Asp, Val	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	
<222>	(111)..(111)	
<223>	Xaa có thể là Cys, Ala	
<220>		
<221>	ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP	

<222> (112)..(112)
 <223> Xaa có thể là Ser, Thr
 <220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <222> (113)..(113)
 <223> Xaa có thể là Arg, His, Ala
 <400> 166
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Ala Val Gln Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Val Val Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Xaa Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 167
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> CHUỖI NẶNG HIP2
 <220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa có thể là Gln, Pro
 <220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa có thể là Leu, Arg
 <220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa có thể là Met, Val
 <220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa có thể là Gly, Asn, Asp, Gln, Thr, Ser, Leu, Arg
 <220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (101)..(101)
 <223> Xaa có thể là Pro, Gly, Leu, Ser, Val, Lys, Ala
 <220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp

```

<222> (102)..(102)
<223> Xaa có thể là Ser, Gly, Ile, Val, Arg, Pro, Ala, Met
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (103)..(103)
<223> Xaa có thể là Tyr, Leu, Ile, Arg, Asn, Ala
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (104)..(104)
<223> Xaa có thể là Cys, Ser, Val, Tyr
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (105)..(105)
<223> Xaa có thể là Ser, Arg, Val, Tyr, Met
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (106)..(106)
<223> Xaa có thể là Ser, Gly, Val, Cys
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (107)..(107)
<223> Xaa có thể là Gly, Thr
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (108)..(108)
<223> Xaa có thể là Ser, Gly, Val, Thr
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (109)..(109)
<223> Xaa có thể là Cys, Ala, Thr, Asp
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (110)..(110)
<223> Xaa có thể là Tyr, Arg, Phe, Pro, Thr
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (111)..(111)
<223> Xaa có thể là Ala, Pro, Gly, Val, Cys, Arg
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (112)..(112)
<223> Xaa có thể là Asp, Thr, Ser, Asn, Leu, Ile, Tyr, Pro
<400> 167
Gln Met Xaa Xaa Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Ser
20          25          30
Ala Xaa Gln Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Trp Ile Val Val Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60
Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

```


Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110
Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 168
<211> 129
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> CHUỖI NẶNG HIP3
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (3)..(3)
<223> Xaa có thể là Gln, Pro
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (34)..(34)
<223> Xaa có thể là Met hoặc Val
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (35)..(35)
<223> Xaa có thể là Gln, Arg
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (43)..(43)
<223> Xaa có thể là Gln, Arg
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (100)..(100)
<223> Xaa có thể là Tyr, Pro, Ala, Arg, Gly
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (101)..(101)
<223> Xaa có thể là Glu, Leu, Pro, Tyr, Ser
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (102)..(102)
<223> Xaa có thể là Gly, Val, Ser, Cys, Tyr
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (103)..(103)
<223> Xaa có thể là Cys, Asp, Val, Gln, Thr
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (104)..(104)
<223> Xaa có thể là Gly, Asn
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (106)..(106)
<223> Xaa có thể là Asp, Val
<220>

```

<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (108)..(108)
<223> Xaa có thể là Tyr, Ala, His
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (109)..(109)
<223> Xaa có thể là Thr, Gln, Ser
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (110)..(110)
<223> Xaa có thể là Val, His
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (111)..(111)
<223> Xaa có thể là Thr, Arg
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (112)..(112)
<223> Xaa có thể là Ala, Pro
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (113)..(113)
<223> Xaa có thể là Leu, Phe, Ala, Gly, Asn
<400> 168
Gln Met Xaa Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Ser
20          25          30
Ala Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Xaa Arg Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Trp Ile Val Val Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60
Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100          105          110
Xaa Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115          120          125
Ser

<210> 169
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> CHUỖI NẶNG CORD
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (19)..(19)
<223> Xaa có thể là Arg, Leu
<220>

```

```

<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (78)..(78)
<223> Xaa có thể là Val, Glu, Gly
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (79)..(79)
<223> Xaa có thể là Pro, Gly, hoặc His
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (80)..(80)
<223> Xaa có thể là Cys, Ile, Tyr
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (81)..(81)
<223> Xaa có thể là Ser, Cys, Val
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (85)..(85)
<223> Xaa có thể là Cys, Ser, Val
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (86)..(86)
<223> Xaa có thể là Tyr, Ser, Val
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (87)..(87)
<223> Xaa có thể là Ser, Thr, Val
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (88)..(88)
<223> Xaa có thể là Tyr, Ala, Ser
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (89)..(89)
<223> Xaa có thể là Ser, Ala, Cys
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (90)..(90)
<223> Xaa có thể là Asp, Tyr
<400> 169
Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Ser Ala Val Gln Trp Val Arg
1          5          10          15
Gln Ala Xaa Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Val Val Gly
20          25          30
Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Glu Arg Val Thr Ile
35          40          45
Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
50          55          60
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Pro Xaa Xaa Xaa
65          70          75          80
Xaa Gly Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ala Phe Asp Ile Trp
85          90          95
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

```

100 105

<210> 170
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> CHUỖI NHỆ HIP1
 <220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (97)..(97)
 <223> Xaa có thể là Pro, Leu, Ser, Thr
 <400> 170

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Xaa Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 171
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> CHUỖI NHỆ HIP2
 <220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (97)..(97)
 <223> Xaa có thể là Pro, Leu, Ser, Thr
 <400> 171

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Xaa Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 172
 <211> 109

```

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> CHUỖI NHẹ HIP3
<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (97)..(97)
<223> Xaa có thể là Pro, Leu, Ser, Thr
<400> 172
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
          85           90           95
Xaa Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

<210> 173
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> Chuỗi nhẹ HIP1
<400> 173
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
          85           90           95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

<210> 174
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
<220>
<223> Chuỗi nhẹ HIP1
<400> 174
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 175

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP1

<400> 175

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 176

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP1

<400> 176

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ser
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 177

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP1

<400> 177

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 178

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP2

<400> 178

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 179

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP2

<400> 179

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 180

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP2

<400> 180

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 181

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP2

<400> 181

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ser
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 182
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP2

<400> 182

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 183
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP3

<400> 183

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 184
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP3

<400> 184

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 185

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP3

<400> 185

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ HIP3

<400> 186

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ser
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 187

<211> 109

<212> PRT

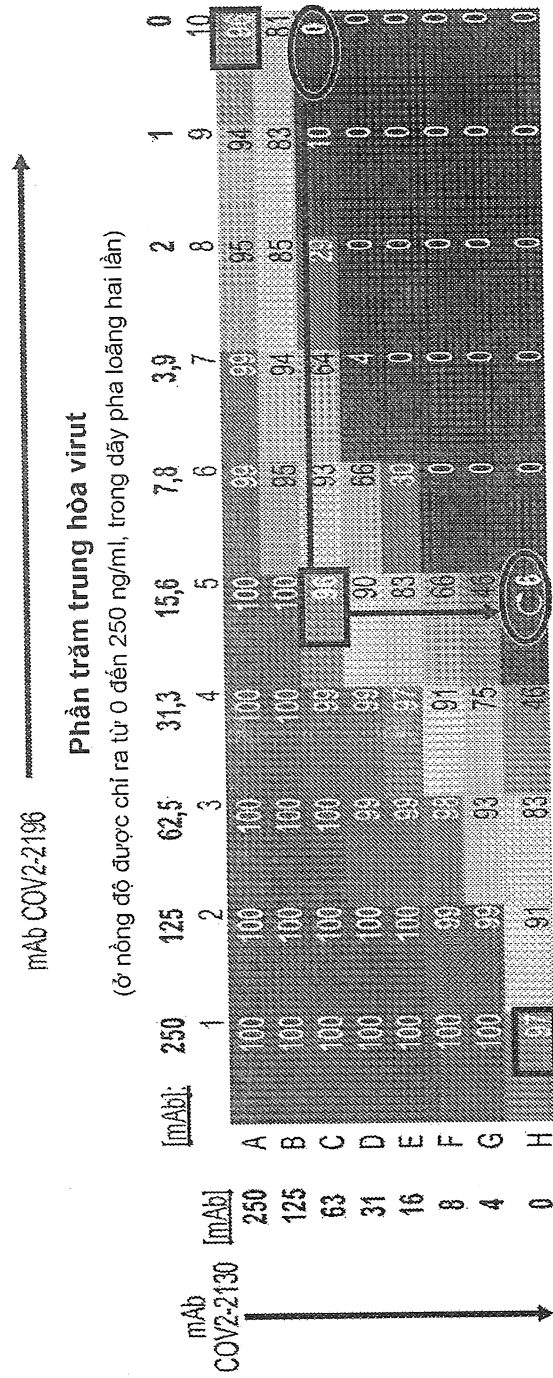
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

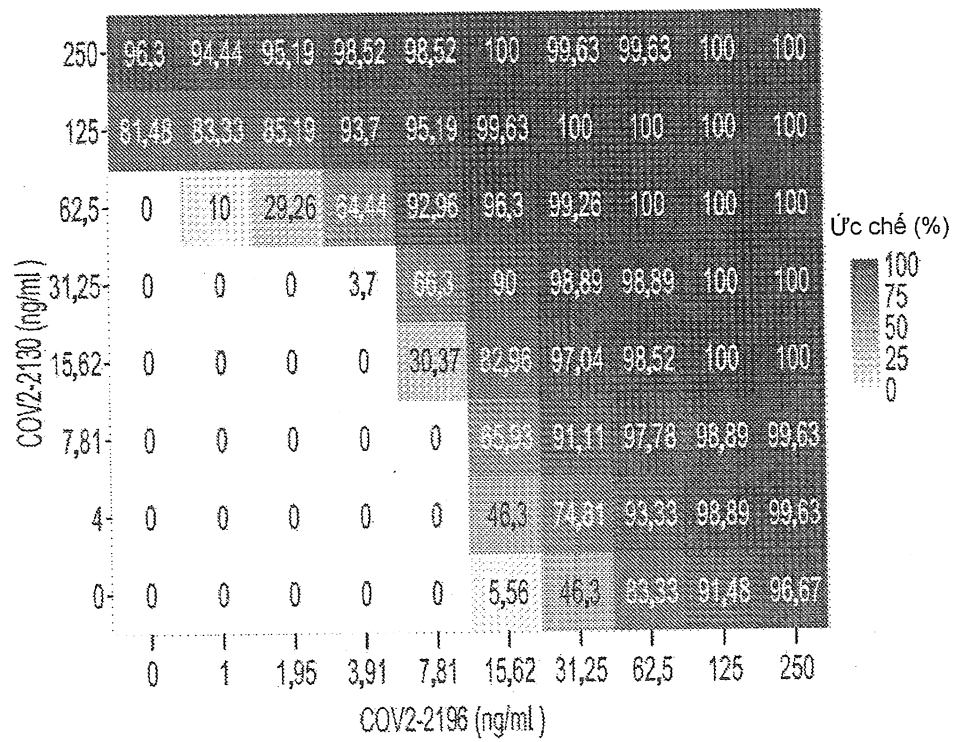
<223> Chuỗi nhẹ HIP3

<400> 187

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

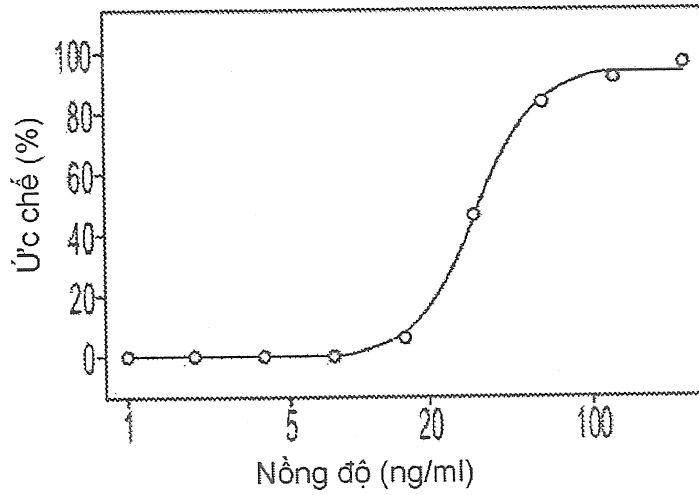


HÌNH 1

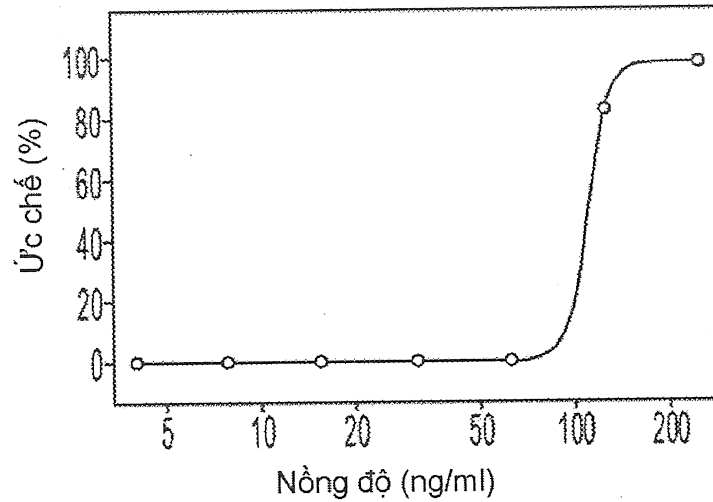


HÌNH 2A

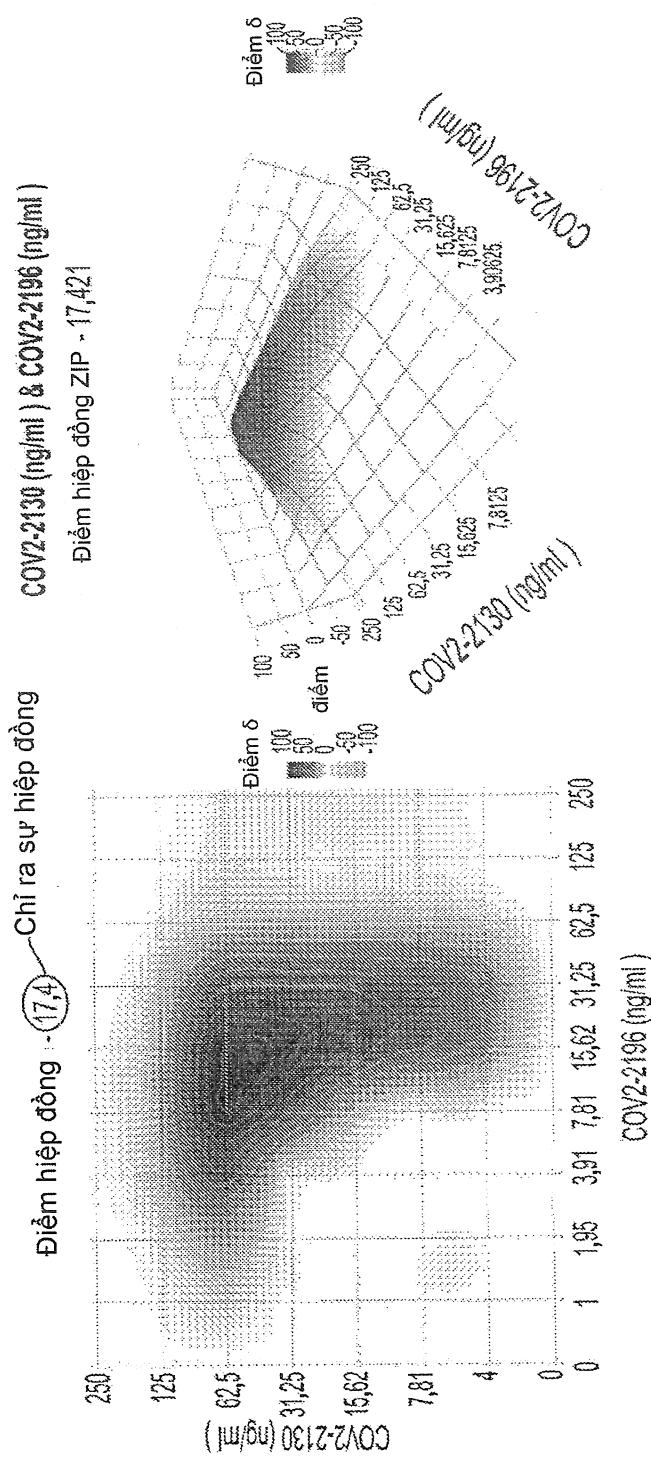
Đường cong đáp ứng liều lượng đối với
thuốc: một mình COV2-2196



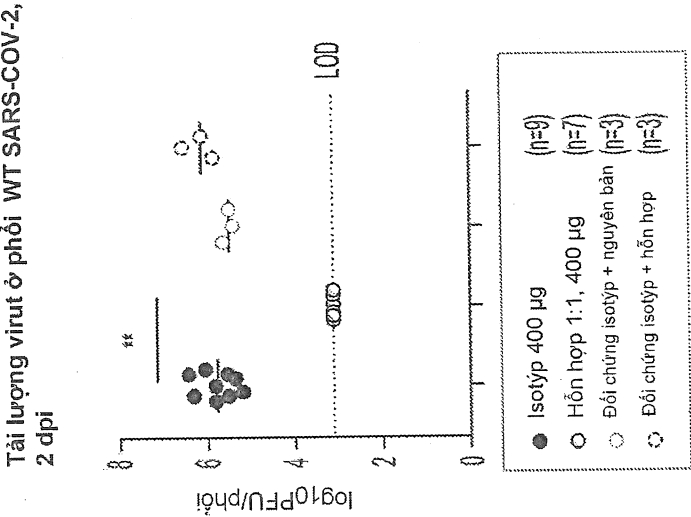
Đường cong đáp ứng liều lượng đối với
thuốc: một mình COV2-2130



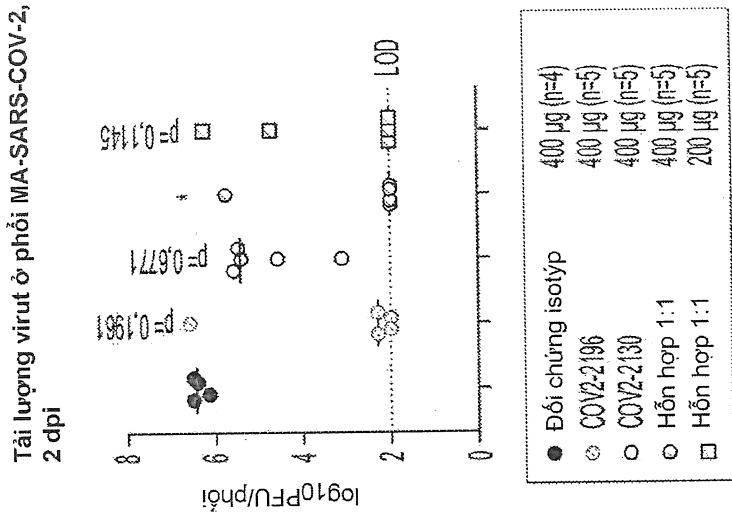
HÌNH 2B



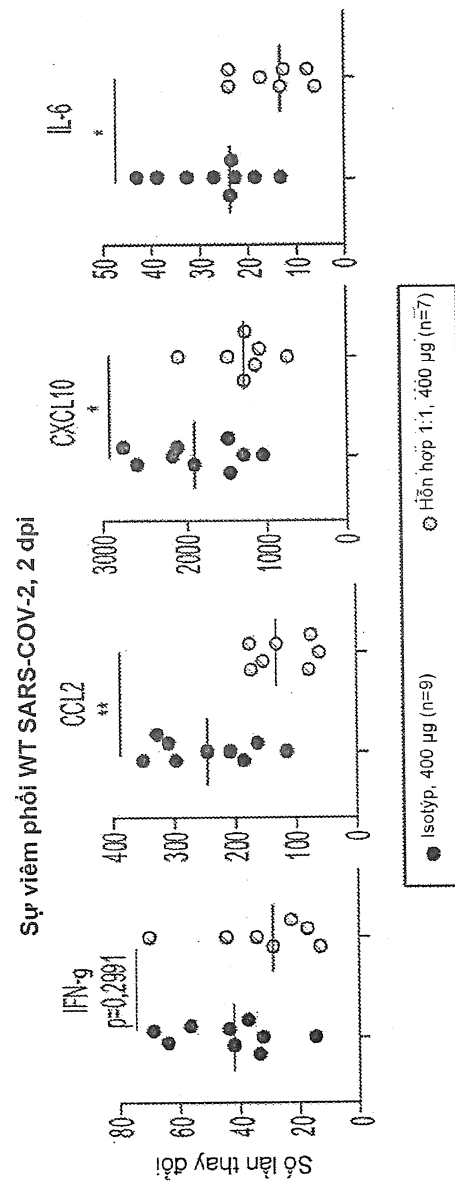
HÌNH 3



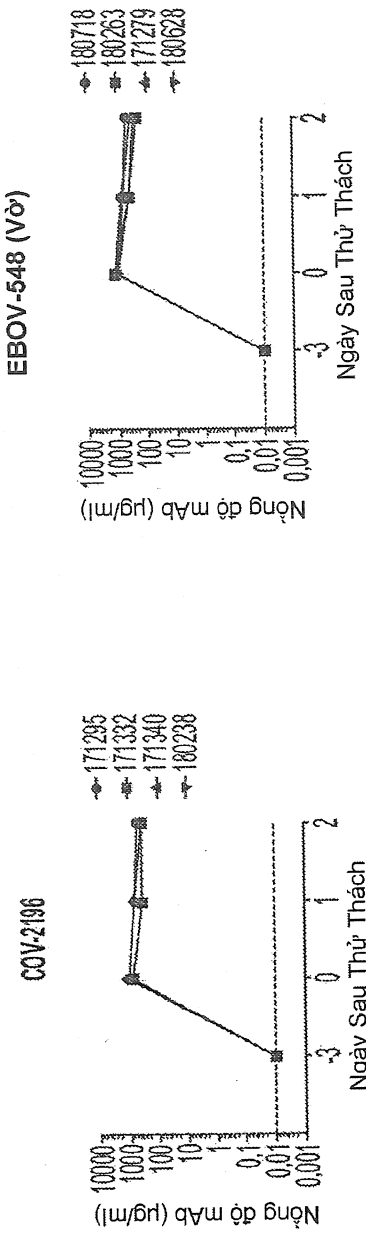
HÌNH 4B



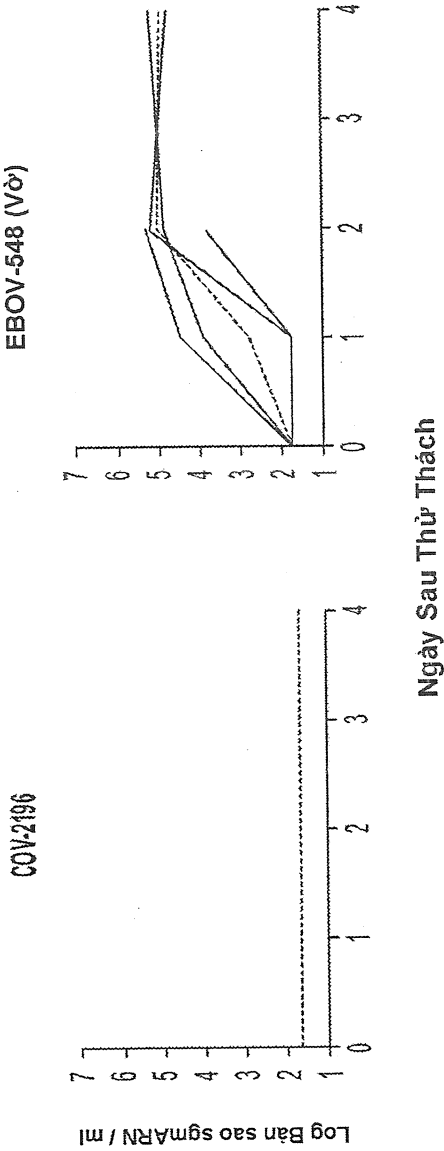
HÌNH 4A



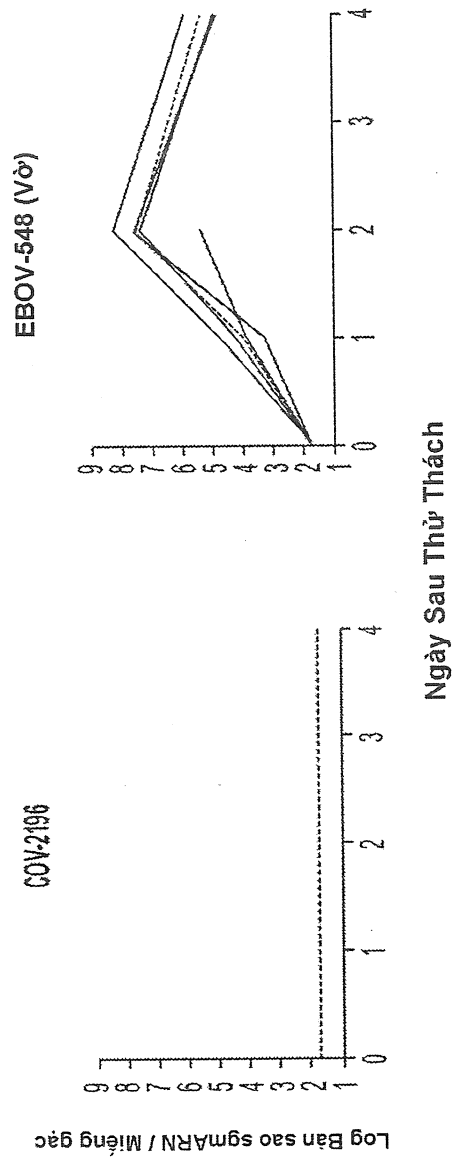
HÌNH 4C



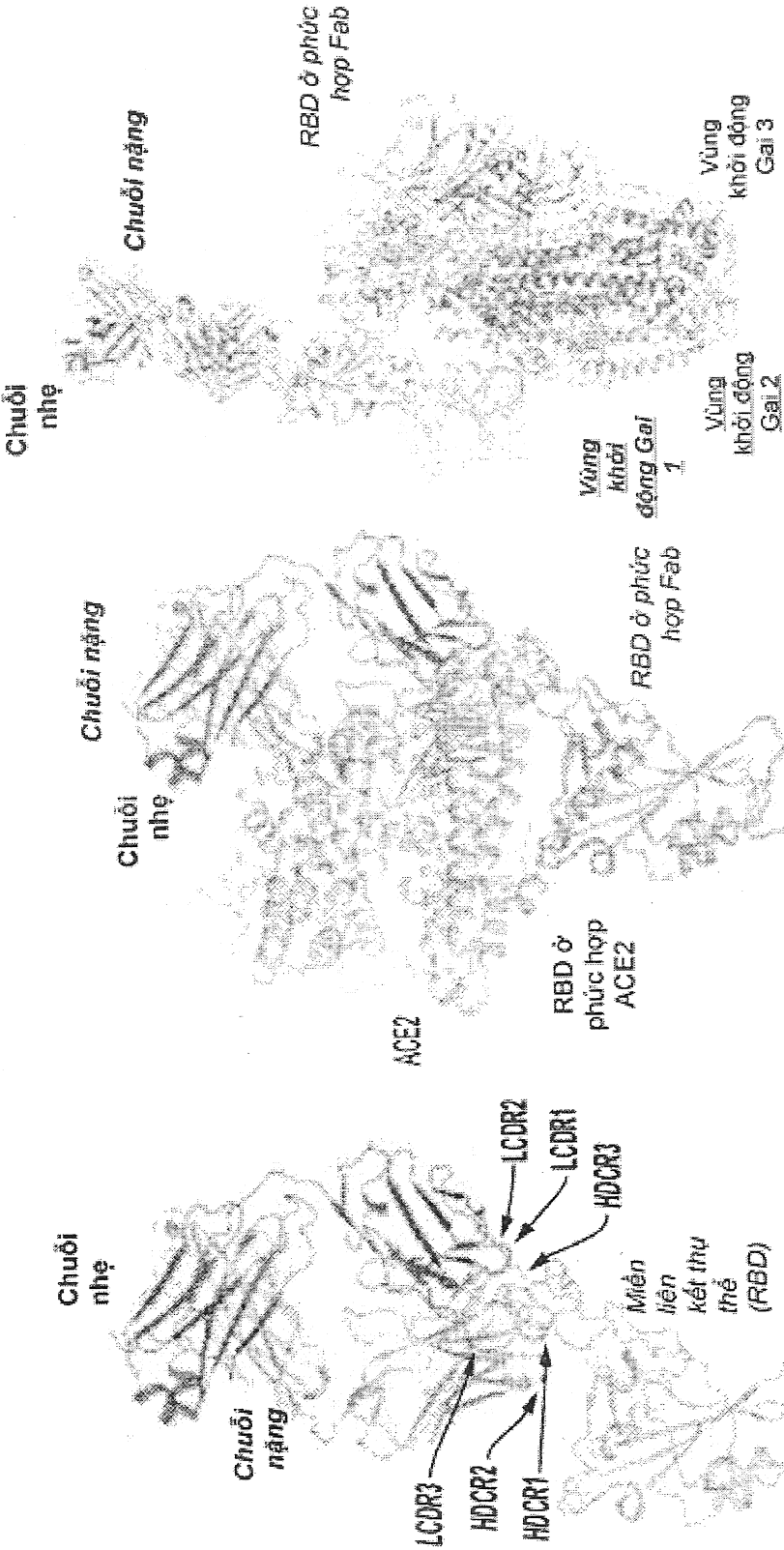
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7

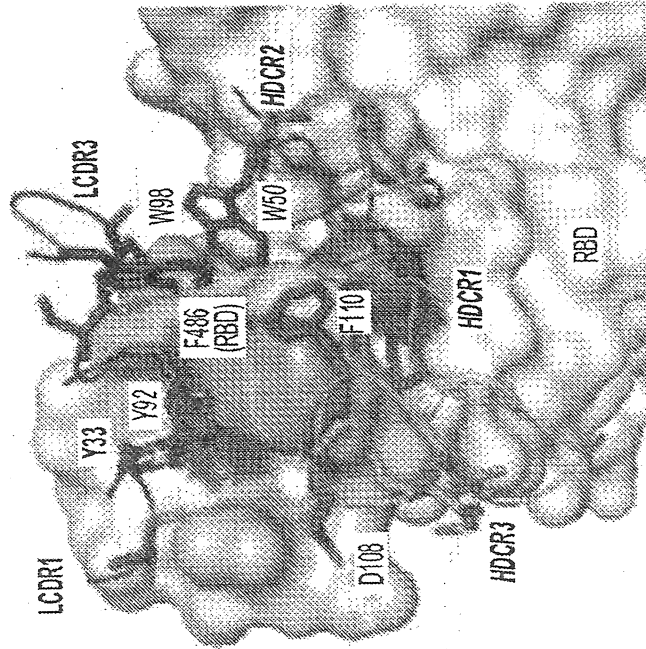


HINH 8C

HINH 8B

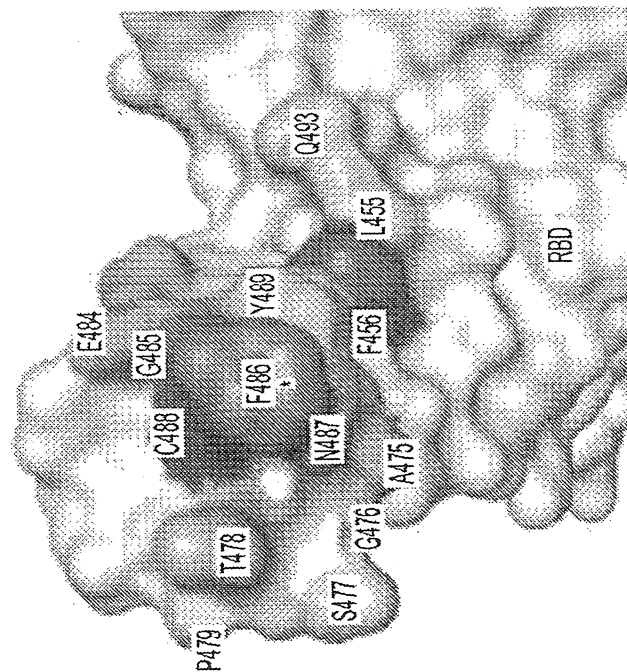
HINH 8A

Các CDR COV2-2196 trên RBD

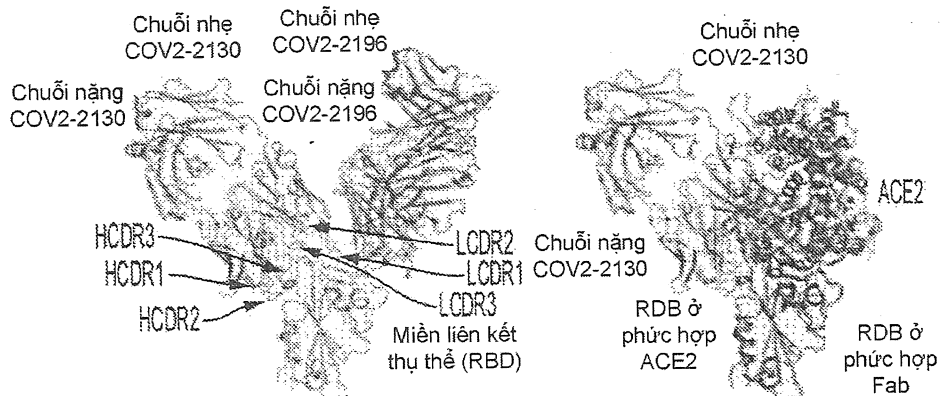


HÌNH 8E

Vị trí liên kết COV2-2196

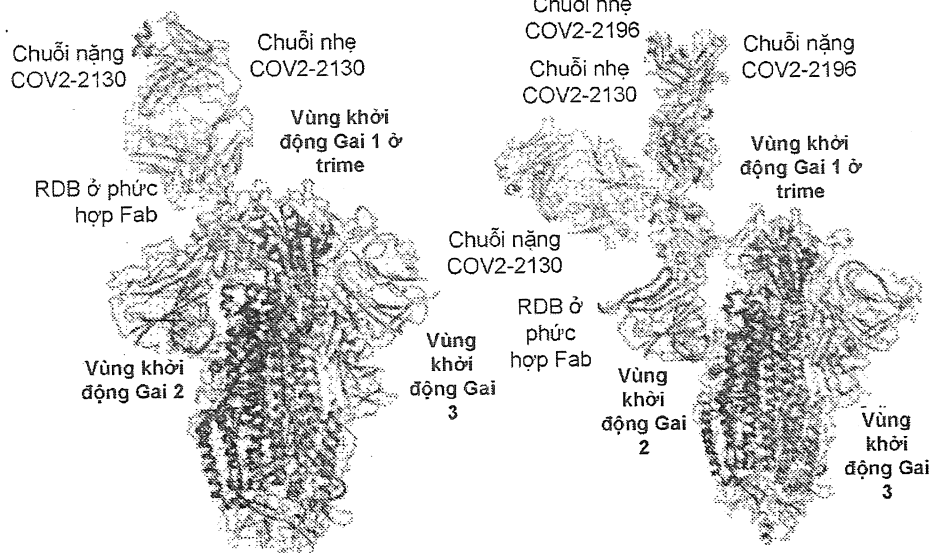


HÌNH 8D



HÌNH 9A

HÌNH 9B

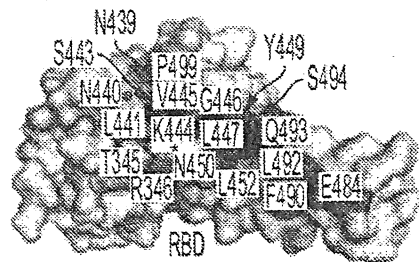


HÌNH 9C

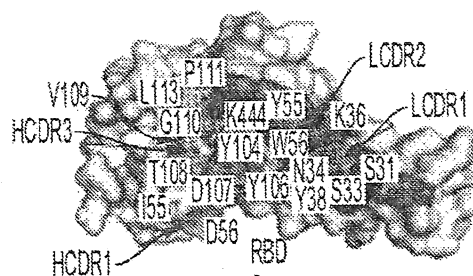
HÌNH 9D

Các gốc tiếp xúc COV2-2130 trên RBD

Các CDR COV2-2130 trên gốc tiếp xúc RBD



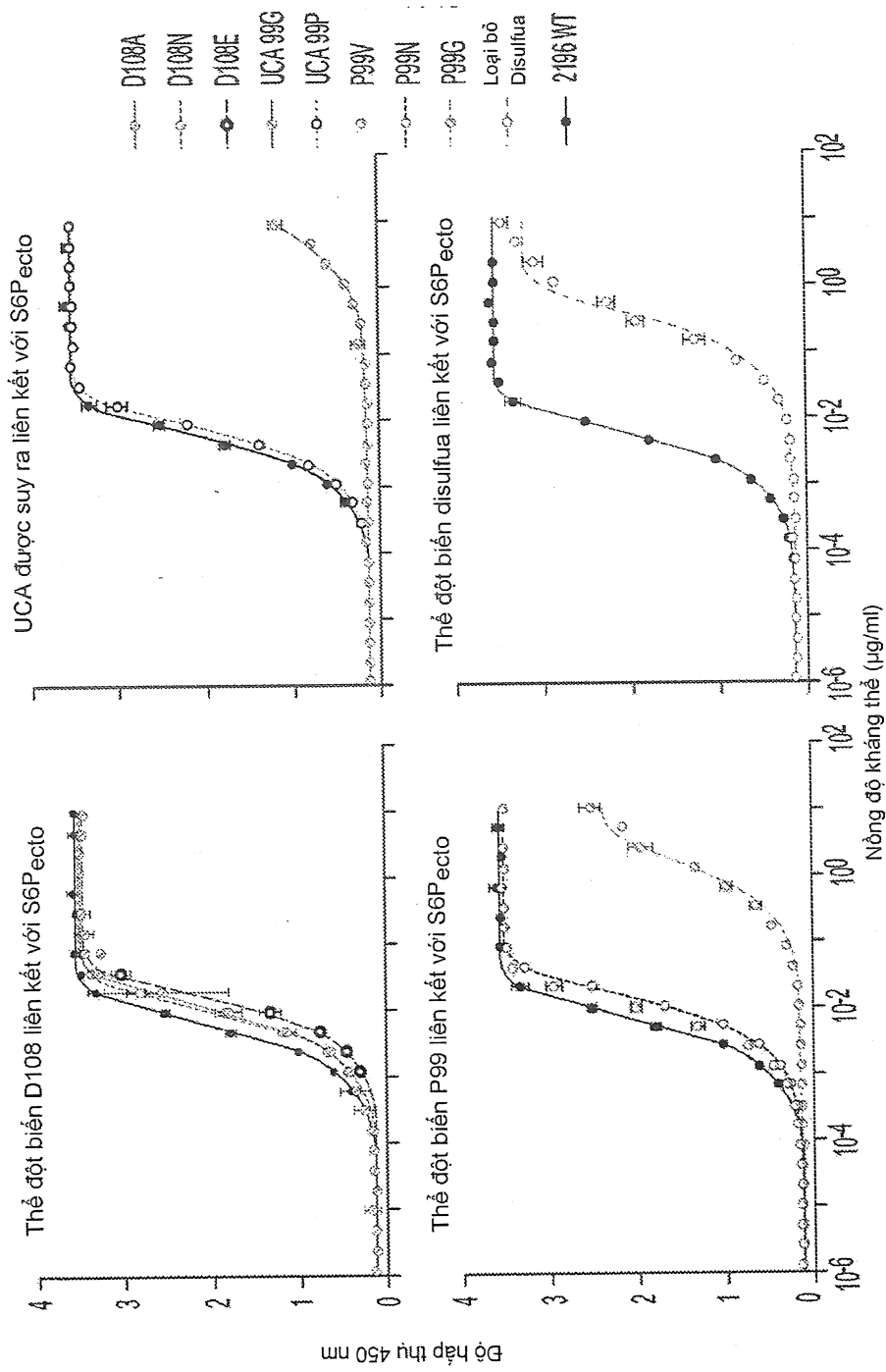
HÌNH 9E



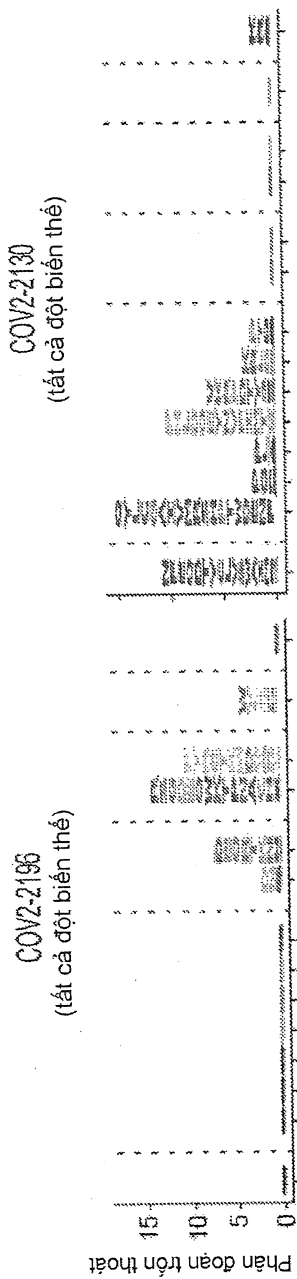
HÌNH 9F

gen	Chuỗi nặng		Chuỗi nhẹ		Tài liệu tham chiếu
	FR2-HCDR2	HCDR3-FR4	LCDR1-FR2	LCDR3-FR4	
IGHV1-58	IGWIV	CAA.....			
IGHD2-2		...GYCSSTSCYA.....			
IGHD2-8		...GYCINGVCYA.....			
IGHD2-15		...GYCSGGSCYS.....			
IGHJ3*02		DAFDIW			
mAb					
	4A	9A	31	91	
COV2-2196	IGWIV	CAAPYCSSTSCIDCFDIW	SSYLAW	HYCSSRCMTFG	Zosi et al., 2020
COV2-2381	IGWIA	CAAPYCSRTSCIDAFDIW	SSYLAW	HFSSSQMTFG	
COV2-2072	IGWIV	CAAPHCNRTSCIDAFDIW	SSYLGW	QYGSSP.MTFG	
MnC52p1_G1	IGWIV	CAAPRCBQQSCIDCFDIW	SSYLAW	QYGSSP.MTFG	Kreer et al., 2020
HbnC31p2_C6	IGWIV	CAAPYCSSTRCIDAFDIW	SSYLAW	QYGRSP.MTFG	
HbnC31p1_C6	IGWIV	CAAPHCSSTICIDCFDIW	SSYLAW	QYGSSP.MTFG	
S2E12	VGWIV	CASPYCSGGSCIDCFDIW	SSYLAW	QYVGLTCMTFG	Tortorel et al., 2020
COV107_1	IGWIV	CAAPHCSSTSCIDAFDIW	SSYLAW	QYGNSP.MTFG	Robbiani et al., 2020
COV107_2	IGWIV	CAAPYCSGGSCIDAFDIW	SSYLAW	QYGSSP.MTFG	
COV72	IGWIV	CAAVDCNSTSCIDAFDIW	SSYLAW	QYDISP.MTFG	
COV21_1	IGWIV	CAAPHCSGGSCIDAFDIW	SSYLAW	QYGSSP.MTFG	
COV21_2	IGWIV	CAAPHCSGGSCIDAFDIW	SSYLAW	QYGSSP.MTFG	
COV57_1	IGWIV	CAANHCSGGSCIDCFDIW	SSYLAW	QYGSSP.MTFG	
COV57_2	IGWIV	CAAPYCSGGSCIDAFDIW	SSYLAW	QYGSSP.MTFG	

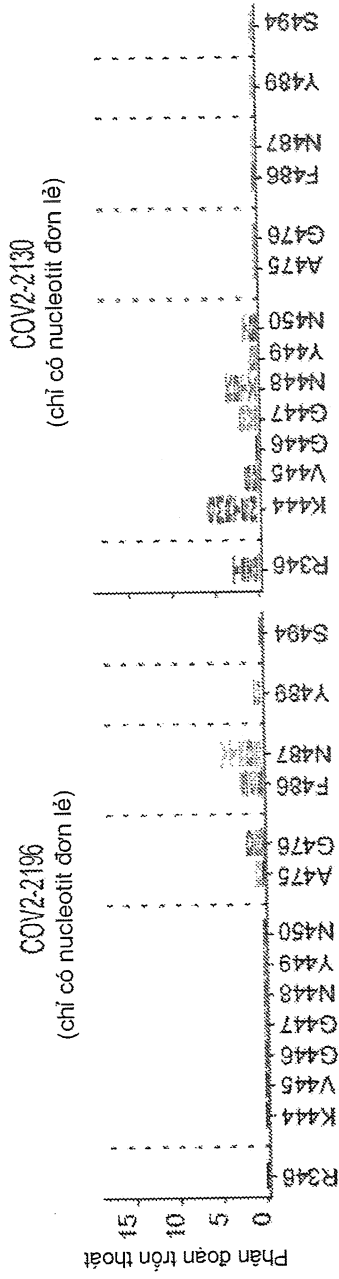
HÌNH 10A



HÌNH 10B

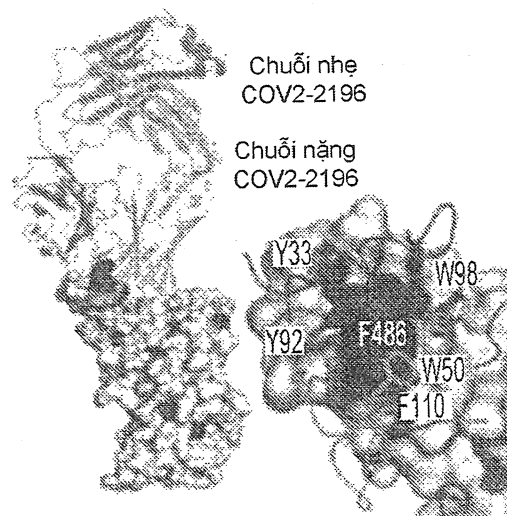


HÌNH 11A

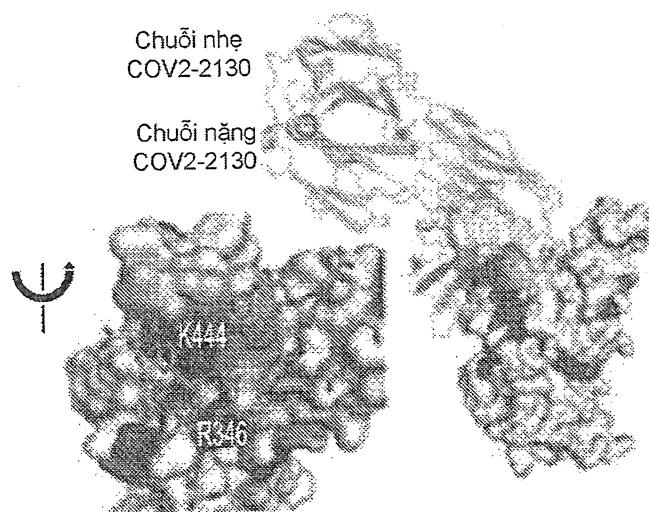


Sự liên kết ACE2
-2,0 -1,5 -1,0 -0,5 0,0

HÌNH 11B



HÌNH 11C



HÌNH 11D

Sự chọn lọc biến thể trốn thoát VSV-SARS-CoV-2

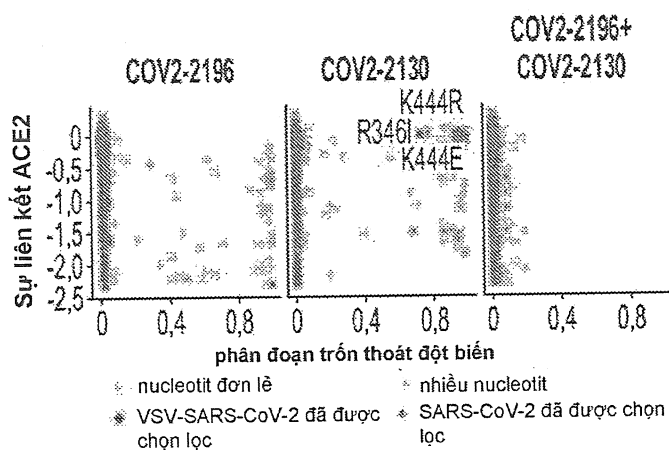
Điều kiện chọn lọc	Bản sao có sự trốn thoát/tổng cộng	Đột biến được nhận diện
COV2-2196	0/88 (0%)	N/A
COV2-2130	8/20 (40%)	K444R (6), K444E (2)
Hỗn hợp (2196+2130)	0/104 (0%)	N/A

HÌNH 11E

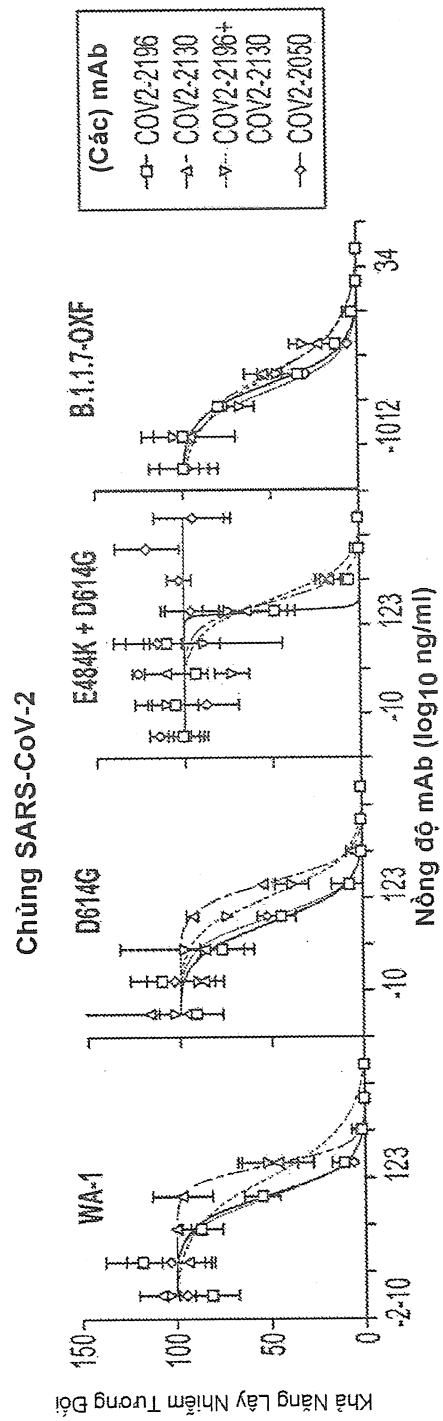
Sự chọn lọc biến thể kháng SARS-CoV-2

Điều kiện cấy chuyển	Điều kiện thử nghiệm	Tính kháng được phát hiện	Đột biến được nhận diện
AZD8895 (COV2-2196)	AZD8895 AZD7442	Không Không	N/A
AZD1061 (COV2-2130)	AZD1061 AZD7442	Có Không	N74K, R346I N/A
AZD7442 (Hỗn hợp)	AZD7442	Không	N/A

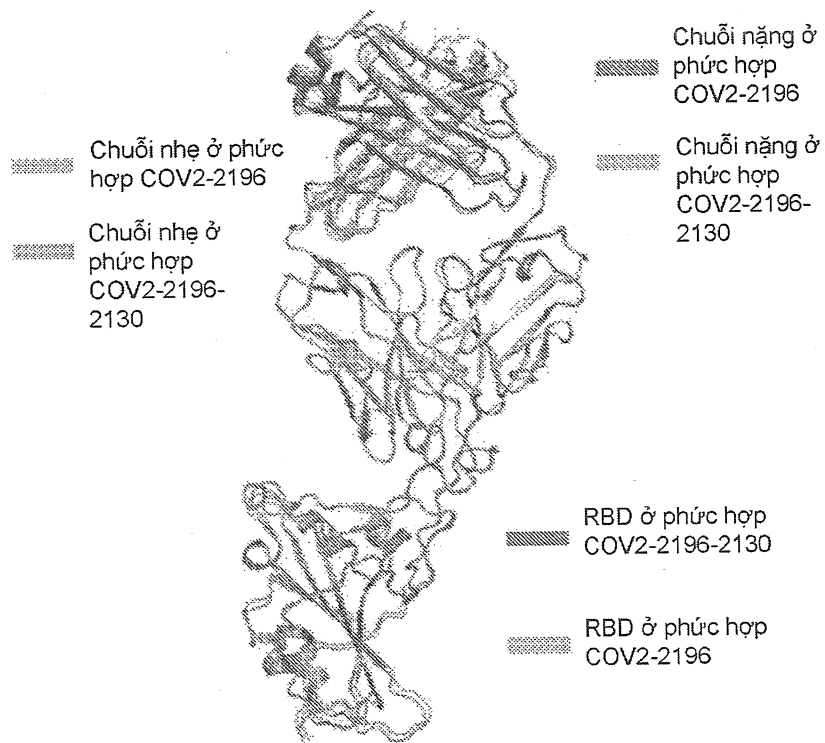
HÌNH 11F



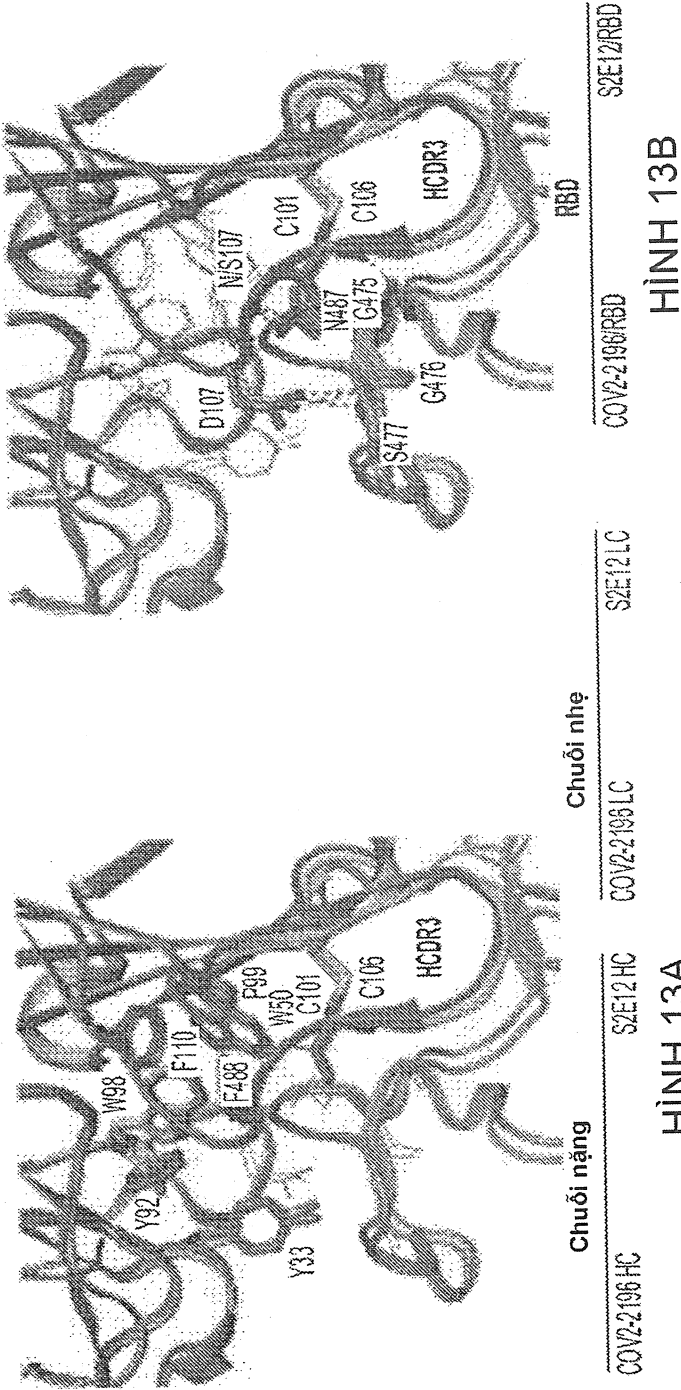
HÌNH 11G

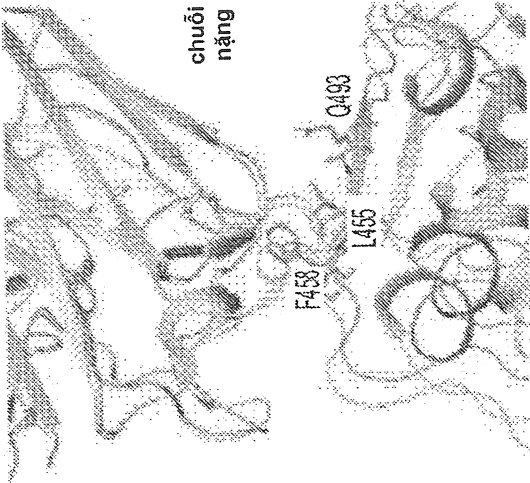


HÌNH 11H

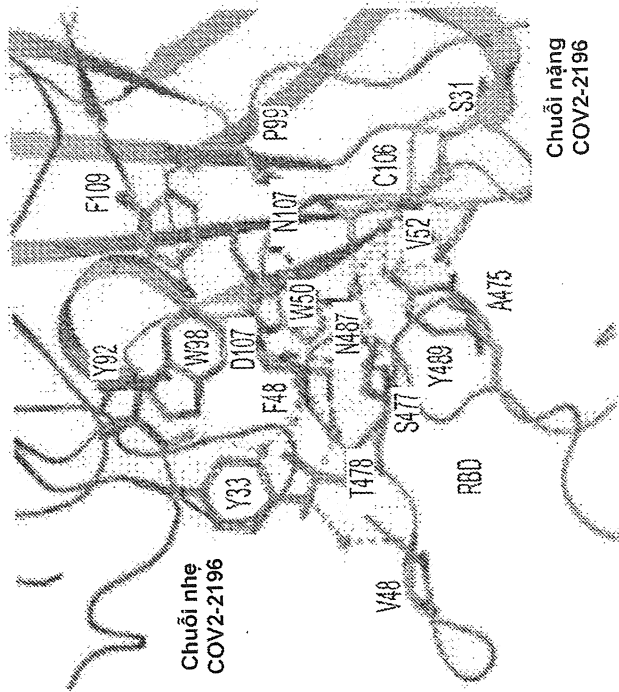


HÌNH 12



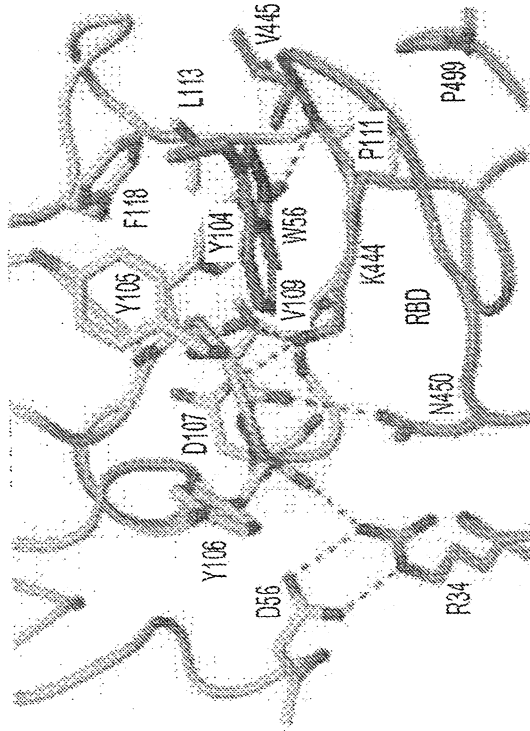


HÌNH 13D

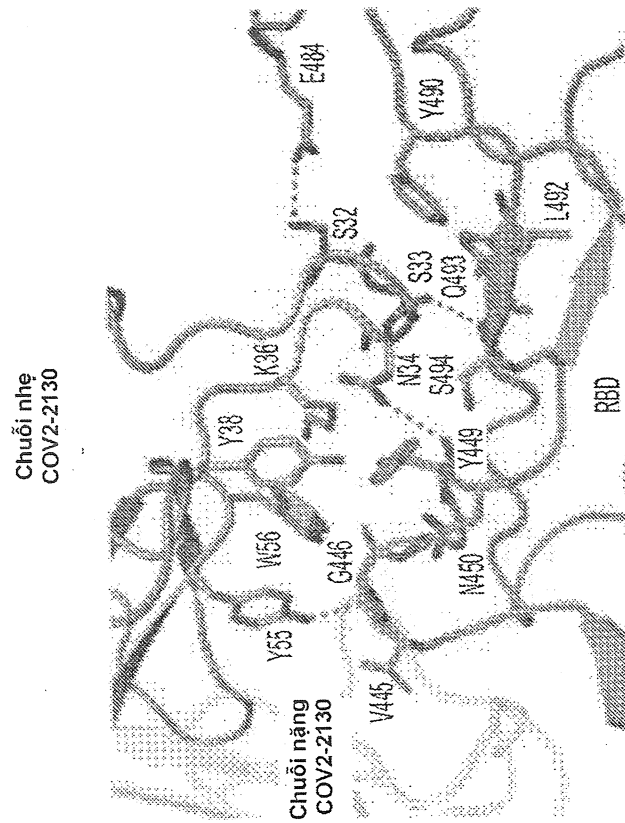


HÌNH 13C

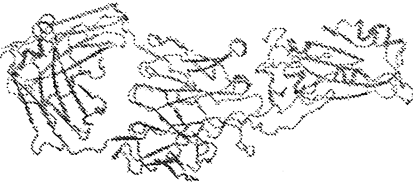
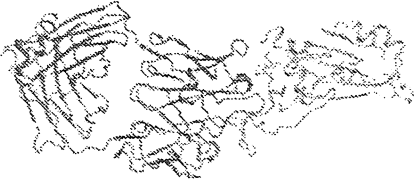
Chuỗi nặng
COV2-2130



HÌNH 13E



HÌNH 13F

				
HÌNH 14A	HÌNH 14B	HÌNH 14C	HÌNH 14D	HÌNH 14E
Chuối nặng				
COV2-2196 HC COV2-2381 HC S2E12 HC COV2-2072 HC				
Chuối nhẹ				
COV2-2196 LC COV2-2381 LC S2E12 LC COV2-2072 LC				
RBD				
RDB/COV2-2196 RDB/COV2-2381 RDB/S2E12 RDB/COV2-2072				

HÌNH 15A

Số lần
xuất hiện

Sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự axit amin chuỗi nhẹ

Đối
tượng

EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-	PWTFGGGTWVEIK	2.323
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSSPWTFFGGGTWVSIK	1.087	
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-LMTFFGGGTWVEIK	1.086	
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-SWTFGGGTWVEIK	601	
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSSPWTFFGGGTWVEIK	539	

HP1

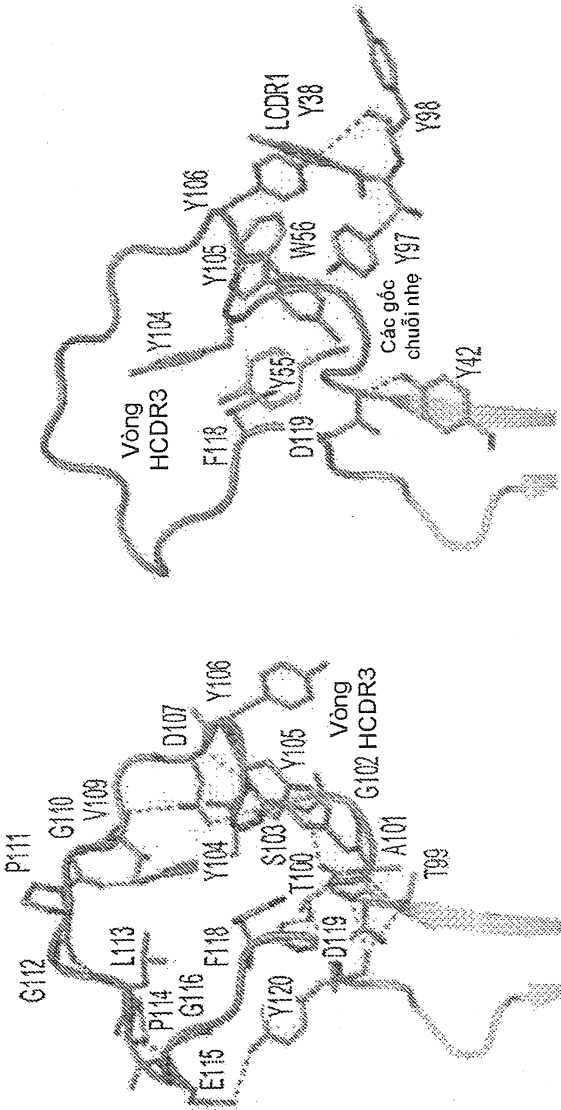
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-PWTFGGGTWVEIK	3.909
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-LMTFFGGGTWVEIK	2.205
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSSPWTFFGGGTWVSIK	1.747
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-SWTFGGGTWVEIK	1.246
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSSPWTFFGGGTWVEIK	1.230

HP2

EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-PWTFGGGTWVEIK	3.908
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-LMTFFGGGTWVEIK	1.889
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSSPWTFFGGGTWVSIK	1.809
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSS-SWTFGGGTWVEIK	1.293
EVIVLTQS	PCTLSLSPGERATLS	SCRASQSVSSSYLANVQOKPQAPRLL	YGASSRATGIPDR	FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYICQYCGSSPWTFFGGGTWVEIK	953

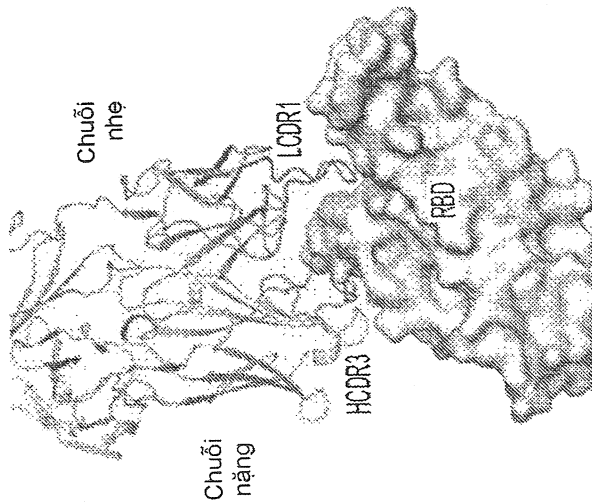
HP3

HÌNH 15B

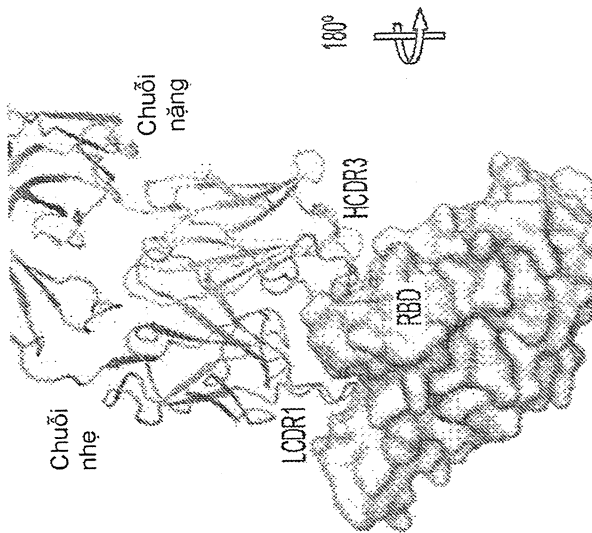


HÌNH 16B

HÌNH 16A

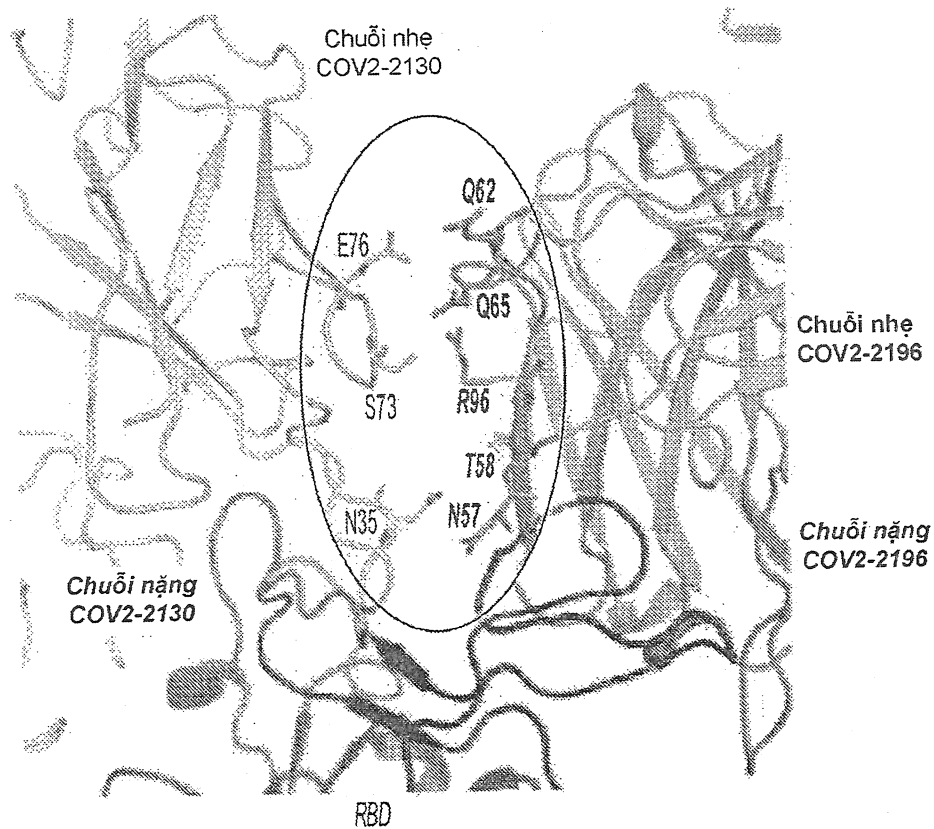


HÌNH 16D

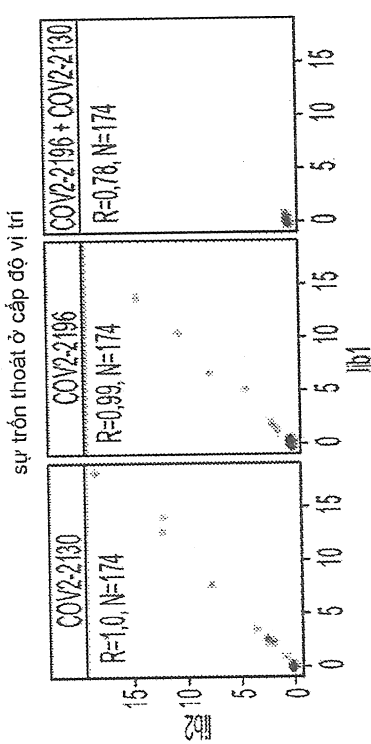


HÌNH 16C

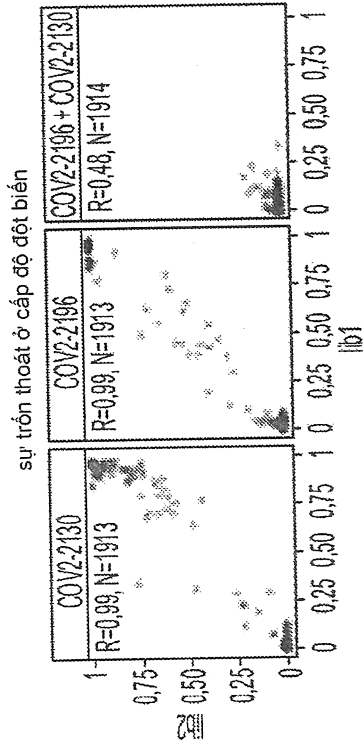
Sự tương tác của Fab COV2-2130 và Fab
COV2-2196 khi được liên kết với RBD



HÌNH 17



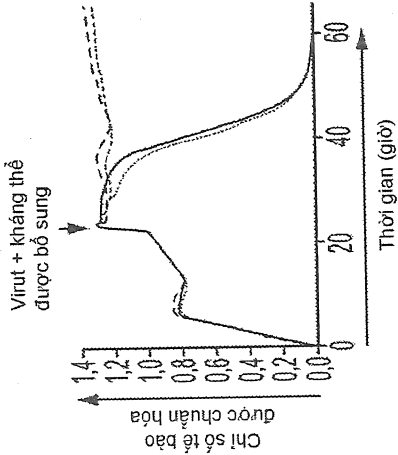
HÌNH 18B



HÌNH 18C

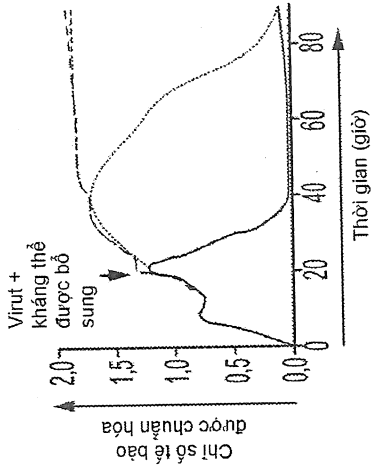


- Virut trốn thoát COV2-2130 (không có kháng thể)
- - - Đối chứng không lây nhiễm
- - - - Virut trốn thoát COV2-2130 + COV2-2196
- - - - - Virut trốn thoát COV2-2130 + COV2-2130

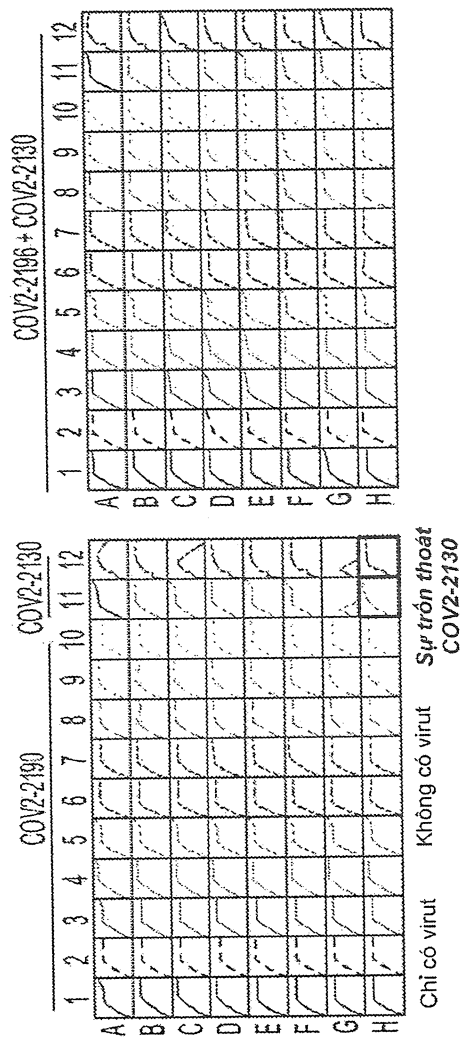


HÌNH 18H

- Đối chứng virut không có kháng thể
- - - Đối chứng không lây nhiễm
- - - - Sự trung hòa COV2-2130
- - - - - Sự trốn thoát COV2-2130

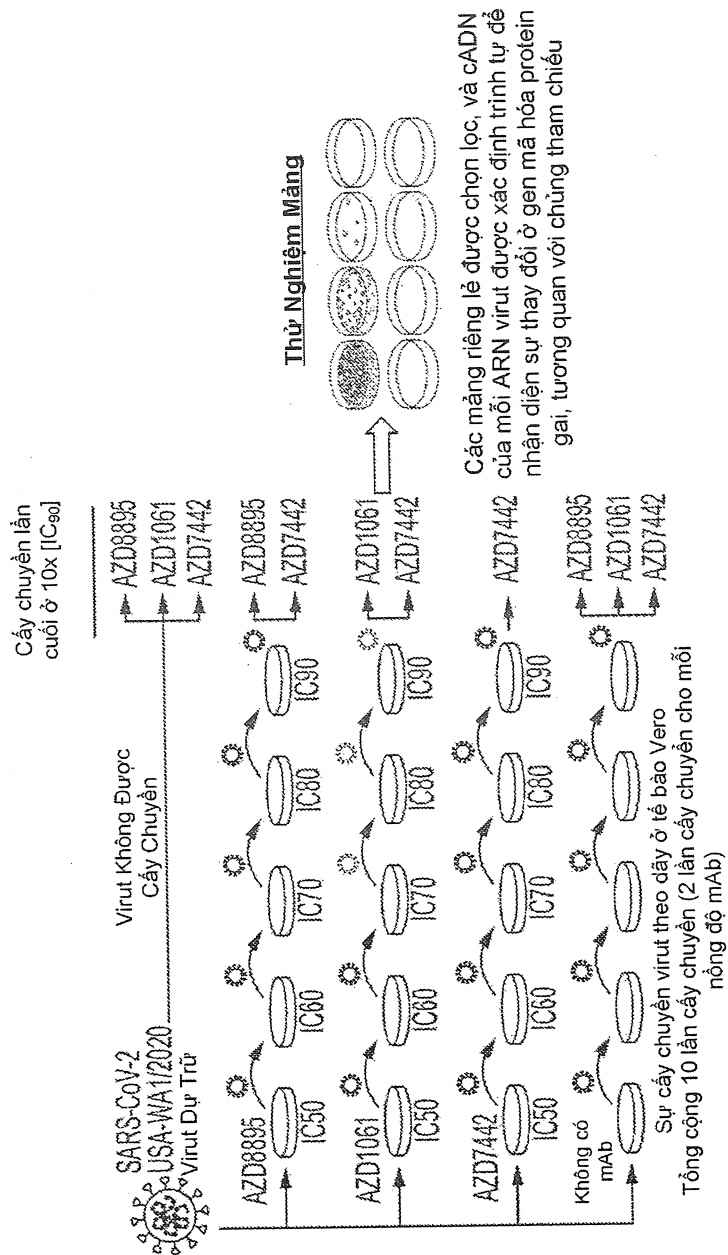


HÌNH 18G

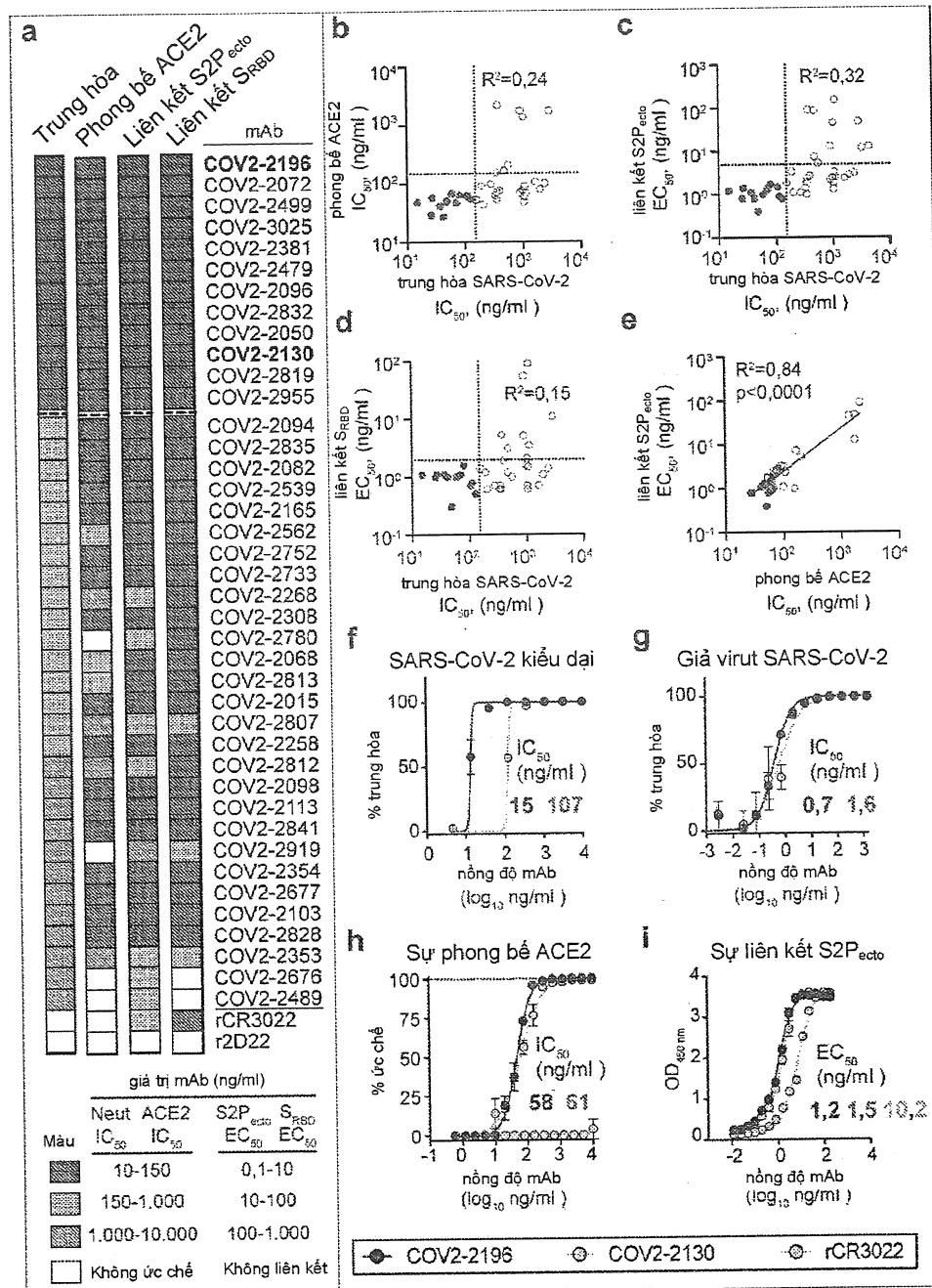


HÌNH 18I

Phương pháp cấy chuyển theo dây và thử nghiệm SARS-CoV-2 để chọn lọc các biến thể protein gai kháng mAb

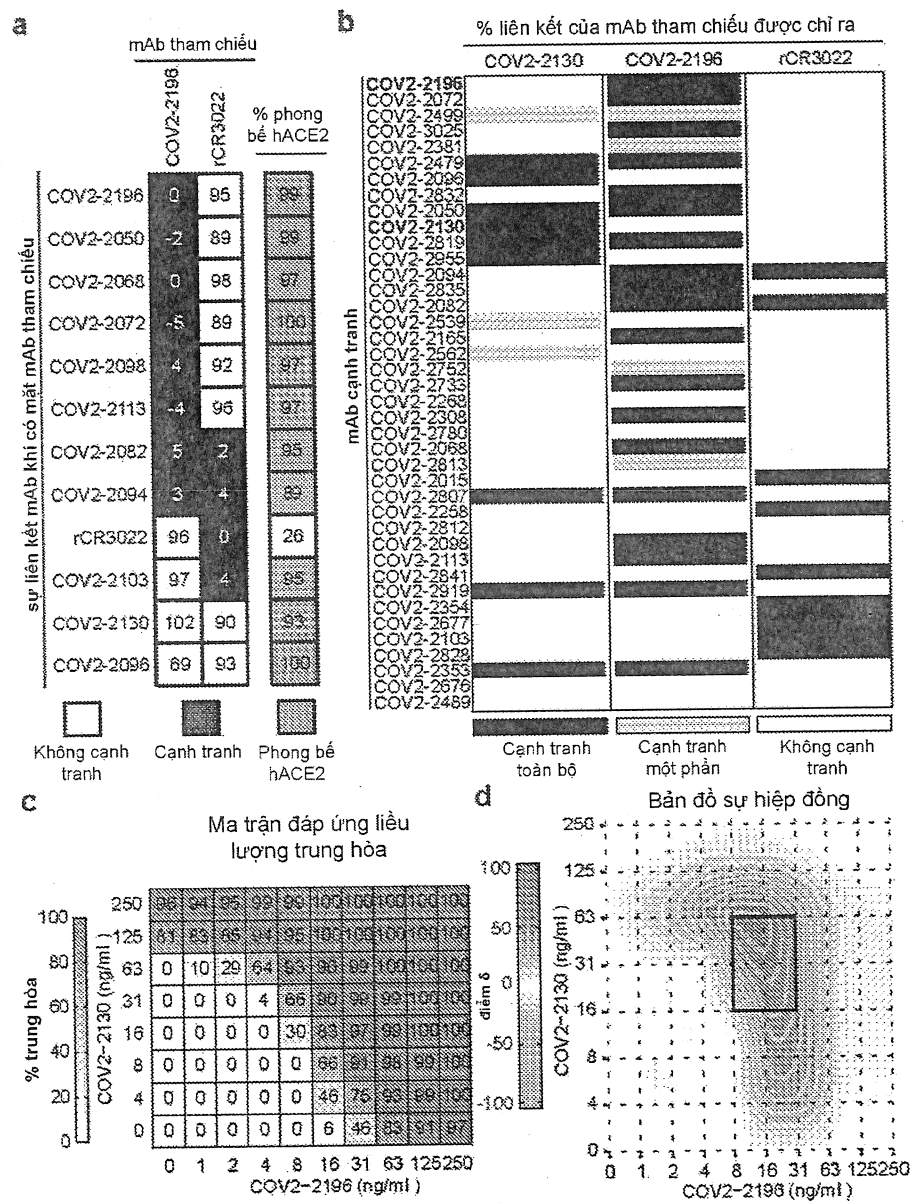


HÌNH 19

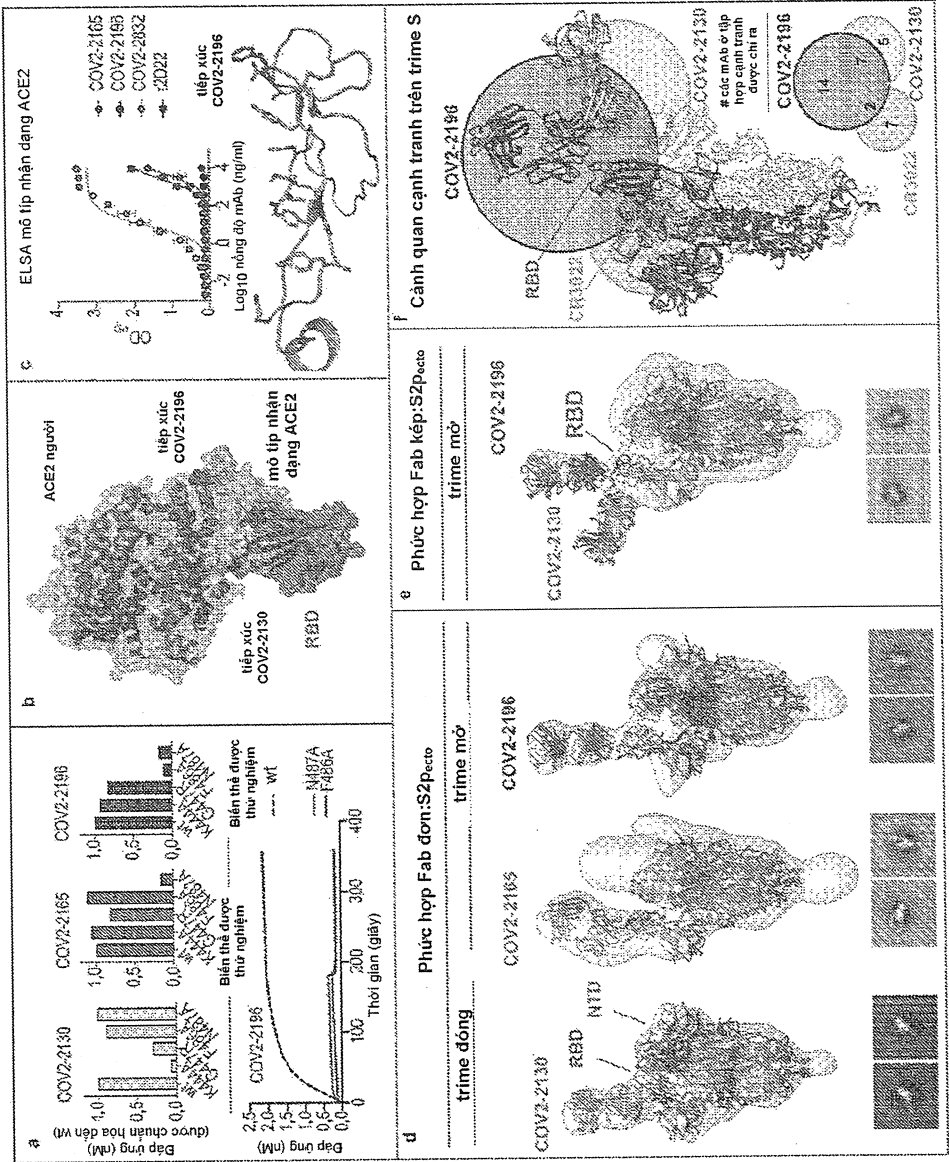


HÌNH 20

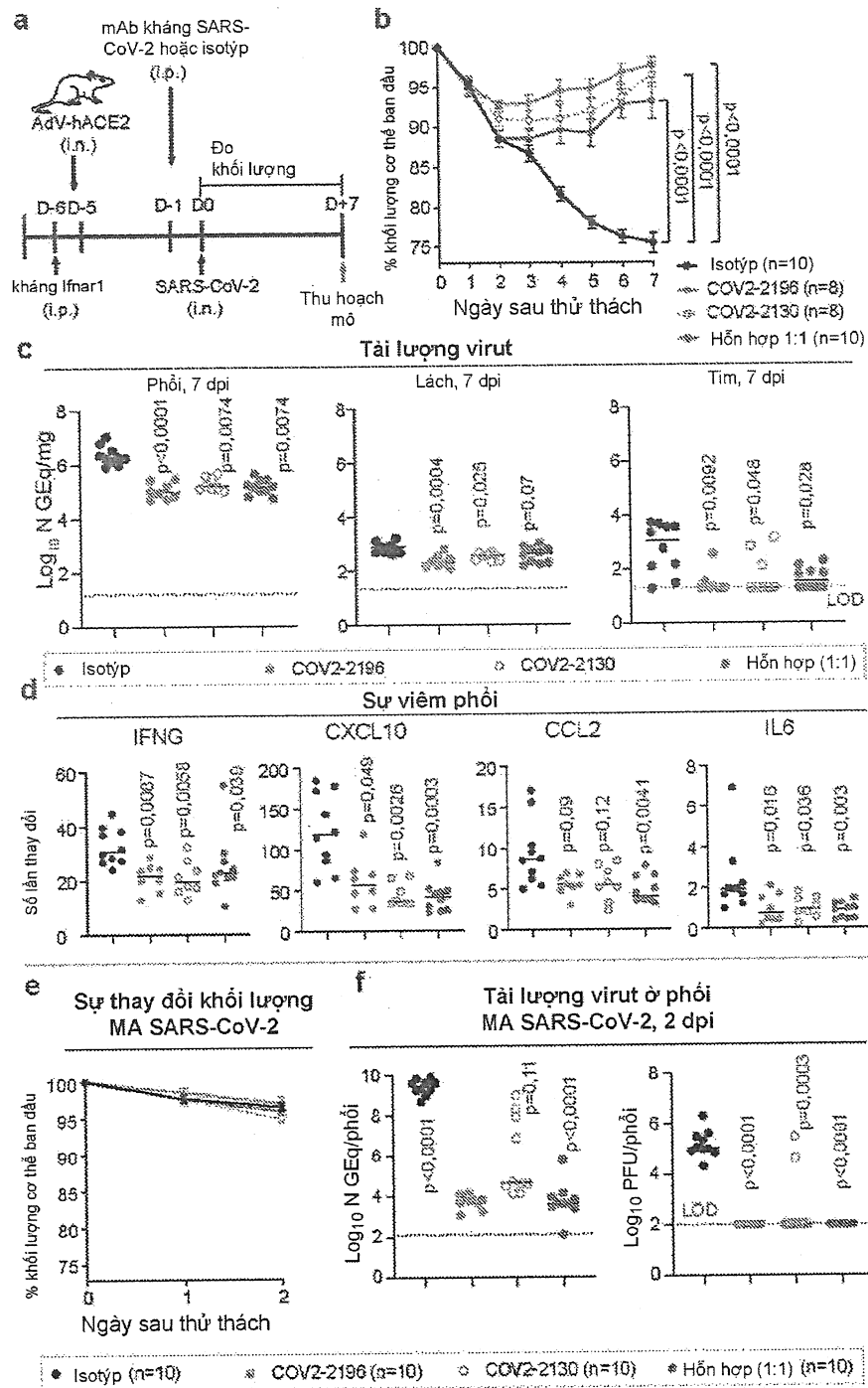
TRANG THAY THỂ (ĐIỀU 26)



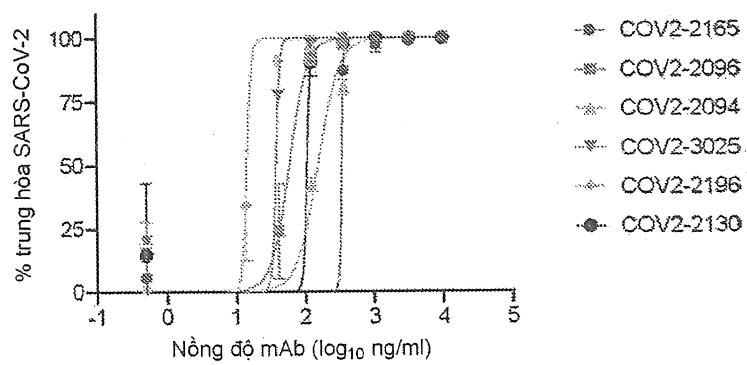
HÌNH 21



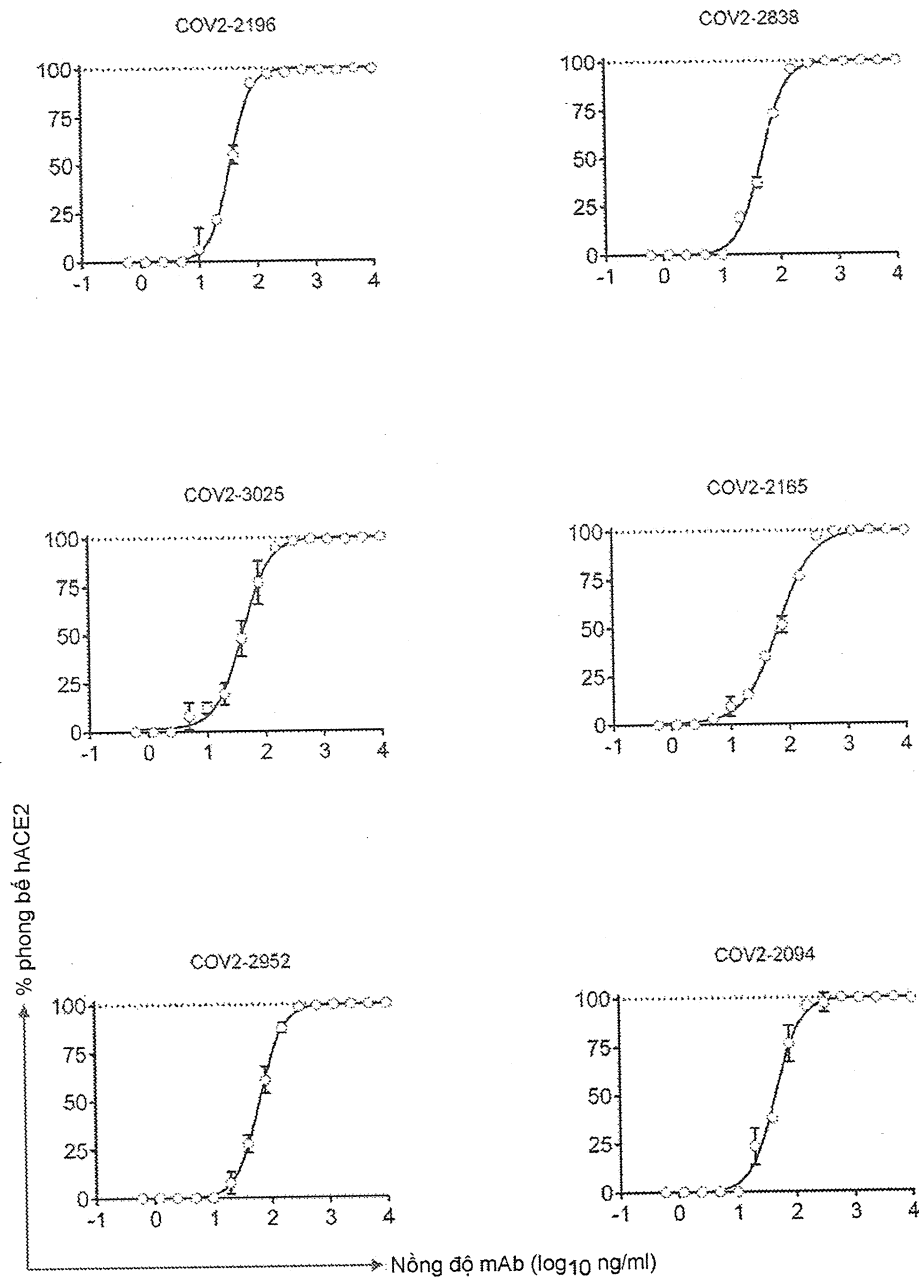
TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)



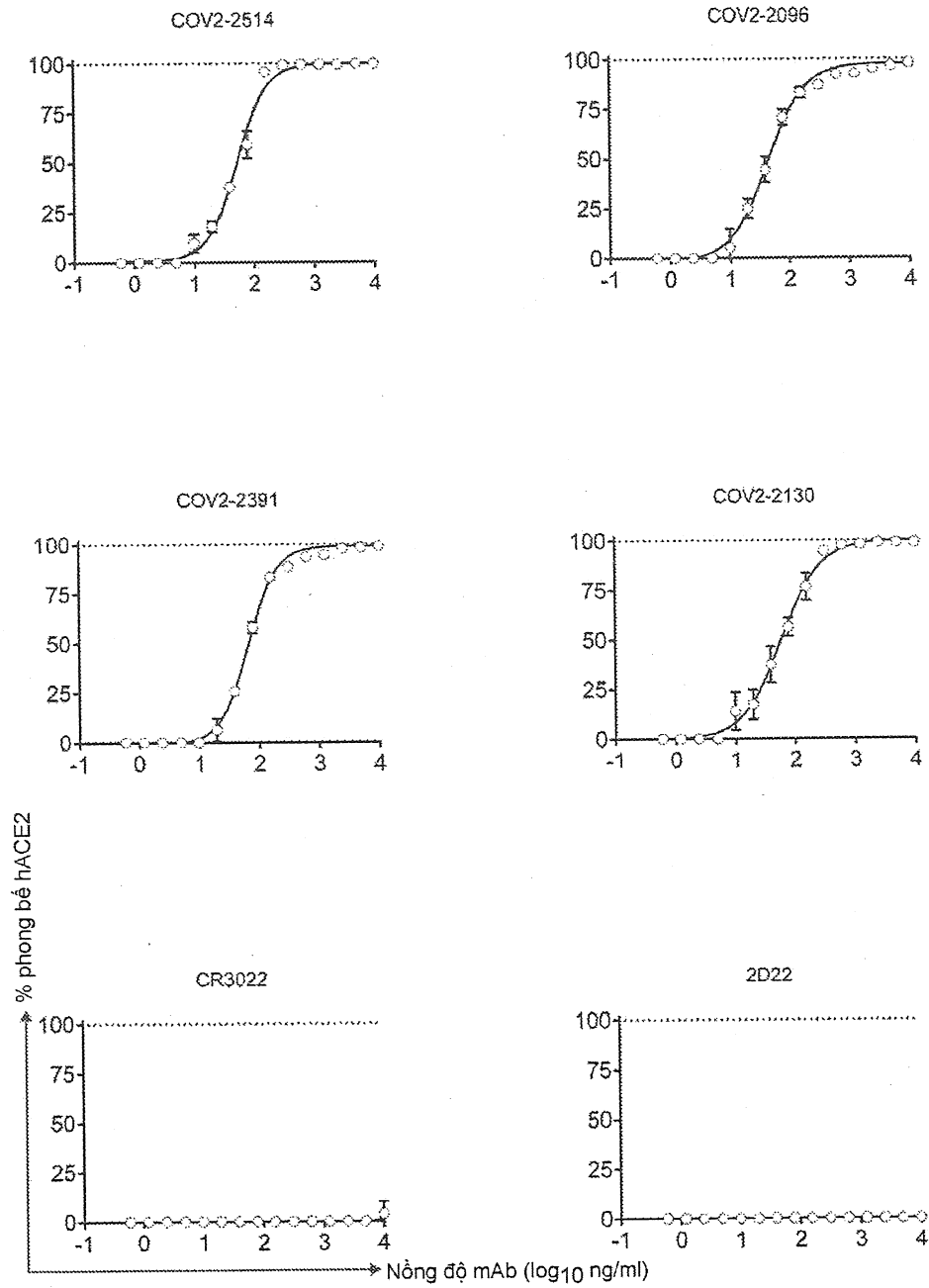
HÌNH 23



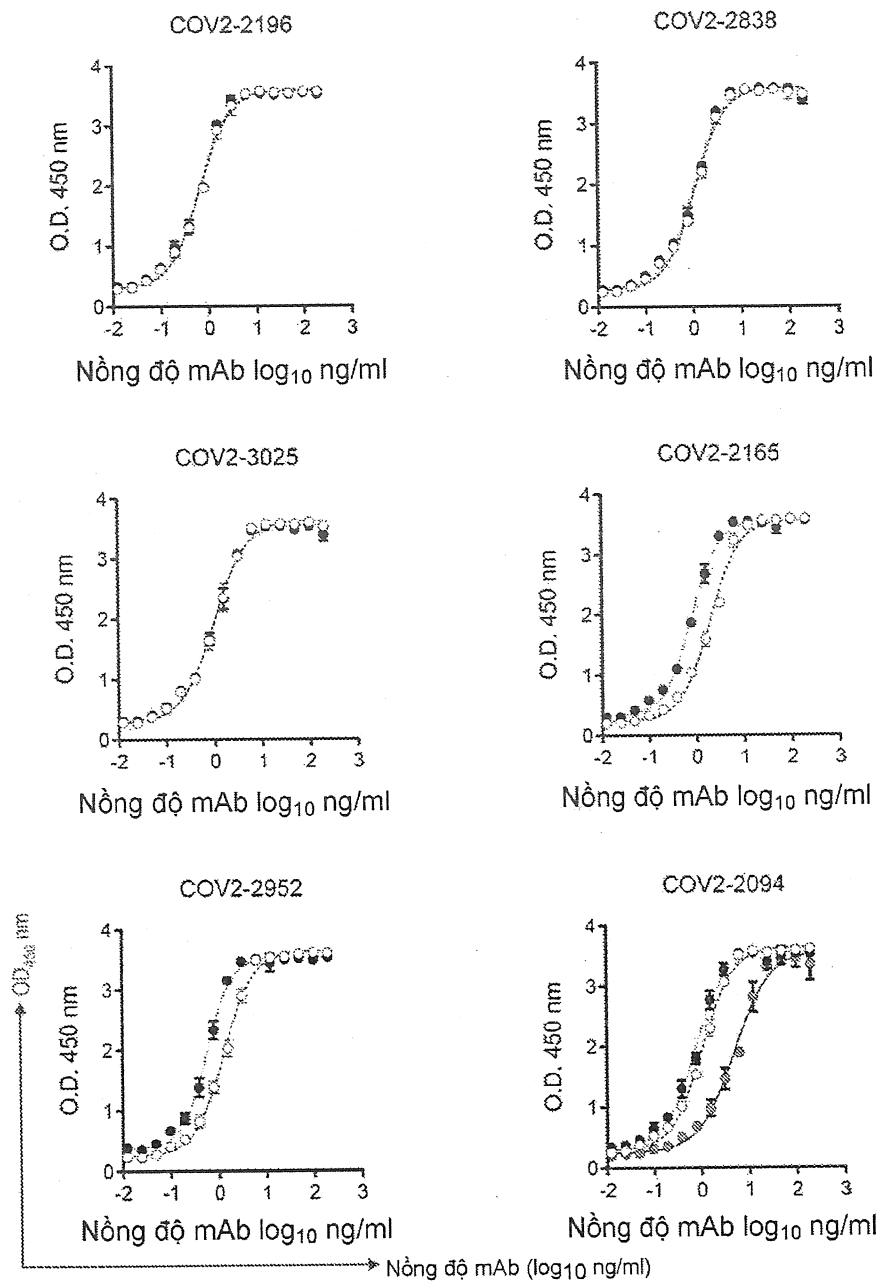
HÌNH 24



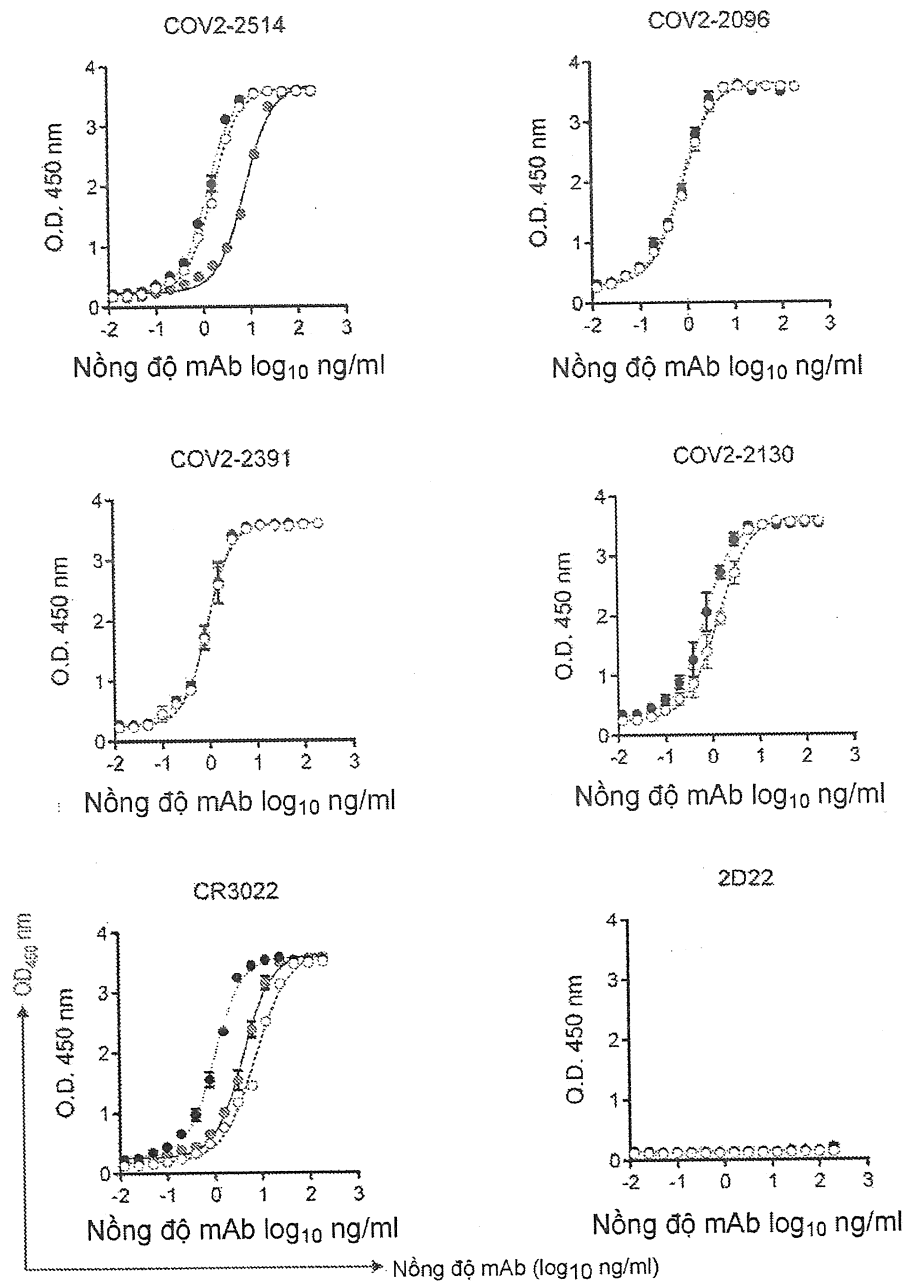
HÌNH 25A



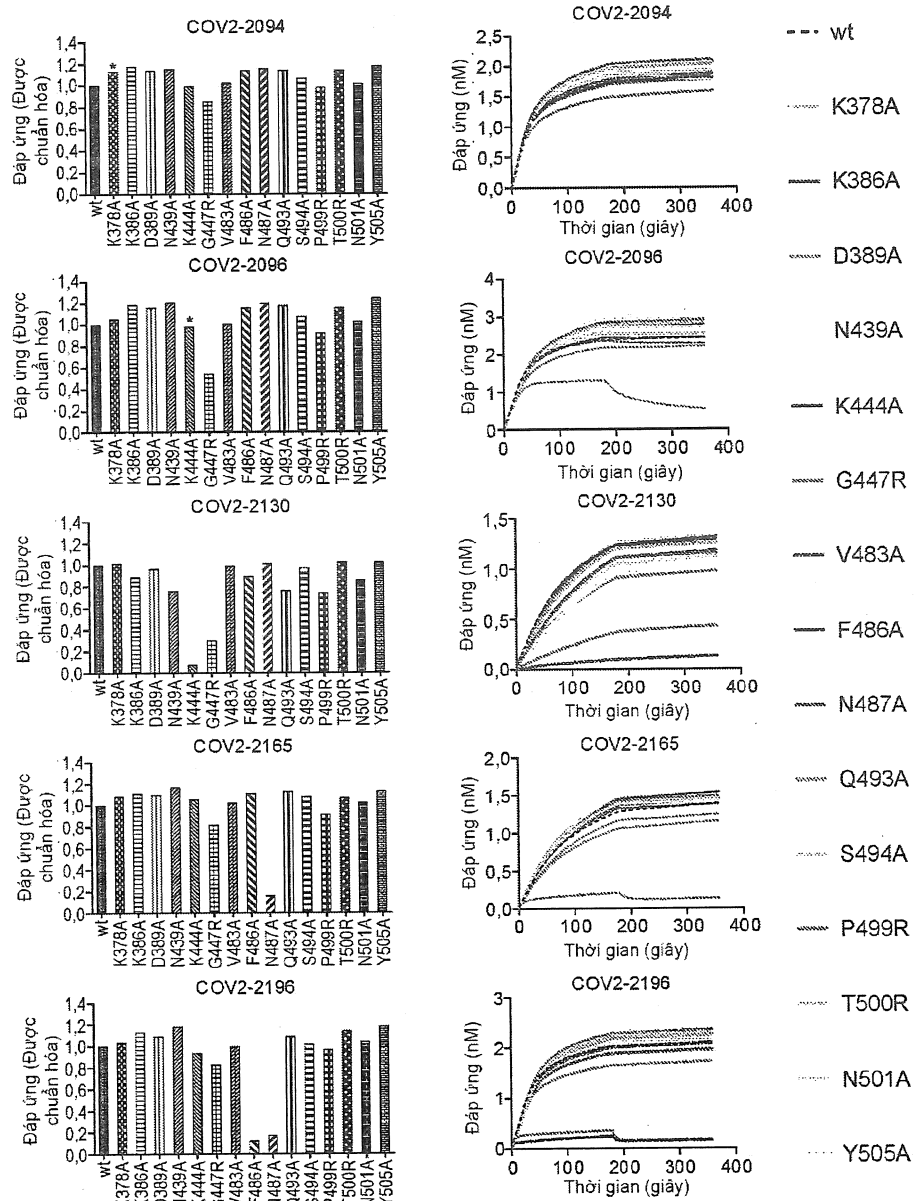
HÌNH 25B



HÌNH 26A

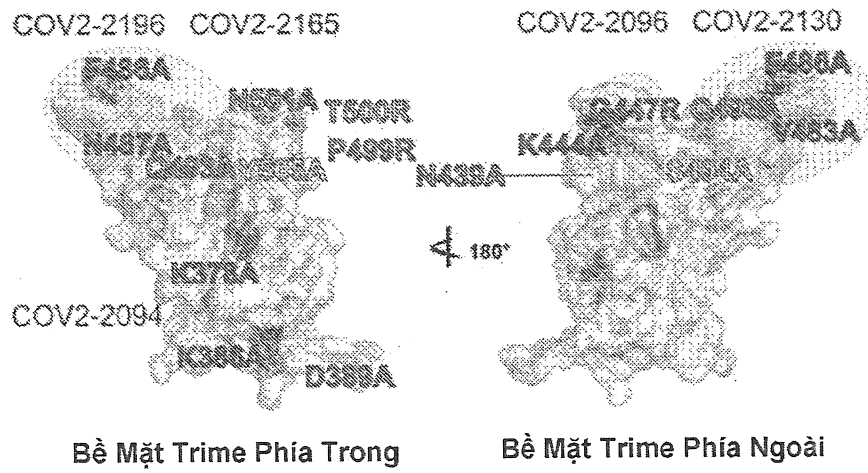


HÌNH 26B



HÌNH 27A

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)



HÌNH 27B