

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 6 月 2 日 (02.06.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/110962 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/10 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 39/42* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/116808

(22) 国际申请日: 2021 年 10 月 12 日 (12.10.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011339257.1 2020 年 11 月 25 日 (25.11.2020) CN

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路
199 号, Jiangsu 215000 (CN)。

(72) 发明人: 刘密(LIU, Mi); 中国江苏省苏州市工业
园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。 王义
鹏(WANG, Yipeng); 中国江苏省苏州市工业园
区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。 刁璐(DIAO,
Lu); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号,
Jiangsu 215000 (CN)。 马琳(MA, Lin); 中国江
苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000
(CN)。 章铭辉(ZHANG, Minghui); 中国江
苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000
(CN)。 镇学初(ZHEN, Xuechu); 中国江苏省苏州
市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。
龙亚秋(LONG, Yaqiu); 中国江苏省苏州市工业
园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理
事务所(普通合伙)(CENTRAL SOUTH WELL
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江

(54) Title: NEUTRALIZING ANTIBODY AGAINST SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME TYPE II CORONAVIRUS (SARS-COV-2)

(54) 发明名称: 抗严重急性呼吸系统综合征 II 型冠状病毒 SARS-COV-2 的中和抗体

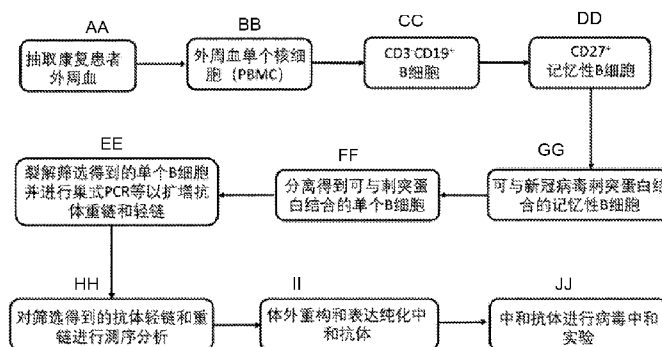


图 1

AA Extract the peripheral blood of a patient who has recovered
BB Peripheral blood mononuclear cell (PBMC)
CC CD3-CD19+ B cell
DD CD27+ memory B cell
EE Lyse the single B cell obtained by screening and perform nested PCR etc. to amplify the heavy and light chains of an antibody
FF Isolate and obtain a single B cell that can bind to the spike protein
GG Memory B cell that can bind to a novel coronavirus spike protein
HH Perform sequencing analysis on the light and heavy chains of the antibody obtained by screening
II In vitro re-constitution, expression and purification of a neutralizing antibody
JJ Perform a virus neutralization experiment using the neutralizing antibody

(57) Abstract: Disclosed is a neutralizing antibody against severe acute respiratory syndrome type II coronavirus (SARS-CoV-2), which belongs to the technical field of biomedicine. Peripheral immune cells are extracted from the blood of a patient who has recovered from COVID-19, and B cells that can bind to a novel coronavirus antigen protein-spike protein are screened therefrom. Analysis is then performed on single B cells producing antibodies at the single-cell level, thereby obtaining gene sequences which are in the B cells and encode the variable region heavy and light chains of the neutralizing antibody. These sequences can be used for the in vitro

江苏省苏州市吴中区石湖西路188号吴中万达广场A座苏州大学国家科技园2303, Jiangsu 215000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

re-construction and expression of the neutralizing antibody that can neutralize novel coronavirus and are expected to be used for the treatment and prevention of diseases such as pneumonia caused by the novel coronavirus.

(57) 摘要: 公开了一种抗严重急性呼吸系统综合征II型冠状病毒SARS-COV-2的中和抗体, 属于生物医药技术领域。从COVID-19康复患者血液中提取外周免疫细胞, 并从中筛选可以和新冠病毒抗原蛋白-刺突蛋白结合的B细胞, 然后对以生产抗体的单个B细胞在单细胞水平上进行分析, 获得了B细胞内编码中和抗体可变区重链和轻链的基因序列。这些序列即可用来体外重新构建和表达可中和新冠病毒的中和抗体, 有望用于新冠病毒所引起的肺炎等疾病的治疗和预防。

抗严重急性呼吸系统综合征 II 型冠状病毒 SARS-COV-2 的中和抗体

技术领域

5 本发明涉及一种抗严重急性呼吸系统综合征 II 型冠状病毒 SARS-COV-2 的中和抗体，属于生物医药技术领域。

背景技术

 抗严重急性呼吸系统综合征 II 型冠状病毒 (SARS-CoV 2) 感染引起的肺炎 (COVID-19) 是严重传染性疾病，并在全球范围内造成了严重影响。寻找针对该病毒的有效治疗方案是一种迫切需求。

 中和抗体是指与病毒结合后能消除病毒感染能力的抗体，是当病原微生物侵入机体时由 B 淋巴细胞而产生的相应的抗体，是由适应性免疫应答细胞分泌的一种可溶性蛋白。病原微生物入侵细胞时需要依赖病原体自身表达的特定分子与细胞上的受体结合，才能感染细胞，并进一步扩增。中和抗体能够与病原微生物表面的抗原结合，从而阻止该病原微生物黏附靶细胞受体，防止侵入细胞。病毒侵入人体之后，B 细胞把中和抗体分泌到血液里，抗体与血液里的病毒颗粒结合，阻止病毒感染细胞，破坏病毒颗粒，这样就把病毒“中和”掉了。由此可见，中和抗体在杀灭细胞外的游离病毒时起主要作用。

 来自病毒感染治愈患者血液的某些特异性中和抗体具有中和病毒的作用，因而可用于感染性疾病的治疗，使病毒丧失致病力。随着抗体制备技术的进步，治疗性抗体已逐渐在多种疾病的治疗方面发挥了很好的效果。现有的疫苗如麻疹疫苗、脊髓灰质炎疫苗、乙肝疫苗、甲肝疫苗，都是使接种者产生中和抗体以预防病毒感染的。由于中和抗体可在病毒进入细胞之前破坏病毒并可清除体内细胞外的游离病毒，所以，基于病毒感染痊愈患者血液中的中和抗体可用于病毒感染的治疗。

发明内容

25 为解决上述技术问题，本发明从 COVID-19 康复患者血液中提取外周免疫细胞，并从中筛选可以和新冠病毒抗原蛋白-刺突蛋白结合的 B 细胞，然后对以生产抗体的单个 B 细胞在单细胞水平上进行分析，获得了 B 细胞内编码中和抗体可变区重链和轻链的基因序列。这些序列即可用来体外重新构建和表达可中和新冠病毒的中和抗体，有望用于新冠病毒所引起的肺炎等疾病的治疗和预防。

本发明的第一个目的是提供一种抗严重急性呼吸系统综合征 II 型冠状病毒 SARS-COV-2 的中和抗体，包括：轻链可变区 DNA 序列，以及重链可变区 DNA 序列；

所述轻链可变区 DNA 序列的核苷酸序列为 SEQ ID NO.1-5 中的一种或多种组合；

所述重链可变区 DNA 序列的核苷酸序列为 SEQ ID NO.6-8 中的一种或多种。

5 进一步地，所述的中和抗体为包含恒定区和可变区的完整抗体、只包含可变区的部分抗体或只包含可变区的嵌合抗体。

本发明的第二个目的是提供一种编码所述的中和抗体的基因。

本发明的第三个目的是提供一种携带所述的基因的表达载体。

本发明的第四个目的是提供一种表达所述的中和抗体的重组细胞。

10 本发明的第五个目的是提供所述的中和抗体在制备治疗肺炎 COVID-19 的药物中的应用。

本发明的第六个目的是提供一种治疗肺炎 COVID-19 的试剂盒，所述试剂盒内含有所述的中和抗体。

本发明的有益效果是：

15 本发明从 COVID-19 康复患者血液中提取外周免疫细胞，并从中筛选可以和新冠病毒抗原蛋白-刺突蛋白结合的 B 细胞，然后对以生产抗体的单个 B 细胞在单细胞水平上进行分析，获得了 B 细胞内编码中和抗体可变区重链和轻链的基因序列。这些序列即可用来体外重新构建和表达可中和新冠病毒的中和抗体，有望用于新冠病毒所引起的肺炎等疾病的治疗和预防。

20 附图说明

图 1 为利用 COVID-19 康复患者血液中的单个 B 细胞筛选中和抗体流程示意图；

图 2 为采用 SDS-PAGE 分析表达纯化后的抗体实验结果；

图 3 为阴性对照抗体 Pmab（无中和效果）和中和抗体 HC5K VH/B5K VL（ $IC_{50} \sim 0.1273 \mu g/mL$ ）假病毒中和实验结果；

25 图 4 为中和抗体 D5K VH/B5K VL 假病毒中和实验结果（ $IC_{50} \sim 0.00033 \mu g/mL$ ）；

图 5 为中和抗体 HC5K VH/D4K VL（ $IC_{50} \sim 0.00084 \mu g/mL$ ）和中和抗体 HF4L VH/D5K VL（ $IC_{50} \sim 0.0046 \mu g/mL$ ）假病毒中和实验结果；

图 6 为中和抗体 HC5K VH/D5K VL（ $IC_{50} \sim 0.0066 \mu g/mL$ ）和中和抗体 HD5K VH/A5K VL（ $IC_{50} \sim 0.0017 \mu g/mL$ ）假病毒中和实验结果；

30 图 7 为中和抗体 HF4L VH/A5K VL（ $IC_{50} \sim 0.6049 \mu g/mL$ ）和中和抗体 HF4L VH/B5K VL（ $IC_{50} \sim 0.6077 \mu g/mL$ ）假病毒中和实验结果；

图 8 为中和抗体 HD5K VH/D4K VL ($IC_{50} \sim 0.1996 \mu g/mL$) 假病毒中和实验结果。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

5 实施例 1: 可和 SARS-COV-2 结合的单个 B 细胞的分离提取

抽取多个新冠病毒肺炎康复患者血液约 15 mL, 采用 Ficoll 梯度法分离提取每个康复患者血液中的外周血单个核细胞 (PBMC), 并将所得 PBMC 洗涤两遍后备用。

在每个 PBMC 样品中先加入 Fc block, 作用 15 分钟后依次加入 APC-H7 标记的抗人 CD3 抗体, BV421 标记的抗人 CD19 抗体, BB700 标记的抗人 CD27 抗体, Biotin 标记的 SARS-COV-2 刺突蛋白, Biotin 标记的 SARS-COV-2 Spike RBD。尔后加入 Streptavidin-APC 并作用 30 分钟。尔后采用 FACS AriaTMIII 流式细胞仪上样分析收集抗体标记好的 PBMC 样品。CD3 为 T 细胞的特异性表面标志物, CD19 为 B 细胞的特异性表面标志物, CD27 为记忆性 B 细胞的特异性表面标志物, Biotin 标记的两种抗原可以和 APC 标记的 Streptavidin 特异性的结合, 所以 APC 阳性的细胞即是可以和 SARS-COV-2 特异性结合的细胞。选取 CD3⁺CD19⁺CD27⁺APC⁺的细胞即是我们在寻找的可以和 SARS-COV-2 特异性结合的记忆性 B 细胞。将该类 B 细胞利用流式细胞仪进行单个 B 细胞分离并直接打入预先载有细胞裂解液的 96 孔板, 立即封膜, 并置于干冰上迅速冷冻, 然后置于 -80℃ 保存待用。这样即可以分离得到能和 SARS-COV-2 特异性结合的单个 B 细胞。

实施例 2: 单个 B 细胞中可变区轻链和重链的扩增和测序

20 因为 B 细胞为分泌抗体的细胞, 所以能和 SARS-COV-2 结合的 B 细胞内储存有抗体的序列信息。将 96 孔板中已经裂解得到的单个 B 细胞裂解液分成 3 份。一份用于进行 Kappa 轻链序列分析, 一份进行 lamda 轻链的序列分析, 另一份进行重链序列的分析。

在该部分实验中, 先用 RT-PCR 反转录得到 cDNA 文库, 然后利用巢式 PCR 技术扩增单个细胞中的 DNA 序列。因为实验中所使用的引物为轻链可变区或重链可变区特异性的引物, 所以所得序列即为该单个 B 细胞中的抗体可变区轻链和重链部分的序列。将扩增所得序列进行 DNA 测序分析即得单个 B 细胞中所包含的抗体可变区轻链和重链的序列信息。

RT-PCR 扩增单 B 细胞抗体轻重链可变区基因

设计 RT-PCR 引物 (SEQ ID NO.9-25), 如表 1 所示:

表 1

κ 链引物	5′L Vκ1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
	5′L Vκ3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
	5′L Vκ4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGAGCTCTG
	3′Cκ543-566	AGTAGTCCTTCACCAGGCAGCCCAG
λ 链引物	5′L Vλ1	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG
	5′L Vλ2	GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG
	5′L Vλ3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG
	5′L Vλ4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG
	5′L Vλ6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG
	5′L Vλ7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG
	5′L Vλ8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG
	3′Cλ	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG
H 链引物	5′L VH1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
	5′L VH3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
	5′L VH4/6	CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
	5′L VH5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG
	HuIgG-const-anti	TCTTGTCACCTTGGTGTGCT

以分选出的单个 B 细胞作为模板，进行单个 B 细胞 RT-PCR。PCR 体系配置及加样均在生物安全柜中完成并置于冰上操作，RT-PCR 反应体系及反应条件如下：

PCR 反应体系：

表 2

成分	体系	终浓度
无 RNA 酶的水	-	-
5× RT-PCR 缓冲液	10.0 μl	1×
dNTP 混合物	2.0 μl	每种 dNTP 400 μM
A 引物	-	0.6 μM
B 引物	-	0.6 μM
混合酶	2.0 μl	
RNA 酶抑制剂	-	5-10 个单位
模板 RNA	-	1 pg – 2 μg
总体系	50.0 μl	-

PCR 反应条件：

50℃ 30 min

95℃ 15 min

95℃ 1 min

55℃ 1 min

72℃ 1 min

} 40 cycles

72℃ 10 min。

巢式 PCR 扩增单 B 细胞抗体轻重链可变区基因

设计巢式 PCR 引物（SEQ ID NO.26-38），如表 3 所示：

表 3

κ 链引物	5'Pan Vκ	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCTG
	3'Cκ 494-516	GTGCTGTCCTTGCTGTCTGCT
λ 链引物	5'AgeI Vλ1	CTGCTACCGGTTCTGTTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG
	5'AgeI Vλ2	CTGCTACCGGTTCTGTTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG
	5'AgeI Vλ3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG
	5'AgeI Vλ4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA
	5'AgeI Vλ6	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTATGCTGACTCAG
	5'AgeI Vλ7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG
	3'XhoI Cλ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG
H 链引物	VH3a-sense	SARGTGCAGCTCGTGGAG
	VH3b-sense	GAGGTGCAGCTGTTGGAG
	MuD	GGAATTCTCACAGGAGACGA
	PW-Cgamma	AGTAGTCCTTGACCAGGCAGCCCAG

以 RT-PCR 产物为模板，建立三个 PCR 反应体系，分别扩增抗体的 H 链、κ 链、λ 链的可变区基因，每个反应体系分别使用与其对应的混合引物，巢式 PCR 反应体系及反应条件如下：

5 PCR 反应体系：

表 4

PCR 试剂	每个样品的体积(μl)(25μl 体系)	最终浓度
Taq DNA 聚合酶	0.25	50U ml ⁻¹
10×缓冲液	2.5	1×
dNTPs(10 mM)	0.5	200μM
正向引物:VH3a 和 VH3b 或 PanVκ	0.5	1.2μM
反向引物:PW-Cgamma 或 CK494-516	0.5	1.2μM
无 RNA 酶的水	17.25- 19.25 (补齐体系至 24μl)	-
模板	1.0	-

PCR 反应条件：

95℃ 4 min

95℃ 1 min

57℃ 1 min

72℃ 1.5 min

72℃ 10 min

} 40 cycles

实施例 3：实验结果

本申请从康复患者可以结合新冠病毒刺突蛋白的 B 细胞中共得到 5 个轻链可变区序列，3 个重链可变区序列。该 5 个轻链可变区序列和 3 个重链可变区序列可以自由组合成为抗体即为新冠病毒 SARS-COV-2 的中和抗体。

其中，5 个轻链可变区分别命名为 A5K VL (SEQ ID NO.1)、B5K VL (SEQ ID NO.2)、D4K VL (SEQ ID NO.3)、D5K VL (SEQ ID NO.4) 和 D7K VL (SEQ ID NO.5)，3 个重链可变区分别命名为 HD5K VH (SEQ ID NO.6)、HF4L VH (SEQ ID NO.7) 和 HC5K VH

(SEQ ID NO.8)。

按照如下方法进行抗体的表达与纯化：

本实施例构建了 9 种抗体，分别为：HC5K VH/B5K VL、HD5K VH/D4K VL、HF4L VH/A5K VL、HF4L VH/B5K VL、HD5K VH/B5K VL、HC5K VH/D4K VL、HF4L VH/D5K VL、
5 HC5K VH/D5K VL 和 HD5K VH/A5K VL。

1、载体构建

按照对应的抗体轻链和重链设计引物，扩增对应的 VH 和 VL 序列。利用重组酶 (ClonExpress II One Step Cloning Kit, C112-01/02, Vazyme)，将扩增好的 VH 和 VL 序列重组至抗体表达载体骨架质粒上，菌液送测序验证。

10 2、质粒抽提

将验证正确的克隆菌接种到 LB(Amp 100ug/ml) 培养基中，37℃过夜培养，第二天用质粒大抽试剂盒抽提质粒，并测定浓度。

3、细胞瞬转表达

将抽提好的质粒瞬转 293F 细胞，具体如下：

15 1) 计数处于对数生长期的 293F，用新鲜的 293 培养基重新悬浮细胞，使其密度达到 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ，总体积 100mL。

2) 用培养基稀释 100ug 质粒。

3) 用培养基稀释 PEI(1μg/μL)，将稀释后的 PEI 加到稀释后的质粒 DNA 中。旋转和/或颠倒试管或用移液器轻轻吹打 2 至 3 次进行混合。将复合物在室温下孵育约 20 分钟。

20 4) 质粒/PEI 混合物加入细胞悬液中，在添加过程中轻轻摇动摇瓶，放置在 37℃，8% CO₂，125rpm 中培养。

5) 在转染后 16-22 小时向摇瓶中添加 5% (v/v) 补料，在添加过程中轻轻晃动摇瓶，将摇瓶放回 37℃培养箱。

6) 第 6 天收获上清。

25 4、抗体纯化

1) 收获上清

利用离心机离心，收获上清。上清用 0.4um 滤膜过滤，对接纯化柱。

2) 蛋白纯化

选择选用 GE 公司的 Protein A 亲和填料 Mabselect SuRe™，去除培养基组分，富集目的蛋白。
30

5、采用 SDS-PAGE 分析纯化所得蛋白质

采用 SDS-PAGE 电泳分析纯化得到的抗体。在分析过程中所使用的分离胶浓度为 4-20%。先将样品还原，然后还原样品加入 Loading Buffer 后 70℃煮 10min 后上样分析。结果如图 2 所示。

实施例 4：假病毒中和实验

5 本实验以携带新冠病毒刺突蛋白的假病毒来进行新冠中和抗体的评价。该病毒系统以携带荧光素酶报告基因的 HIV-1 为病毒骨架，同时在病毒外壳表达新冠病毒 Spike 蛋白，形成的假病毒颗粒感染外源性高表达 ACE2 的细胞系，高度模拟了新冠病毒通过 Spike-ACE2 对目的细胞的入侵过程，该假病毒颗粒感染目的细胞的程度与荧光素酶的发光值呈正相关，与抗体的中和活性呈负相关。

10 中和抗体在体外与病毒外壳的 S 蛋白结合，封闭了 S 蛋白上与 ACE2 结合的位点，导致 S 蛋白无法与 ACE2 结合，病毒无法入侵细胞；反之，没有中和活性的抗体无法干扰 S 蛋白与细胞表面 ACE2 的结合，进入细胞的病毒会表达 Fluc 蛋白，在与发光底物反应后通过酶标仪检测其发光值。

实验步骤：

15 1、样品准备：提前将假病毒从-80℃转至 4℃冰箱或者冰上融化，使用前用含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释病毒至 $1 - 2 \times 10^4$ TCID₅₀/mL(如侵染的 ACE2 过表达细胞株非我公司购买，则最佳 TCID₅₀ 需要自行摸索)。

2、取新的 96 孔细胞培养板进行样本稀释。

3、在 96 孔细胞培养板第 2 列加入 135 μL 待测样本。

20 4、第 3 - 10 列分别加入 90 μl 的无血清 DMEM，然后用排枪从第 2 列取 45 μl 稀释液加入到第 3 列进行倍比稀释，直到稀释到第 9 列，最后一列多余的 45 μL 的液体弃去。再向每孔加入 90 μl 稀释后的假病毒溶液。病毒对照组(VC)加入 90 μL 假病毒，细胞对照组(CC)只加入 180 μL 含血清 DMEM 培养基，将 96 孔细胞培养板置于 37℃培养箱孵育 1 h。

25 5、将 96 孔细胞培养板中的样本-假病毒混合液以及两组对照一分为三转至 96 孔白板中，50 μL/well(3 个重复)。

6、立即将 50 μl 密度为 0.4×10^6 cells/ml(数量为 2×10^4 cells/well)的 293-ACE2 细胞铺入 96 孔白板中(不需要更换培养基)，置于 37℃培养箱中孵育。

7、孵育 20 - 24 h 后，向每孔中加入 25 μL，37℃预热的含有 10% FBS 的 DMEM 培养基。

30 8、继续培养至 48 h 后，取出 96 孔白板，平衡至室温，每孔加入 125 μl 室温平衡后的 Bio-Lite 报告基因检测试剂，震板 2 min，室温静置 5 min 后用酶标仪检测化学发光值(RLU)。

9、数据处理：将抗体浓度的 log 值以及对应的 RLU 带入到 graph pad 软件中，计算并且比较 IC50 值。

实验结果如表 5 和图 3~图 8 所示：本发明所述的中和抗体对新冠病毒均具有一定的中和能力。但是各个抗体对新冠病毒的中和能力强弱不一。病毒中和实验中的 IC50 值越低越好，说明只需要很少的抗体就能中和病毒。已经报道的新冠病毒的中和抗体在病毒中和实验中的 IC50 值多位于 0.5 μ g/mL 到 0.0012 μ g/mL。而本发明所述的新冠病毒中和抗体中，有的抗体如 HD5K VH/B5K VL 和 HC5K VH/D4K VL 在病毒中和实验中的 IC50 达到了 0.00033 μ g/mL 和 0.00084 μ g/mL，比大多数新冠病毒中和抗体对病毒的中和能力都要更强。

表 5 中和抗体病毒中和能力

抗体	病毒中和实验IC ₅₀ (μ g/mL)
HC5K VH/B5K VL	0.1273
HD5K VH/D4K VL	0.1996
HF4L VH/A5K VL	0.6049
HF4L VH/B5K VL	0.6077
HD5K VH/B5K VL	0.00033
HC5K VH/D4K VL	0.00084
HF4L VH/D5K VL	0.0046
HC5K VH/D5K VL	0.0066
HD5K VH/A5K VL	0.0017

以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例，本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换，如对抗体可变区重链或轻链序列进行 3%以内的碱基替换，或对抗体可变区重链或轻链序列所表达的抗体部分的氨基酸序列进行 3%以内的氨基酸替换，均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

权 利 要 求 书

1、一种抗严重急性呼吸系统综合征 II 型冠状病毒 SARS-COV-2 的中和抗体，其特征在于，包括：轻链可变区 DNA 序列，以及重链可变区 DNA 序列；

所述轻链可变区 DNA 序列的核苷酸序列为 SEQ ID NO.1-5 中的一种或多种组合；

5 所述重链可变区 DNA 序列的核苷酸序列为 SEQ ID NO.6-8 中的一种或多种。

2、根据权利要求 1 所述的中和抗体，其特征在于，所述的中和抗体为包含恒定区和可变区的完整抗体、只包含可变区的部分抗体或只包含可变区的嵌合抗体。

3、一种编码权利要求 1 或 2 所述的中和抗体的基因。

4、一种携带权利要求 3 所述的基因的表达载体。

10 5、一种表达权利要求 1 或 2 所述的中和抗体的重组细胞。

6、权利要求 1 或 2 所述的中和抗体在制备治疗肺炎 COVID-19 的药物中的应用。

7、一种治疗肺炎 COVID-19 的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒内含有权利要求 1 或 2 所述的中和抗体。

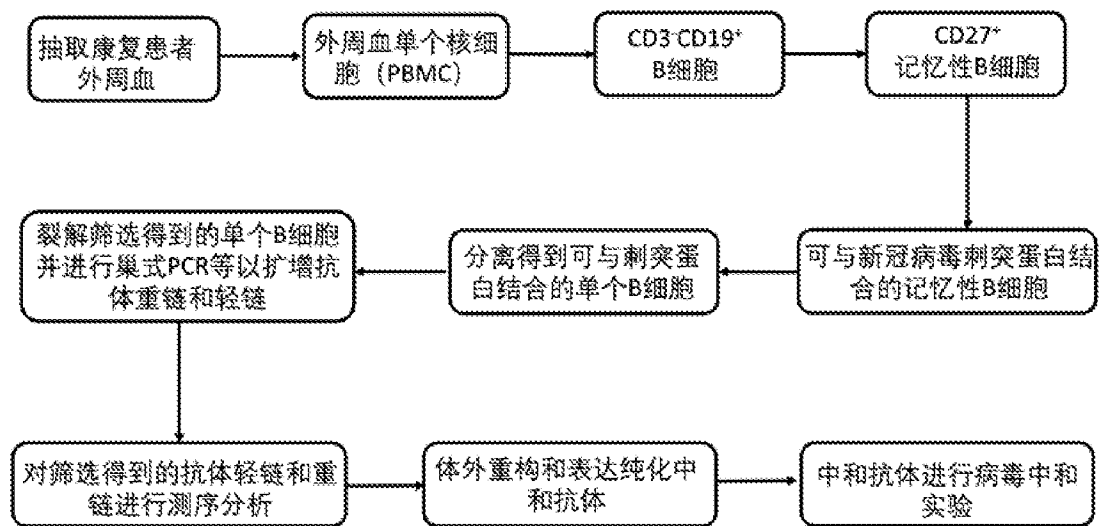
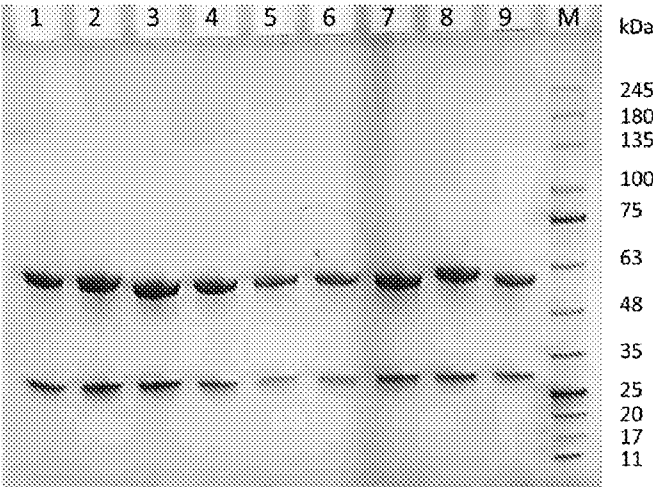


图 1

a 各个抗体的条带图



b 抗体编号对应图

Antibody	VH	VL
1	HD5K	D4K
2	HD5K	A5K
3	HD5K	B5K
4	HC5K	B5K
5	HC5K	D4K
6	HC5K	D5K
7	HF4L	B5K
8	HF4L	A5K
9	HF4L	D5K

图 2

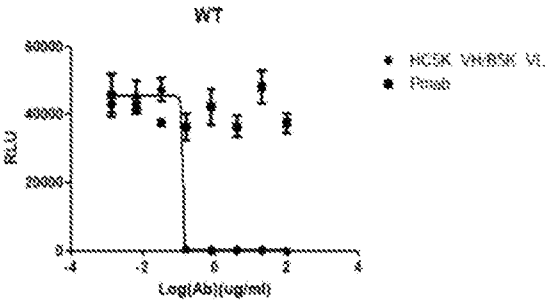


图 3

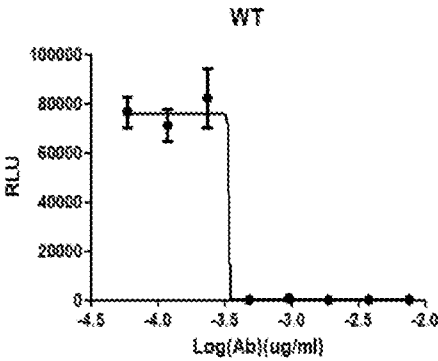


图 4

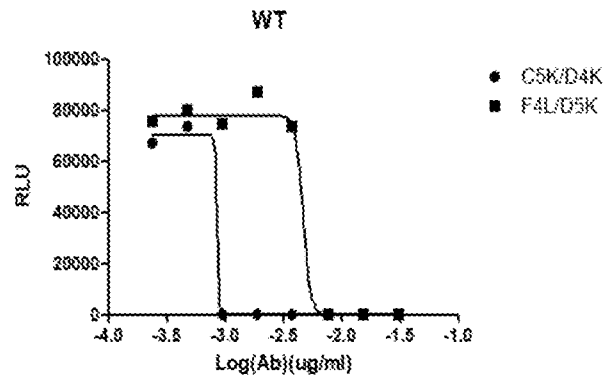


图 5

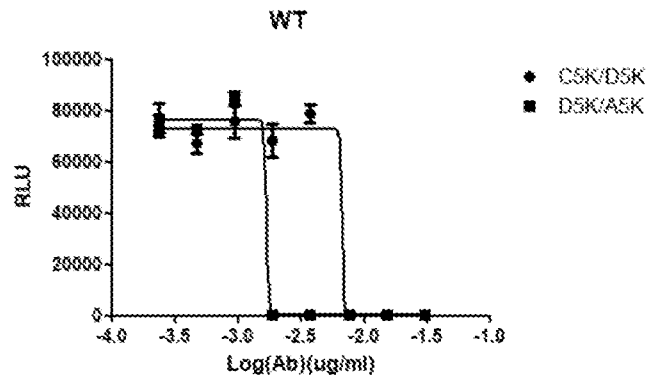


图 6

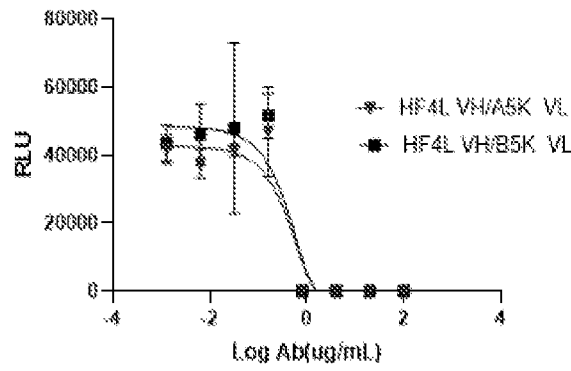


图 7

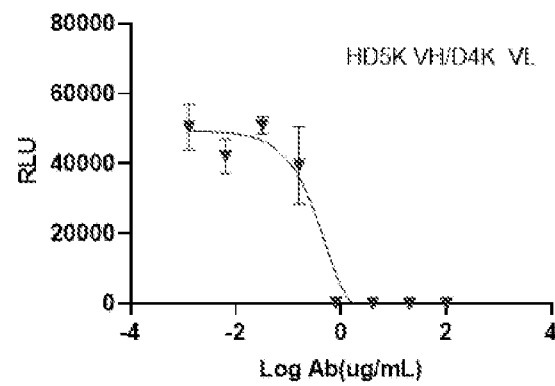


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/116808

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; A61K 39/42(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; VEN; CNTXT; WOTXT; USTXT; CNKI; 万方; NCBI; ISI WEB OF KNOWLEDGE; applicant, inventor, ANTIBODY, SARS-COV-2, COVID-19, 新型冠状病毒, 抗体, 中和, 血, 测序, neutraliz+, blood, sequencing

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112442120 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 05 March 2021 (2021-03-05) claims 1-7	1-7
X	CN 111592594 A (PEKING UNIVERSITY) 28 August 2020 (2020-08-28) claims 1-14, embodiments 1-5	1-7
X	CN 111793129 A (SHANGHAI PUBLIC HEALTH CLINICAL CENTER) 20 October 2020 (2020-10-20) claims 1-23, embodiment 1	1-7
X	CN 111978397 A (JIANGSU JITRI MEDICAL IMMUNOLOGY TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.) 24 November 2020 (2020-11-24) claims 1-10	1-7
X	CAO, Y.L. et al. "Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High- Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells" <i>CELL</i> , Vol. 182, 09 July 2020 (2020-07-09), pp. 73-84	1-7
A	US 2020362044 A1 (INCELLDX, INC.) 19 November 2020 (2020-11-19) entire document	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 2021

Date of mailing of the international search report

09 December 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/116808

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006240551 A1 (JIANG, S.B. et al.) 26 October 2006 (2006-10-26) entire document	1-7
A	CN 111366735 A (GUANGZHOU KANGRUN BIOLOGICAL TECH CO., LTD.) 03 July 2020 (2020-07-03) entire document	1-7
A	EP 3734286 A1 (EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG) 04 November 2020 (2020-11-04) entire document	1-7
A	杜剑晖 等 (DU, Jianhui et al.). "新型冠状病毒中和抗体的研发策略及研究进展 (Development Strategies and Research Progress of SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody)" <i>中国生物制品学杂志 (Chinese Journal of Biologicals)</i> , Vol. 33, No. 9, 30 September 2020 (2020-09-30), pp. 1070-1075	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/116808

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/116808

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112442120	A	05 March 2021	None			
CN	111592594	A	28 August 2020	None			
CN	111793129	A	20 October 2020	None			
CN	111978397	A	24 November 2020	None			
US	2020362044	A1	19 November 2020	US	2021171646	A1	10 June 2021
				US	2021032355	A1	04 February 2021
US	2006240551	A1	26 October 2006	US	7629443	B2	08 December 2009
CN	111366735	A	03 July 2020	None			
EP	3734286	A1	04 November 2020	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/116808

A. 主题的分类 C07K 16/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; A61K 39/42(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS;VEN;CNTXT;WOTXT;USTXT;CNKI;万方;NCBI;ISI WEB OF KNOWLEDGE;申请人, 发明人, ANTIBODY, SARS-COV-2, COVID-19, 新型冠状病毒, 抗体, 中和, 血, 测序, neutraliz+, blood, sequencing		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 112442120 A (苏州大学) 2021年3月5日 (2021 - 03 - 05) 权利要求1-7	1-7
X	CN 111592594 A (北京大学) 2020年8月28日 (2020 - 08 - 28) 权利要求1-14, 实施例1-5	1-7
X	CN 111793129 A (上海市公共卫生临床中心) 2020年10月20日 (2020 - 10 - 20) 权利要求1-23, 实施例1	1-7
X	CN 111978397 A (江苏集萃医学免疫技术研究所有限公司) 2020年11月24日 (2020 - 11 - 24) 权利要求1-10	1-7
X	CAO, Y.L. 等. "Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells" CELL, 第182卷, 2020年7月9日 (2020 - 07 - 09), 第73-84页	1-7
A	US 2020362044 A1 (INCELLDX, INC.) 2020年11月19日 (2020 - 11 - 19) 全文	1-7
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年11月23日		国际检索报告邮寄日期 2021年12月9日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 张丽颖 电话号码 86-(10)-53961978

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2006240551 A1 (JIANG, S.B. 等) 2006年10月26日 (2006 - 10 - 26) 全文	1-7
A	CN 111366735 A (广州市康润生物科技有限公司) 2020年7月3日 (2020 - 07 - 03) 全文	1-7
A	EP 3734286 A1 (EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG) 2020年11月4日 (2020 - 11 - 04) 全文	1-7
A	杜剑晖等. “新型冠状病毒中和抗体的研发策略及研究进展” 中国生物制品学杂志, 第33卷, 第9期, 2020年9月30日 (2020 - 09 - 30), 第1070-1075页	1-7

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/116808

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	112442120	A	2021年3月5日	无	
CN	111592594	A	2020年8月28日	无	
CN	111793129	A	2020年10月20日	无	
CN	111978397	A	2020年11月24日	无	
US	2020362044	A1	2020年11月19日	US 2021171646 A1	2021年6月10日
				US 2021032355 A1	2021年2月4日
US	2006240551	A1	2006年10月26日	US 7629443 B2	2009年12月8日
CN	111366735	A	2020年7月3日	无	
EP	3734286	A1	2020年11月4日	无	