



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I789711 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 11 日

(21) 申請案號：110106206

(22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 02 月 23 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

(30) 優先權：2020/02/24 中國大陸 2020101142838

2020/03/02 中國大陸 2020101374869

2021/01/13 中國大陸 2021100445414

(71) 申請人：中國科學院微生物研究所 (中國大陸) INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES (CN)

中國大陸

(72) 發明人：嚴景華 YAN, JINGHUA (CN) ; 史瑞 SHI, RUI (CN) ; 王奇慧 WANG, QIHUI (CN) ; 高福 GAO, FU (CN) ; 馬素芳 MA, SUFANG (CN)

(74) 代理人：葉璟宗 ; 卓俊傑

(56) 參考文獻：

EP 2193802A2

期刊 Letko M. and Munster V., "Functional assessment of cell entry and receptor usage for lineage B  $\beta$ -coronaviruses, including 2019-nCoV", bioRxiv, Preprint 2020.01.22, preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.915660>

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：10 共 74 頁

(54) 名稱

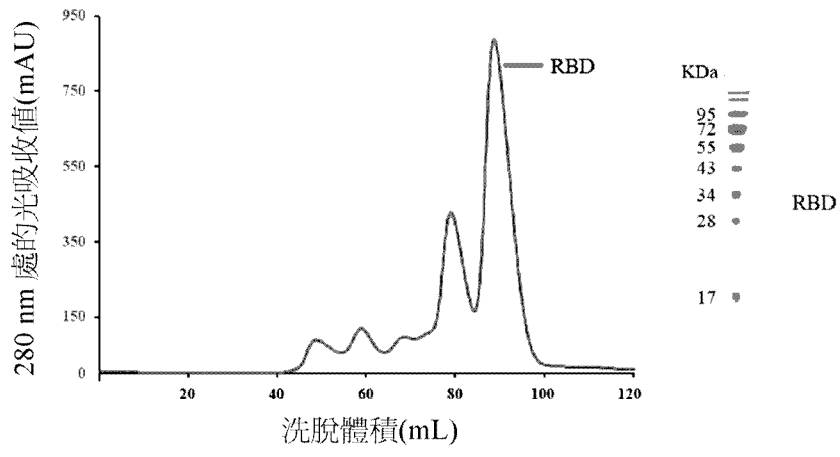
新型冠狀病毒的人源單克隆抗體及其應用

(57) 摘要

本發明是關於一種新型冠狀病毒的人源單克隆抗體及其應用。該抗體能夠特異性結合 2019-nCoV 的受體結合結構域 (RBD)，阻斷 2019-nCoV 的 RBD 與 ACE2 結合，抑制 2019-nCoV 的感染。

The invention relates to human monoclonal antibodies of a novel coronavirus and uses thereof. The antibodies can specifically bind to the receptor binding domain (RBD) of 2019-nCoV, block the binding of RBD of 2019-nCoV to ACE2, and inhibit 2019-nCoV infection.

指定代表圖：



【圖 1】



I789711

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 新型冠狀病毒的人源單克隆抗體及其應用

【英文發明名稱】 HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES OF

NOVEL CORONAVIRUS AND USES THEREOF

【中文】 本發明是關於一種新型冠狀病毒的人源單克隆抗體及其應用。該抗體能夠特異性結合 2019-nCoV 的受體結合結構域 (RBD)，阻斷 2019-nCoV 的 RBD 與 ACE2 結合，抑制 2019-nCoV 的感染。

【英文】 The invention relates to human monoclonal antibodies of a novel coronavirus and uses thereof. The antibodies can specifically bind to the receptor binding domain (RBD) of 2019-nCoV, block the binding of RBD of 2019-nCoV to ACE2, and inhibit 2019-nCoV infection.

【指定代表圖】 圖 1。

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 新型冠狀病毒的人源單克隆抗體及其應用

【英文發明名稱】 HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES OF  
NOVEL CORONAVIRUS AND USES THEREOF

### 【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種醫藥技術領域，且特別是有關於一種高中和活性的新型冠狀病毒(2019-nCoV, 又稱為 SARS-CoV-2)的人源單克隆抗體及其應用。

### 【先前技術】

【0002】 截至 2020 年 10 月 22 日，新型冠狀病毒 2019-nCoV 導致的疾病 (COVID-19) 的全球確診病例已超 4000 萬例，死亡病例累計已超 110 萬例，對公眾的生命和健康造成重大威脅。

【0003】 然而，目前對於該病毒還沒有特效藥物。

【0004】 治療性抗體藥物不但在腫瘤和自身免疫疾病方面佔有重要地位，在傳染性疾病的治療中也同樣有效。目前已經上市的治療和預防病毒感染的藥物有預防小兒呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染的帕利珠單抗 (Synagis)，治療 HIV 感染的艾巴厘珠單抗 (Trogarzo)，以及用於狂犬病毒暴露後預防的 Rabishield。同時還有針對眾多病毒的單克隆抗體處於臨床研究的不同階段 (<https://clinicaltrials.gov/>)。

【0005】 2019-nCoV 屬於冠狀病毒。同屬冠狀病毒的重症急性呼吸綜合征冠狀病毒（SARS-CoV）以及中東呼吸綜合征冠狀病毒（MERS-CoV）也曾在分別在 2002-2003 年和 2012 年引發疫情。據世界衛生組織（WHO）統計 SARS-CoV 共引發 8000 人感染，794 人死亡（<https://www.who.int/>）。自 2012 年至今，MERS-CoV 感染病毒病例在持續增加，截至 2019 年底，全球確診 2499 例感染病例，861 例死亡病例。2020 年 1 月 12 日，世界衛生組織正式將該新型冠狀病毒命名為“2019 新型冠狀病毒（2019-nCoV）”，其後在 2020 年 2 月 11-12 日國際病毒分類委員會（International Committee on Taxonomy of Viruses，ICTV）宣佈，新型冠狀病毒（2019-nCoV）的正式分類名為嚴重急性呼吸綜合征冠狀病毒 2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2），世界衛生組織（WHO）同日在日內瓦舉辦全球研究和創新論壇上宣佈，由這一病毒導致的疾病的正式名稱為“COVID-19”。

【0006】 病毒要感染細胞，首先需要透過囊膜蛋白結合宿主的受體。抗體，尤其是中和活性抗體，透過結合到囊膜蛋白上，阻斷病毒與細胞受體的結合，從而阻斷病毒感染。同時，抗體結合到囊膜蛋白上，從而對游離的病毒或是被感染的細胞進行標記，透過抗體的 Fc 區募集巨噬細胞或是補體等免疫細胞和免疫分子，從而清除游離的病毒以及被感染的細胞。因此，靶向受體結合區（receptor binding domain，RBD）的抗體，不但具有中和病毒感染的活性，還可以透過 Fc 區發揮作用，促進病毒以及被感染細胞的清除。

【0007】 基於對其它冠狀病毒，尤其是 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的研究，與受體結合的重要囊膜蛋白是刺突蛋白（S）。S 可進一步分為 S1 和 S2 兩部分。S2 的作用是介導膜融合。S1 的 N 端（NTD）和 C 端（CTD）都可能是 RBD。透過對 2019-nCoV 的研究，團隊發現 CTD 是此冠狀病毒的 RBD，結合受體 ACE2。因此靶向 RBD 的抗體，並且是阻斷 S 與 ACE2 結合的抗體，可能成為抑制病毒感染中和抗體。本發明的目的是針對 2019-nCoV，鑒定特異的具有保護效果的人源中和抗體。

#### 【發明內容】

【0008】 為了獲得具有保護效果的人源中和抗體，本發明首先以昆蟲細胞表達的 2019-nCoV RBD 作為抗原，透過流式分選，從 2019-nCoV 感染後痊癒出院人員的外周血單核細胞（PBMCs）中篩選到可以特異結合 2019-nCoV RBD 蛋白的記憶 B 細胞，然後對篩選的單一 B 細胞進行 RT-PCR，獲得抗體的可變區序列與片段，並進一步與恒定區連接至表達載體中。經哺乳動物細胞表達、純化後，進行一系列的功能檢測，包括與 2019-nCoV RBD 蛋白的結合能力，阻斷 2019-nCoV RBD 與 ACE2 結合的阻斷效果，抑制 2019-nCoV 感染的中和效果等，獲得了中和 2019-nCoV 感染的人源單克隆抗體，分別命名為 CB6 和 GH12。

【0009】 具體地，本發明透過以下方面實現。

【0010】 （I）

【0011】 在一個方面，本發明提供了特異性結合 2019-nCoV 受體結合結構域 (RBD) 的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和/或輕鏈可變區，

【0012】 所述重鏈可變區包含：

【0013】 (I) 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；或與 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示胺基酸序列分別具有 1、2 或 3 個胺基酸差異的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；或

【0014】 (II) 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；或與 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示胺基酸序列分別具有 1、2 或 3 個胺基酸差異的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

【0015】 所述輕鏈可變區包含：

【0016】 (I) 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或與 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示胺基酸序列分別具有 1、2 或 3 個胺基酸差異的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

【0017】 (II) 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或與 SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30 所示胺基酸序列分別具有 1、2 或 3 個胺基酸差異的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【0018】 在一些實施方式中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合

片段，其中，所述抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和/或輕鏈可變區，

【0019】 所述重鏈可變區包含：

【0020】 (I) 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；或

【0021】 (II) 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

【0022】 所述輕鏈可變區包含：

【0023】 (I) 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

【0024】 (II) 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【0025】 在一些實施方式中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其中，所述抗體或其抗原結合片段包含：

【0026】 (I) 重鏈可變區，其具有胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和輕鏈可變區，其包含胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

【0027】 (II) 重鏈可變區，其具有胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和輕鏈可變區，其包含胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 28、

SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【0028】 在一些實施方式中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區：

【0029】 (I)所述重鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 7 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 7 所示的胺基酸序列具有至少 95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；和所述輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 8 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 8 所示的胺基酸序列具有至少 95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；或

【0030】 (II)所述重鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 31 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 31 所示的胺基酸序列具有至少 95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；和所述輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 32 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 32 所示的胺基酸序列具有至少 95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的胺基酸序列。

【0031】 在一些實施方式中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其包含：

【0032】 (I)胺基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的重鏈可變區和胺基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的輕鏈可變區；

【0033】 (II)胺基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重鏈可變區和胺基酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示的輕鏈可變區。

【0034】 在一些實施方式中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合

片段，其中所述抗體包含重鏈和輕鏈：

**【0035】** (I)所述重鏈包含如 SEQ ID NO: 22 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 22 所示的胺基酸序列具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；和所述輕鏈包含如 SEQ ID NO: 23 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 23 所示的胺基酸序列具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；或

**【0036】** (II)所述重鏈包含如 SEQ ID NO: 33 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 33 所示的胺基酸序列具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；和所述輕鏈包含如 SEQ ID NO: 34 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 34 所示的胺基酸序列具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的胺基酸序列。

**【0037】** 在一些實施方式中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體包含：

**【0038】** (I)胺基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示的重鏈，和胺基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的輕鏈；或

**【0039】** (II)胺基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重鏈，和胺基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示的輕鏈。

**【0040】** 在一些實施方式中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其中所述抗原結合片段選自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')<sub>2</sub>、雙抗體。

【0041】 在一些實施方式中，本發明提供了多肽，其含有選自 SEQ ID NO: 7、8、22 或 23 所示的胺基酸序列。

【0042】 在一些實施方式中，本發明提供了多肽，其含有選自 SEQ ID NO: 31、32、33 或 34 所示的胺基酸序列。

【0043】 在一些實施方式中，本發明提供了多肽，其含有選自 SEQ ID NO: 31、32、33 或 34 所示的序列，其中所述多肽是特異性結合 2019-nCoV RBD 的人源單克隆抗體一部分，並且

【0044】 當所述多肽含有 SEQ ID NO: 31 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 32 所示的多肽；

【0045】 當所述多肽含有 SEQ ID NO: 32 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 31 所示的多肽；

【0046】 當所述多肽含有 SEQ ID NO: 33 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 34 所示的多肽；或

【0047】 當所述多肽含有 SEQ ID NO: 34 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 33 所示的多肽。

【0048】 在又一個方面，本發明提供了多核苷酸，其編碼請求項本文所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段或本文所述的多肽。

【0049】 在又一個方面，本發明提供了表達載體，其包含本文所述的多核苷酸，優選地，所述載體為真核表達載體。

【0050】 在又一個方面，本發明提供了宿主細胞，其包含本文所述的多核苷酸或表達載體，優選地，所述宿主細胞是真核細胞，更優選哺乳動物細胞。

**【0051】** 在又一個方面，本發明提供了一種製備本文所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段或所述多肽的方法，所述方法包括在適合於所述抗體或其抗原結合片段表達的條件下在本文所述的宿主細胞中表達所述抗體或其抗原結合片段或所述多肽，並從所述宿主細胞回收所表達的抗體或其抗原結合片段。

**【0052】** 在又一個方面，本發明提供了藥物組合物，其含有本文所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段、或所述的多肽、所述多核苷酸、所述表達載體和/或所述宿主細胞，以及藥用載體。

**【0053】** 在又一個方面，本發明提供了如本文所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段、所述多肽或所述藥物組合物在製備治療和/或預防 2019-nCoV 感染的藥物中的用途。

**【0054】** 在又一個方面，本發明提供了一種治療和/或預防 2019-nCoV 感染的方法，其包括向有需要的受試者施用本文所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段、所述多肽、所述多核苷酸、所述表達載體、所述宿主細胞和/或所述藥物組合物。

**【0055】** 在又一個方面，本發明提供了一種試劑盒，其包括本文所述的抗體或其抗原結合片段、所述多肽、所述多核苷酸、所述表達載體、所述宿主細胞和/或所述藥物組合物。

**【0056】** 在一些實施方式中，本發明提供了所述的試劑盒在製備診斷 2019-nCoV 感染的藥物中的用途。

**【0057】** 在又一個方面，本發明提供了一種使用本文所述的抗體或其抗原結合片段或所述多肽檢測 2019-nCoV 在樣品中的存在的

方法。

【0058】 (II)

【0059】 在一個方面，本發明提供人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其特異性結合 2019-nCoV RBD，

【0060】 其 VH 鏈的互補決定區的 CDR 具有選自下組的胺基酸序列：

【0061】 如 SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1，

【0062】 如 SEQ ID NO: 2 所示的 CDR2，和

【0063】 如 SEQ ID NO: 3 所示的 CDR3；

【0064】 其 VL 鏈的互補決定區的 CDR 具有選自下組的胺基酸序列：

【0065】 如 SEQ ID NO: 4 所示的 CDR1，

【0066】 如 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR2，和

【0067】 如 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3。

【0068】 在一個方面，本發明提供人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其特異性結合 2019-nCoV RBD，

【0069】 其 VH 鏈的互補決定區的 CDR 具有選自下組的胺基酸序列：

【0070】 如 SEQ ID NO: 25 所示的 CDR1，

【0071】 如 SEQ ID NO: 26 所示的 CDR2，和

【0072】 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR3；

【0073】 其 VL 鏈的互補決定區的 CDR 具有選自下組的胺基酸序

列：

【0074】 如 SEQ ID NO: 28 所示的 CDR1，

【0075】 如 SEQ ID NO: 29 所示的 CDR2，和

【0076】 如 SEQ ID NO: 30 所示的 CDR3。

【0077】 在一個實施方案中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合片段含有：

【0078】 如 SEQ ID NO: 7 所示的重鏈可變區，和

【0079】 如 SEQ ID NO: 8 所示的輕鏈可變區。

【0080】 在一個實施方案中，所述人源單克隆抗體或其抗原結合片段含有：

【0081】 如 SEQ ID NO: 31 所示的重鏈可變區，和

【0082】 如 SEQ ID NO: 32 所示的輕鏈可變區。

【0083】 在一個實施方案中，人源單克隆抗體或其抗原結合片段含有：

【0084】 如 SEQ ID NO: 22 所示的重鏈，和

【0085】 如 SEQ ID NO: 23 所示的輕鏈。

【0086】 在一個實施方案中，人源單克隆抗體或其抗原結合片段含有：

【0087】 如 SEQ ID NO: 33 所示的重鏈，和

【0088】 如 SEQ ID NO: 34 所示的輕鏈。

【0089】 在一個實施方案中，其中所述抗原結合片段選自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')<sub>2</sub>、雙抗體。

【0090】 在另一個方面，本發明提供一種多肽，其含有選自 SEQ ID NO: 7、8、22 或 23 所示的序列。

【0091】 在另一個方面，本發明提供一種多肽，其含有選自 SEQ ID NO: 31、32、33 或 34 所示的序列，其中所述多肽是特異性結合 COVID-19 RBD 的人源單克隆抗體一部分，並且

【0092】 當所述多肽含有 SEQ ID NO: 31 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 32 所示的多肽；

【0093】 當所述多肽含有 SEQ ID NO: 32 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 31 所示的多肽；

【0094】 當所述多肽含有 SEQ ID NO: 33 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 34 所示的多肽；或

【0095】 當所述多肽含有 SEQ ID NO: 34 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 33 所示的多肽。

【0096】 在另一個方面，本發明提供一種多核苷酸，其編碼前述任一項人源單克隆抗體或其抗原結合片段或前述任一項多肽。

【0097】 在另一個方面，本發明提供一種表達載體，其包含上述多核苷酸。

【0098】 在另一個方面，本發明提供一種宿主細胞，其包含上述表達載體。

【0099】 在另一個方面，本發明提供一種藥物組合物，其含有前述任一項人源單克隆抗體或其抗原結合片段和藥用載體。

【0100】 在另一個方面，本發明提供上述任一項人源單克隆抗體

或其抗原結合片段在製備治療 2019-nCoV 感染的藥物中的用途。

【0101】 本文揭露的人源單克隆抗體或其抗原結合片段還特異性結合冠狀病毒如 SARS-CoV RBD 或 MERS-CoV RBD。

【0102】 本說明書中提及的所有文獻均透過引用以其整體併入本文。

【0103】 定義

【0104】 除非另有說明，本發明的實施將採用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學和免疫學的常規技術，這些都在本領域的技術範圍內。

【0105】 為了可以更容易地理解本發明，某些科技術語具體定義如下。除非本文其它部分另有明確定義，否則本文所用的科技術語都具有所屬技術領域中具有通常知識者通常理解的含義。關於本領域的定義及術語，專業人員具體可參考 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel)。胺基酸殘基的縮寫是本領域中所用的指代 20 個常用 L-胺基酸之一的標準 3 字母和/或 1 字母代碼。本文(包括發明申請專利範圍)所用單數形式包括其相應的複數形式，除非文中另有明確規定。

【0106】 術語“約”在與數位數值聯合使用時意為涵蓋具有比指定數位數值小 5%的下限和比指定數字數值大 5%的上限的範圍內的數位數值，包括但不限於 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$ ，因為這些變化適於進行所揭露的方法。

【0107】 術語“和/或”應理解為意指可選項中的任一項或可選項中

的任意兩項或更多項的組合。

**【0108】** 如本文所用，術語“或”應被理解為與如上定義的“和／或”具有相同的含義。例如，當分離列表中的項目時，“或”或“和／或”應被解釋為包容性的，即，包括數量或元素清單中的至少一個，但也包括多於一個，以及任選地，額外的未列出的項目。只有明確指出相反的術語下，例如“只有一個”或“的確一個”或者在請求項中使用“由．．．組成”時，將指的是僅列出的一個數位或清單的一個元素。

**【0109】** 術語“百分比(%)胺基酸序列同一性”或簡稱“同一性”定義為在將胺基酸序列進行比對(並在必要時導入空位)以獲取最大百分比序列同一性，且不將任何保守取代視為序列同一性的部分之後，候選胺基酸序列中的胺基酸殘基與參比胺基酸序列中的相同胺基酸殘基的百分比。可使用本領域各種方法進行序列比對以便測定百分比胺基酸序列同一性，例如，使用公眾可得到的電腦軟體如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN(DNASTAR)軟體。所屬技術領域中具有通常知識者可以決定測量比對的適宜參數，包括對所比較的序列全長獲得最大比對所需的任何演算法。

**【0110】** 術語“抗體”是指具有所需生物活性的任何形式的抗體。因此，其以最廣義使用，具體包括但不限於單克隆抗體(包括全長單克隆抗體)、多克隆抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人源化抗體、全人抗體、嵌合抗體和駱駝源化單結構域抗體。

**【0111】** 術語“單克隆抗體”是指獲自基本均質抗體群的抗體，即

組成該群的各個抗體除可少量存在的可能天然存在的突變之外是相同的。單克隆抗體是高度特異性的，針對單一抗原表位。相比之下，常規（多克隆）抗體製備物通常包括大量針對不同表位（或對不同表位有特異性）的抗體。修飾語“單克隆”表明獲自基本均質抗體群的抗體的特徵，且不得解釋為需要透過任何特定方法產生抗體。

**【0112】** “抗原結合片段”是指抗體的抗原結合片段及抗體類似物，其通常包括至少部分母體抗體的抗原結合區或可變區，例如一個或多個 CDR。抗體的片段保留母體抗體的至少某些結合特異性。抗原結合片段包括選自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')<sub>2</sub>、雙抗體、包含 CDR 的肽等。

**【0113】** “Fab 片段”由一條輕鏈和一條重鏈的 CH1 及可變區組成。

**【0114】** “Fc”區含有包含抗體的 CH2 和 CH3 結構域的兩個重鏈片段。兩個重鏈片段由兩個或多個二硫鍵並透過 CH3 結構域的疏水作用保持在一起。

**【0115】** “Fab'片段”含有一條輕鏈和一條包含 VH 結構域、CH1 結構域以及 CH1 和 CH2 結構域之間的恒定區的部分的重鏈的部分，兩個 Fab'片段的兩條重鏈之間形成鏈間二硫鍵以形成 F(ab')<sub>2</sub> 分子。

**【0116】** “F(ab')<sub>2</sub> 片段”含有兩條輕鏈和兩條包含 VH 結構域、CH1 結構域以及 CH1 和 CH2 結構域之間的恒定區的部分的重鏈的部分，由此在兩條重鏈間形成鏈間二硫鍵。因此，F(ab')<sub>2</sub> 片段由透過兩條重鏈間的二硫鍵保持在一起的兩個 Fab'片段組成。

【0117】“Fv 區”包含來自重鏈和輕鏈二者的可變區，但缺少恒定區。

【0118】“單鏈 Fv 抗體(scFv 抗體)”是指包含抗體的 VH 和 VL 結構域的抗原結合片段，這些結構域包含於單個多肽鏈中。一般而言，scFv 多肽在 VH 和 VL 結構域之間包含多肽接頭，該接頭使得 scFv 能形成用於抗原結合的所需結構。

【0119】“雙抗體”為具有兩個抗原結合位點的小抗原結合片段。所述片段包含在相同的多肽鏈中與輕鏈可變結構域(VL)連接的重鏈可變結構域(VH)(VH-VL 或 VL-VH)。透過使用短至不能在同一鏈的兩個結構域之間配對的接頭，使得所述結構域和另一條鏈的互補結構域配對並形成兩個抗原結合位點。

【0120】當提及配體/受體、抗體/抗原或其它結合對時，“特異性”結合是指在蛋白和/或其它生物試劑的異質群體中確定是否存在所述蛋白例如本發明的單克隆抗體與 2019-nCoV RBD 蛋白的結合反應。因此，在所指定的條件下，特定的配體/抗原與特定的受體/抗體結合，並且並不以顯著量與樣品中存在的其它蛋白結合。

【0121】“親和力”或“結合親和力”指反應結合對子的成員之間相互作用的固有結合親和力。分子 X 對其配偶物 Y 的親和力可以通常由平衡解離常數(KD)代表，平衡解離常數是解離速率常數和結合速率常數(分別是  $k_{dis}$  和  $k_{on}$ )的比值。親和力可以由本領域已知的常見方法測量。用於測量親和力的一個具體方法是本文中的 ForteBio 動力學結合測定法。術語“不結合”蛋白或細胞是指，不與

蛋白或細胞結合，或者不以高親和力與其結合，即結合蛋白或細胞的 KD 為  $1.0 \times 10^{-6}$  M 或更高，更優選  $1.0 \times 10^{-5}$  M 或更高，更優選  $1.0 \times 10^{-4}$  M 或更高、 $1.0 \times 10^{-3}$  M 或更高，更優選  $1.0 \times 10^{-2}$  M 或更高。

【0122】術語“高親和性”對於 IgG 抗體而言，是指對於抗原的 KD 為  $1.0 \times 10^{-6}$  M 或更低，優選  $5.0 \times 10^{-8}$  M 或更低，更優選  $1.0 \times 10^{-8}$  M 或更低、 $5.0 \times 10^{-9}$  M 或更低，更優選  $1.0 \times 10^{-9}$  M 或更低。對於其他抗體亞型，“高親和性”結合可能會變化。例如，IgM 亞型的“高親和性”結合是指 KD 為  $10^{-6}$  M 或更低，優選  $10^{-7}$  M 或更低，更優選  $10^{-8}$  M 或更低。

【0123】術語“核酸”或“多核苷酸”是指去氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA) 及其呈單鏈或雙鏈形式的聚合物。除非明確地限制，否則術語包括具有與參照核酸相似的結合性質並且以與天然存在的核苷酸相似的方式被代謝的含有已知的天然核苷酸的類似物的核酸(參見，屬於 Kariko 等人的美國專利 No. 8278036，其揭露了尿苷被假尿苷替代的 mRNA 分子，合成所述 mRNA 分子的方法以及用於在體內遞送治療性蛋白的方法)。除非另有所指，否則特定核酸序列還隱含地包括其保守修飾的變體 (例如，簡並密碼子取代)、等位元基因、直系同源物、SNP 和互補序列以及明確指出的序列。具體地，簡並密碼子取代可透過生成其中一個或多個選擇的 (或全部) 密碼子的第三位元被混合鹼基和/或去氧肌苷殘基取代的序列來實現 (Batzer 等人，Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991)；

Ohtsuka 等人，J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)；和 Rossolini 等人，Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994)。

**【0124】** “構建體”是指任何重組多核苷酸分子(諸如質粒、粘粒、病毒、自主複製多核苷酸分子、噬菌體或線性或環狀單鏈或雙鏈 DNA 或 RNA 多核苷酸分子)，衍生自任何來源，能夠與基因組整合或自主複製，構成如下多核苷酸分子，其中已經以功能操作的方式連接(即，可操作地連接)一或多個多核苷酸分子。重組構建體通常會包含可操作地連接至轉錄起始調節序列的本發明的多核苷酸，這些序列會導引多核苷酸在宿主細胞中的轉錄。可使用異源及非異源(即，內源)啟動子兩者導引本發明的核酸的表達。

**【0125】** “載體”是指任何重組多核苷酸構建體，該構建體可用於轉化的目的(即將異源 DNA 引入到宿主細胞中)。一種類型的載體為“質粒”，是指環狀雙鏈 DNA 環，可將額外 DNA 區段連接至該環中。另一類型的載體為病毒載體，其中可將額外 DNA 區段連接至病毒基因組中。某些載體能夠在被引入到的宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌複製起點的細菌載體及游離型哺乳動物載體)。在引入到宿主細胞中後，其他載體(例如，非游離型哺乳動物載體)整合至宿主細胞的基因組中，且因此與宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠導引被操作性連接的基因的表達。本文將此類載體稱為“表達載體”。

**【0126】** 本文所用術語“表達載體”是指能夠在轉化、轉染或轉導至宿主細胞中時複製及表達目的基因的核酸分子。表達載體包含

一或多個表型選擇標記及複製起點，以確保維護載體及以在需要的情況下於宿主內提供擴增。

**【0127】** 本發明還提供含有本發明特異性結合 2019-nCoV RBD 的人源高中和活性的單克隆抗體或其抗原結合片段的藥物組合物。為了製備藥物組合物，可以透過使抗體或其抗原結合片段與藥用載體或賦形劑混合，製備成各種所需的劑型。作為本發明的醫藥組合物的劑型的種類，例如可以列舉作為口服劑的片劑、粉末劑、丸劑、散劑、顆粒劑、細粒劑、軟/硬膠囊劑、薄膜包衣劑、小丸劑、舌下片、膏劑等，作為非口服劑，可以列舉注射劑、栓劑、經皮劑、軟膏劑、硬膏劑、外用液劑等，所屬技術領域中具有通常知識者能夠根據給藥途徑和給藥物件等選擇適當的劑型。

**【0128】** 本發明的藥物組合物的有效成分的給藥量，根據給藥物件、物件臟器、症狀、給藥方法等不同而存在差異，可以考慮劑型的種類、給藥方法、患者的年齡和體重、患者的症狀等，根據醫生的判斷來確定。

**【0129】** 本發明的有益效果：

**【0130】** 本發明獲得了人源高中和活性的抗體：CB6 和 GH12。上述抗體是具有中和 2019-nCoV 感染的人源抗體。CB6 抗體與 2019-nCoV 的結合常數為  $8.15E-10$  M，GH12 抗體與 2019-nCoV RBD 的親和力為  $5.87E-09$  M。人源高中和活性的抗體 CB6 和 GH12 均能有效阻斷 2019-nCoV RBD 與 hACE2 結合，抑制 2019-nCoV 假病毒感染的中和活性好。本發明的 CB6 和 GH12 有著臨床治療和預

防 2019-nCoV 感染的應用價值。

**【圖式簡單說明】**

**【0131】**

圖 1：2019-nCoV RBD 凝膠過濾層析和 SDS-PAGE 鑒定。

圖 2：2a：CB6 抗體的分子篩層析和 SDS-PAGE 鑒定；2b GH12 抗體的分子篩層析和 SDS-PAGE 鑒定。

圖 3：3a：CB6 抗體結合 2019-nCoV RBD 的動力學曲線；3b：GH12 抗體結合 2019-nCoV RBD 的動力學曲線。

圖 4：4a：CB6 抗體阻斷 2019-nCoV RBD 與 HEK293T-hACE2 結合；4b：GH12 抗體阻斷 2019-nCoV RBD 與 HEK293T-hACE2 結合。

圖 5：5a：CB6 抗體中和 VSV-2019-nCoV 感染的效果；5b：GH12 抗體中和 VSV-2019-nCoV 感染的效果。

圖 6：CB6 抗體對 SARS-CoV-2 活病毒的中和作用。

圖 7：實驗動物的體溫體重變化：7a：實驗動物的溫度變化；7b：實驗動物的體重變化。

圖 8：實驗動物的咽拭子、鼻拭子和肛拭子病毒載量變化：8a：咽拭子病毒載量：咽拭子病毒載量反應了病毒可以在動物體內有效擴增，但是給與抗體處理以後，病毒載量大幅下降或者基本檢不出；8b：鼻拭子病毒載量：鼻拭子中的病毒載量較低，均在檢測限附近或之下；8c：肛拭子病毒載量：病毒載量較低，均在檢測限

附近或之下。

L.O.D ( 檢測限 ) : 200 拷貝/ml 。

圖 9 : 實驗動物的影像學分析 : 9a : 對照組動物影像學觀察 , ( 上 ) : C1 , ( 中 ) : C2 , ( 下 ) : C3 ; 9b : 預防組動物的影像學觀察 ( 上 ) : PA1 , ( 中 ) : PA2 , ( 下 ) : PA3 ; 9c : 治療組動物的影像學觀察 ( 上 ) : AC1 , ( 中 ) : AC2 , ( 下 ) : AC3 。

圖 10 : 實驗動物氣管、支氣管和肺部病毒載量分析 : 10a : 攻毒後第 5 天 ; 10b : 攻毒後第 6 天 ; 10c : 攻毒後第 7 天 。

L.O.D ( Limit of Detection ) : 檢測限 , 1000 拷貝/g 。

### 【實施方式】

【0132】 為使本發明的目的、技術方案和優點更加清楚明白，以下結合具體實施例，並參照圖式，對本發明作進一步的詳細說明。

【0133】 實施例 1 : 2019-nCoV RBD 的表達與純化

【0134】 在 2019-nCoV RBD 蛋白 ( 胺基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示 ) 編碼區的 3' 端連上 6 個組氨酸標籤 (hexa-His-tag) 的編碼序列及翻譯終止密碼子，透過連接 EcoRI 和 XhoI 構建入 pFastBac1 載體 (購自 Invitrogen) 中。再將連接產物轉化到 DH10Bac 感受態細胞 (購自 Tiangen) 中，進行杆狀病毒重組。提取重組的杆狀病毒，轉染至 sf9 細胞 (購自 Invitrogen) 中進行杆狀病毒的包裝，再經過病毒的擴增，加入到 Hi5 細胞 (購自 Invitrogen) 中，進行 2019-nCoV RBD 蛋白的表達。

【0135】含有目的蛋白的細胞培養液經鎳離子親和層析 (HisTrap™ HP (GE)) 和凝膠過濾層析 (Superose™ 6 Increase 10/300 GL(GE)) 純化後，可以獲得較純的目的蛋白。SDS-PAGE 鑒定大小為 30KD，結果如圖 1。

【0136】實施例 2：2019-nCoV RBD 蛋白特異性記憶 B 細胞的分離

【0137】在 2019-nCoV 感染後痊癒出院人員的知情同意下，採集 15mL 的血液，分離 PBMCs。將分離的 PBMCs 以  $10^7$ /mL 的密度與終濃度是 400nM 的 2019-nCoV RBD 蛋白冰上孵育結合半小時，然後用 PBS 洗 2 次，再與下列抗體(均購自 BD)孵育：抗人 CD3/PE-Cy5 (anti-human CD3/PE-Cy5)，抗人 CD16/PE-Cy5 (anti-human CD16/PE-Cy5)，抗人 CD235a/PE-Cy5(anti-human CD235a/PE-Cy5)，抗人 CD19/APC-Cy7 (anti-human CD19/APC-Cy7)，抗人 CD27/太平洋藍 (anti-human CD27/Pacific Blue)，抗人 CD38/APC (anti-human CD38/APC)，抗人 IgG/FITC (anti-human IgG/FITC)，以及抗 His/PE(anti-His/PE)。抗體冰上孵育半小時後，用 PBS 洗 PBMCs 2 次。

【0138】PBS 洗後的 PBMCs 經 FACS Aria III 分選，收集 PE-Cy5-APC-APC-Cy7+ Pacific Blue+ FITC+ PE+的細胞 (即 B 細胞)，直接將其收集到 96 孔板內，1 細胞/孔。

【0139】實施例 3：單一 B 細胞 PCR、序列分析及人源抗體設計

【0140】按照 Qihui Wang 等人於 2016 年 12 月在 Science

Translational Medicine，第 8 卷，第 369 期發表的 Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus 中描述的方法，將實施例 2 獲得的 B 細胞透過 Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) 逆轉錄，逆轉錄引子如表 1，55°C 反應 60 min。

【0141】 表 1.逆轉錄反應引子

引子	序列編號	5'-3'序列
IgM-RT	SED ID NO: 10	ATG GAG TCG GGA AGG AAG TC
IgD-RT	SED ID NO: 11	TCA CGG ACG TTG GGT GGT A
IgE-RT	SED ID NO: 12	TCA CGG AGG TGG CAT TGG A
IgA1-RT	SED ID NO: 13	CAG GCG ATG ACC ACG TTC C
IgA2-RT	SED ID NO: 14	CAT GCG ACG ACC ACG TTC C
IgG-RT	SED ID NO: 15	AGG TGT GCA CGC CGC TGG TC
C $\kappa$ -new RT	SED ID NO: 16	GCA GGC ACA CAA CAG AGG CA
C $\lambda$ -new-ext	SED ID NO: 17	AGG CCA CTG TCA CAG CT

【0142】 3.1 人源抗體 CB6

【0143】 將上述逆轉錄產物作為範本，用 HotStar Tap Plus 酶 (QIAGEN) 進行 PCR (PCRa)，擴增抗體可變區序列。設計相應的引子，反應條件如下：95°C，5min；95°C 30s，55°C (重鏈/ $\kappa$  鏈) 30s，72°C 90s，35 個迴圈；72°C，7min。將此產物作為範本再進行 1 輪 PCR (PCRb)，條件如下：95°C，5min；95°C 30s，58°C (重鏈) /60°C ( $\kappa$  鏈) 30s，72°C 90s，35 個迴圈；72°C，7min，得到 PCR 產物。

【0144】 用 1.2%的瓊脂糖凝膠電泳分離 PCR 產物。條帶大小在 400-500bp 的切膠回收後送測序公司測序。測序結果用 IMGT 線上

軟體進行分析。

【0145】 將分析得到的正確的可變區序列與相應的重鏈/ $\kappa$  鏈的恒定區透過搭橋 PCR 連接，克隆至表達載體 pCAGGS(購自 Addgene) 中。其中重鏈以 EcoRI 和 XhoI 連接， $\kappa$  鏈以 SacI 與 XhoI 連接。

B 細胞測序及表達質粒構建如下：

【0146】 人源抗體設計策略如下：

【0147】 重鏈：CMV 啟動子-EcoR I-前導序列-重鏈可變區-CH-Xho I；

【0148】 輕鏈 ( $\kappa$ )：CMV 啟動子-Sac I-前導序列-輕鏈可變區-CL( $\kappa$ )-Xho I；

【0149】 其中，前導序列 (Leader sequence) 的胺基酸序列如 SED ID NO: 18 所示，CH 的胺基酸序列如 SED ID NO: 19 所示，CL 的胺基酸序列如 SED ID NO: 20 所示，透過序列測定，獲得一株抗體的序列，這一株抗體命名為 CB6。

【0150】 其中 CB6 的重鏈可變區序列如 SEQ ID NO: 7 所示，輕鏈可變區序列如 SEQ ID NO: 8 所示，重鏈序列如 SEQ ID NO: 22 所示，輕鏈序列如 SEQ ID NO: 23 所示。

【0151】 CB6 的重鏈可變區具有分別如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和輕鏈可變區具有胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。其中 CB6 抗體與胚系基因的序列一致性比較如下：

【0152】 表 2.CB6 抗體重鏈與胚系基因比較

	V-H 等位基因	D-H 等位基因	J-H 等位基因	一致性(V-H)
CB6	IGHV3-66*01	IGHD3-10*02	IGHJ4*02	99.00%

【0153】 表 3. CB6 抗體輕鏈與胚系基因比較

	V-L 等位基因	J-L 等位基因	一致性(V-L)
CB6	IGKV1-39*01	IGKJ2*01	99.60%

## 【0154】 3.2 人源抗體 GH12

【0155】 將上述逆轉錄產物作為範本，用 HotStar Tap Plus 酶 (QIAGEN) 進行 PCR (PCR<sub>a</sub>)，擴增抗體可變區序列。設計相應的引子，反應條件如下：95°C，5min；95°C 30s，55°C (重鏈) /50°C (λ 鏈) 30s，72°C 90s，35 個迴圈；72°C，7min。將此產物作為範本再進行 1 輪 PCR (PCR<sub>b</sub>)，條件如下：95°C，5min；95°C 30s，58°C (重鏈) /64°C (λ 鏈) 30s，72°C 90s，35 個迴圈；72°C，7min，得到 PCR 產物。

【0156】 用 1.2%的瓊脂糖凝膠電泳分離 PCR 產物。條帶大小在 400-500bp 的切膠回收後送測序公司測序。測序結果用 IMGT 線上軟體進行分析。

【0157】 將分析得到的正確的可變區序列與相應的重鏈/λ 鏈的恒定區透過搭橋 PCR 連接，克隆至表達載體 pCAGGS (購自 Addgene)

中。其中重鏈與  $\lambda$  鏈以 EcoRI 和 XhoI 連接。B 細胞測序及表達質粒構建如下：

**【0158】** 人源抗體設計策略如下：

**【0159】** 重鏈：CMV 啟動子-EcoR I-前導序列-重鏈可變區-CH-Xho I；

**【0160】** 輕鏈 ( $\lambda$ )：CMV 啟動子-EcoR I-前導序列-輕鏈可變區-CL( $\lambda$ )-Xho I；

**【0161】** 其中，前導序列的胺基酸序列如 SED ID NO: 18 所示，CH 的胺基酸序列如 SED ID NO: 19 所示，CL 的胺基酸序列如 SED ID NO: 24 所示，透過序列測定，獲得一株抗體的序列，將這株抗體命名為 GH12。

**【0162】** 其中 GH12 的重鏈可變區序列如 SEQ ID NO: 31 所示，輕鏈可變區序列如 SEQ ID NO: 32 所示，重鏈序列如 SEQ ID NO: 33 所示，輕鏈序列如 SEQ ID NO: 34 所示。

**【0163】** GH12 的重鏈可變區具有分別如 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和輕鏈可變區具有胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

**【0164】** 其中 GH12 抗體與胚系基因的序列一致性比較如下：

**【0165】** 表 4. GH12 抗體重鏈與胚系基因比較

	V-H 等位基因	D-H 等位基因	J-H 等位基因	一致性(V-H)
GH12	IGHV3-7*01	IGHD3-10*01	IGHJ3*02	99.70%

【0166】 表 5. GH12 抗體輕鏈與胚系基因比較

	V-L 等位基因	J-L 等位基因	一致性(V-L)
GH12	IGLV6-57*02	IGLJ3*02	100.00%

【0167】 實施例 4：抗體的表達

【0168】 以含 10%FBS 的 DMEM 培養 293T 細胞。用含有實施例 3 得到的特定抗體輕、重鏈編碼基因的質粒共轉染 293T。轉染 4-6 小時後將細胞培養液更換成無血清的 DMEM，並且繼續培養 3 天，收集上清後，再補加 DMEM，繼續培養 4 天，收集上清。

【0169】 收集的上清經過 5000rpm 離心 30min 後，與含有 20mM 磷酸鈉(pH 8.0)的緩衝液等體積混合，經過 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾後，與 protein A 預裝柱結合 (5mL, GE Healthcare)。以 10mM 甘氨酸 (pH 3.0)洗脫結合的蛋白。收集此蛋白濃縮後進行分子篩層析。目的峰透過 SDS-PAGE(還原性和非還原性)確定，結果如圖 2a (CB6 抗體) 和 2b (GH12 抗體)。得到純化的 CB6 和 GH12 抗體。

【0170】 實施例 5：表面等離子共振技術檢測抗體與 2019-nCoV RBD 的結合能力

【0171】 表面等離子共振分析利用 Biacore 8K (Biacore Inc.) 進

行。具體步驟如下：

【0172】 選用 protein A 晶片（購自 GE Healthcare），透過 protein A 與抗體 Fc 的親和力將實施例 4 得到的純化的抗體固定在晶片上，抗體固定量約為 5000RU，用 10 mM HEPES，150 mM NaCl，pH 7.4 溶液倍比稀釋 2019-nCoV RBD 蛋白，從低濃度到高濃度逐一上樣。抗體結合 2019-nCoV RBD 的動力學曲線如圖 3a（CB6 抗體）和 3b（GH12 抗體）所示。抗體結合 2019-nCoV RBD 的動力學常數如表 6 所示。結合動力學常數的計算是利用 BIAevaluation software 8K (Biacore, Inc.)軟體進行。可見 CB6 和 GH12 抗體能夠和 2019-nCoV RBD 以較高的親和力結合。

【0173】 表 6. 抗體與 2019-nCoV RBD 蛋白結合的動力學常數

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CB6	8.95E+05	7.29E-04	8.15E-10
GH12	2.95E+06	1.73E-02	5.87E-09

【0174】 實施例 6：本發明抗體阻斷 2019-nCoV RBD 與 ACE2 結合的檢測

【0175】 將 hACE2 (胺基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示)的編碼基因透過 XhoI 和 BamHI 構建入 pEGFP-N1 載體(購自 Addgene)中，並且與 GFP 融合表達，形成 pEGFP-hACE2 質粒。將質粒 pEGFP-hACE2 轉染 HEK293T 細胞，24h 可在螢光顯微鏡下觀察到 GFP 表達。收集 HEK293T-hACE2 細胞， $2 \times 10^5$  為一個反應，與 2019-nCoV RBD (200ng/mL) 在室溫條件下孵育 30min。500×g 離心 5min 後，

去掉上清，加入 PBS 洗 2 次。與抗 His/APC ( anti-His/APC ) 在室溫下孵育 30min，再經過 PBS 洗 2 次後，用 BD FACSCanto 檢測細胞表面的螢光情況。

【0176】 為了檢測 CB6 和 GH12 的阻斷效果，將實施例 4 得到的純化的抗體 ( CB6 和 GH12 ) 分別與 200ng/mL 的 2019-nCoV RBD 按莫耳比 10 : 1 的條件下在室溫下孵育 1h，再與 HEK293T-hACE2 細胞孵育。其餘步驟與上面相同，用抗 His/APC ( anti-His/APC ) 檢測蛋白與細胞的結合情況。抗體阻斷 2019-nCoV RBD 與 HEK293T-hACE2 細胞的結合情況如圖 4a( CB6 抗體 ) 和 4b( GH12 抗體 ) 所示。可見，CB6 和 GH12 抗體均能阻斷 2019-nCoV RBD 與 HEK293T-hACE2 細胞的結合。

【0177】 實施例 7：本發明抗體中和 2019-nCoV 假病毒感染的檢測

【0178】 將實施例 4 得到的純化的抗體 ( CB6 和 GH12 ) 分別從 50 $\mu$ g/mL 開始 3 倍倍比稀釋至第 10 個梯度 ( 2.5ng/mL ) 與  $1.6 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> VSV-2019-nCoV 假病毒混合在 37 $^{\circ}$ C 混合孵育 1h，然後加入到預先接種 Huh7 細胞 ( 購自協和醫科大學基礎醫學細胞中心 ) 的 96 孔板中。孵育 4 小時後，棄掉培養液與病毒液，加入含有 10% FBS 的 DMEM 培養液中，繼續培養 48 小時。棄掉培養液，PBS 洗一次後，加入 1 $\times$ 裂解液 ( Promega , Luciferase Assay System ) 裂解細胞後，取 10  $\mu$ L 裂解液加入 50  $\mu$ L 反應底物，透過 Promega Luminometers 檢測。根據不同濃度下螢光素酶的活性，計算抗體

對 VSV-2019-nCoV 假病毒的中和能力，結果如圖 5a (CB6 抗體) 和 5b (GH12 抗體) 所示，結果統計如表 7。

【0179】 表 7 抗體對不同來源病毒中和效果

mAbs	ND50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>
CB6	0.00027
GH12	3.27

<sup>a</sup> 半抑制濃度

【0180】 可見 CB6 和 GH12 抗體能以高中和活性中和 2019-nCoV 假病毒。

【0181】 綜上，CB6 和 GH12 抗體能夠作為高中和活性的新型冠狀病毒 (2019-nCoV) 人源單克隆抗體。

【0182】 實施例 8：本發明抗體中和 2019-nCoV 活病毒的檢測

【0183】 本研究透過體外中和實驗評估 CB6 抗體對 2019-nCoV (SARS-CoV-2) 活病毒的中和作用。

【0184】 8.1 試劑

名稱	來源
COVID-19 SARS-CoV-2: BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-envF13/2020	National Institute for Viral Disease Control and Prevention
Vero E6 細胞	National Institute for Viral Disease Control and Prevention
FBS	Gibco
DMEM	Gibco

【0185】 8.2 實驗方法

【0186】 將 Vero E6 細胞以每孔  $1 \times 10^5$  的密度接種于 96 孔培養板，

37°C 培養 24 小時後使用。在 DMEM 培養基的 96 孔組織培養板中，加入連續 2 倍稀釋的 50 $\mu$ l CB6 抗體(從 48.8ng/mL 到 100 $\mu$ g/mL)。然後加入等體積的包含 200 TCID<sub>50</sub> SARS-CoV-2 的 SARS-CoV-2 工作儲備液，最終病毒載量為 100 TCID<sub>50</sub>。將抗體-病毒混合物在 37°C 孵育 1 h，然後轉移到包含八聯體融合 Vero E6 細胞的 96 孔微量滴定板中，37°C 下于 CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 3 天。將 100 TCID<sub>50</sub> 的 SARS-CoV-2 感染的細胞或對照培養基(DMEM+10%FBS)培養的細胞分別用作陽性對照或陰性未感染對照。在感染之前和之後觀察並記錄每個孔中的細胞病變效應(CPE)。進行病毒反滴定以評估實驗中使用的正確病毒滴定。使用 Prism 軟體計算 50% 中和劑量(ND<sub>50</sub>)。所有實驗均按照標準操作程式在批准的生物安全 3 級設施中進行。

### 【0187】 8.3 結果和結論

【0188】 透過在不同濃度的 CB6 存在下，將細胞與 SARS-CoV-2 活病毒共培養來評估 CB6 的中和功能。如圖 6 所示，CB6 以劑量依賴的方式降低了 SARS-CoV-2 病毒對 Vero E6 細胞的細胞病變效應。半數中和劑量(ND<sub>50</sub>)為 5.56 nM。

【0189】 CB6 能中和 SARS-CoV-2 活病毒並減輕病毒對細胞的病理損害。

### 【0190】 實施例 9：本發明抗體對動物保護性效果評價

#### 【0191】 9.1 實驗設計

【0192】 1) 非人靈長類實驗動物約為 7 歲的恒河猴(湖北天勤生

物技術公司)，雌性 3 只，雄性 6 只，體重為 5.7-10.9 公斤，日齡為 2512-2545 天，按實驗動物品質管制要求完成動物常規病原體檢測和冠狀病毒類病毒的檢測；符合要求的實驗動物在實驗室進行 3 天適應性飼養；

【0193】 2) 設置對照組和新冠抗體治療組、預防組，對照組恒河猴 3 只(C1、C2 和 C3)，預防組恒河猴為 3 只(PA1、PA2 和 PA3)，治療組恒河猴 3 只(AC1、AC2 和 AC3)。其中，對照組攻毒前 24 小時單次注射 PBS，預防組在攻毒前 24 小時注射 CB6，給藥劑量為 50mg/kg；治療組在攻毒後 24 小時和 72 小時注射 CB6，給藥劑量為 50mg/kg。

【0194】 3)採用氣管插管接種方式進行動物感染，接種 1ml 的病毒液，病毒接種量為  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>；

【0195】 4)參數收集：

【0196】 a.每天觀察記錄實驗動物每天的病程變化，健康打分；

【0197】 b.不同時間麻醉動物後，測定體重、體溫，收集肛拭子、咽拭子、肺泡灌洗液、血液樣品等；

【0198】 c.感染後第 3 和 6 天，採集實驗動物胸部 X-射線影像，時間與觀測採樣同步；

【0199】 d.感染後第 5、6 和 7 天，分別隨機選擇一隻動物解剖，採集不同組織器官樣品。樣品採用常規方法在室內滅活處理後，進行組織病理、病毒載量和免疫組化分析。

【0200】 5)完成不同樣品(鼻拭子、咽拭子、肛拭子、血液、組織、

器官)的病毒載量分析及血常規、血生化分析、中和抗體滴度分析，完成感染動物的影像學和主要器官組織的病理學分析；

【0201】 6)按照實驗室標準操作程式和生物安全管理要求，所有採集的動物組織器官樣品在室內滅活處理後，進行組織病理、病毒載量和免疫組化分析；按照實驗室的廢棄物管理規定對實驗過程中產生的所有廢棄物進行處理。

## 【0202】 9.2 實驗方法

### 【0203】 1)新型冠狀病毒毒株

【0204】 新型冠狀病毒毒株 2019-nCoV-WIV04 ( GISAID 接受號：EPI\_ISI\_402124 ) 是由中國科學院武漢病毒研究所從武漢市 2019 年 12 月一例病毒性肺炎患者的支氣管肺泡灌洗液樣品分離得到。分離病毒毒株經純化、培養、增殖、濃縮後，測定病毒的 50%組織細胞感染量 ( TCID<sub>50</sub> )，病毒滴度單位為 TCID<sub>50</sub>/ml。

### 【0205】 2)動物行為觀察

【0206】 在實驗動物免疫和病毒攻毒階段，每天或按標記時間觀察動物的皮膚和毛髮、分泌物、呼吸、糞便和尿、採食量和運動行為，測定體重和溫度等，按照“新型冠狀病毒攻毒後恒河猴臨床評分標準”對每一隻動物的進行健康評分。

### 【0207】 3)病毒滴度測定

【0208】 新型冠狀病毒樣品接種在含 DMEM 的 Vero E6 細胞中，37°C 和 5%CO<sub>2</sub> 條件下培養 3 天后收集培養液，保存在 DMEM 備用。分離獲得的病毒毒株，經純化、培養、增殖、濃縮後，測定病

毒的 50%組織細胞感染量 (TCID<sub>50</sub>)。經過用終點滴定法對 Vero E6 細胞進行病毒滴定分析。接種 10 倍稀釋的病毒稀釋液到細胞，孵育 1 小時後，吸出病毒稀釋液，加入 100 $\mu$ l DMEM (添加 2%胎牛血清、1 mmL-穀氨醯胺、青黴素 (100 IU/ml) 和鏈黴素 (100 $\mu$ g/ml))。培養 3 天后進行細胞病變評分，計算出病毒滴度 (TCID<sub>50</sub>/ml)。

**【0209】** 4)即時定量螢光 PCR (qRT-PCR)

**【0210】** 採用一步法即時定量 RT-PCR 技術對樣品中的病毒 RNA 進行定量分析。根據供應商的說明，對拭子和血樣樣本，使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)提取樣品中病毒 RNA。樣本在 DMEM (1:10, W/V) 中均勻化，在 4 $^{\circ}$ C 下 4500 g 低速離心 30 分鐘，然後立即用上清液提取 RNA。RNA 在 50 $\mu$ l 洗脫液中洗脫，作為 RT-PCR 範本。根據先前的研究結果，使用了針對 S 基因的引子：RBD-qF1：5'-CAATGGTTAAGGCAGG-3'；RBD-qR1：5'-CTCAAGGTCTGGATCACG-3'。

**【0211】** 根據說明，採用 HiScript<sup>®</sup> II One Step qRT-PCR SYBR<sup>®</sup> Green Kit (Vazyme Biotech Co., Ltd)試劑盒，測定樣品中 RNA 的拷貝數。在 ABI 7700 機上進行 50 $^{\circ}$ C，3 min，95 $^{\circ}$ C，30 s，40 個迴圈，包括 95 $^{\circ}$ C，10 s，60 $^{\circ}$ C，30 s 終止，並根據標準曲線，換算為病毒拷貝數 (Copies/ml)。

**【0212】** 5)中和抗體測定

**【0213】** 透過利用新型冠狀病毒活病毒與血清抗體的中和反應測

定血清樣品中的中和抗體滴度。獲得的動物血清樣品在 56°C 熱滅活 30 min，稀釋至 1:50、1:150、1:450、1:1350、1:4050 和 1:12150，加入等量的活病毒，在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 培養箱中孵育。培養 1 小時後，將 100 微升混合物接種于 12 孔板中的單層 Vero 細胞上，每隔 15 分鐘搖動一次，孵育 1 小時。移除剩餘的接種液後，加入含 0.9% 甲基纖維素和 2% FBS 的 DMEM 的培養基後，在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 條件下培養三天。3 天后，用 4% 甲醛固定細胞 30 min，去除固定溶液，用自來水沖洗，然後用結晶紫染色。計數噬斑數量，確定中和抗體效價（EC<sub>50</sub>）。

**【0214】 6) 實驗動物操作**

**【0215】** 所有攻毒實驗是在四級生物安全實驗室完成。恒河猴麻醉後，採用氣管插管方式接種 1 毫升病毒液。每天觀察並記錄動物的臨床症狀、包括所有嚴重或可見變化的性質、發病、嚴重程度和持續時間。不同時間用 HF100Ha（日本 MIKASA）進行動肺部 X 光檢查，獲取肺部影像，採集口咽、鼻甲、肛區的拭子樣本和血液樣品。收集的拭子樣品放入 1 ml 的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中，含青黴素 (100 IU/ml) 和鏈黴素 (100 µg/ml)。全血保存到 K2 EDTA 管中，進行病毒 RNA 提取和血常規分析。為研究呼吸道的發病和病理損傷，分別於攻毒後第 5、6、7 天隨機安樂死一隻動物，收集氣管、右支氣管、左支氣管、六個肺葉及其他組織器官，進行病理、病毒學和免疫學分析。

**【0216】 7) 動物解剖和病理分析**

【0217】 按照實驗動物標準操作進行實驗動物解剖。採集的器官、組織樣品在 10%中性福馬林緩衝液固定後移出實驗室，進行石蠟包埋和切片，切片用蘇木精和伊紅染色後在光鏡下觀察。為檢測新型冠狀病毒的分佈，將石蠟脫水組織切片置於抗原緩衝液中，在室溫下用 5%牛血清白蛋白封閉組織 1 小時，然後在 1:500 時用自製的一抗(兔抗 RP3-RP3-CoV N 蛋白多克隆抗體)封閉組織。經 PBS 洗滌後，切片稍乾，1:200 稀釋，覆蓋 Cy3 結合山羊抗兔 IgG( Abcam ) 二抗。玻片經 PBS 洗滌後 1:100 稀釋 DAPI 染色。圖像由 Panoramic MIDI 系統 ( 3DHISTECH, 布達佩斯, 匈牙利 ) 採集。

【0218】 根據實驗動物肺部的病理變化特徵，確定器官和組織的損傷等級，其中：“+++”表示重度病變；“++”為中度病變；“+”為輕度病變；“-”為無病變，“+/-”為介入輕度和無病變之間。

【0219】 8)其他操作

【0220】 按照生物安全四級實驗室的管理體系檔要求，採用實驗室的標準操作程式完成。

【0221】 9.3 實驗結果

【0222】 1)實驗動物的選擇和適應性飼養

【0223】 實驗動物滿足湖北省實驗動物品質管制要求。實驗動物完成實驗室三天適應性飼養後，行為、健康、進食未有異常。

【0224】 2)接種病毒後實驗動物的臨床症狀觀察

【0225】 對照組、治療組和預防組實驗動物轉移到 P4 實驗室，在實驗室內進行 3 天的適應性飼養後，分別進行以下操作。

【0226】 對照組和預防組：按計劃在室內靜脈注射 PBS 和單克隆抗體（達到 50mg/kg），24 h 後採用氣管插管方式攻毒，並按實驗計畫進行常規的觀察和體溫及體重檢測。

【0227】 治療組：按計劃在氣管插管方式攻毒 24h 後，在 D1 和 D3 進行給藥，並按實驗計畫進行常規的觀察、體溫和體重檢測。

【0228】 結果表明，對照組、新冠抗體治療組及預防組的實驗動物在整個實驗階段未見明顯的行為差異，沒有明顯的體溫（參見圖 7a）和體重變化（參見圖 7b）。

【0229】 3)咽拭子、鼻拭子和肛拭子病毒載量變化

【0230】 每天採集咽拭子、鼻拭子和肛拭子樣品，檢測不同樣品中病毒載量變化。結果表明，對照組咽拭子病毒載量隨感染時間而變化，實驗動物（C1、C2 和 C3）接種病毒後，在第 2-4 天達到高峰後，持續下降。到第 7 天，樣品中的病毒載量降到一個較低的水準。但不同的動物個體的咽拭子病毒載量存在差異，其中 C1、C2 和 C3 的病毒複製高峰期分別在攻毒後第 2、3 和 4 天。但總體來看，咽拭子樣品中病毒載量變化規律顯示病毒在體內的增殖過程（參見圖 8a）。與對照組動物的咽拭子中病毒載量檢測結果相比，整個實驗週期，預防組 PA1 和 PA2 動物僅在攻毒後第 2-3 天可以檢測到低水準的病毒核酸，其餘檢測點均未能檢測到。PA3 動物在整個實驗週期未檢測到病毒核酸。

【0231】 新冠抗體治療組，個體差異明顯；但均在攻毒後 D2 達到病毒載量峰值，後持續降低，病毒載量遠低於對照組；AC1 個體

在 D3 其病毒載量低於檢測下限；鼻拭子樣品，所有組別的病毒載量均較低；鼻拭子樣品中僅能在攻毒早期檢測低水準的病毒核酸拷貝數，至 7 天，所有鼻拭子樣品檢測不到病毒核酸(參見圖 8b)。

【0232】 肛拭子樣品，所有組別的病毒載量均較低；僅個別動物在攻毒早期檢測低水準的病毒核酸拷貝數，至 7 天，所有肛拭子樣品檢測不到病毒核酸(參見圖 8c)。

【0233】 4)感染動物的影像學分析

【0234】 對照組 3 只實驗動物在攻毒第 0 天的 X-射線肺部影像清晰，未觀察到任何肺部陰影。在病毒攻毒當天，未見對照組實驗動物肺部有明顯的陰影；攻毒第三天，一隻動物(C3)可見肺部紋理略顯模糊/紊亂，另外兩隻動物(C1 和 C2)可見明顯的肺部陰影，至第 6 天，看不到明顯肺部陰影(參見圖 9a)。

【0235】 而無論是預防組 3 只動物還是治療組 3 只動物，X-射線影像顯示所有感染動物未出現肺部陰影，僅在攻毒後第 3 天，可觀察到肺部紋理略顯模糊/紊亂，但觀察不到明顯的肺部陰影(參見圖 9b 和 9c)。

【0236】 5)感染動物的病理變化

【0237】 分別於感染後第 5、6 和 7 天隨機選取對照組、預防組和治療組各一隻動物進行解剖，分別採集肺、氣管、支氣管、心、肝、脾、腎、胃腸、生殖器官、淋巴結等器官和組織。根據實驗要求，觀察各器官形狀、色澤和組織病變部位。

【0238】 攻毒後第 5 天，對照組動物(C2)大體肺表面大體肺表

面色澤淺灰白色，質中，雙下肺病變稍重，肺葉邊緣呈氣腫狀，氣管及支氣管大體未見明顯異常。攻毒後第 6 和第 7 天，對照組動物（D6：C3；D7：C1）大體肺表面暗紅色，質中，雙下肺病變稍重，肺葉邊緣片狀氣腫與肺實變區域混雜，氣管及支氣管大體未見明顯異常。

【0239】 攻毒後第 5 天，預防組動物（PA2）和治療組動物(AC2)大體肺表面暗紅色，質中，雙下肺病變稍重，肺葉邊緣肺氣腫明顯，氣管及支氣管大體未見明顯異常。攻毒後第 6、7 天，實驗動物（預防組：D6：PA3，D7：PA1；治療組：D6：AC3，D7：AC1）大體肺表面色澤淺灰白色，質中，肺部、氣管及支氣管大體未見明顯異常。

【0240】 肺部的組織病理變化觀察表明，感染第 5 天后，可觀察到對照組動物肺彌漫性間質性肺炎改變，肺泡壁增厚，成纖維細胞增生、纖維化，並見大量單核細胞和淋巴細胞浸潤；部分肺泡水腫及纖維蛋白滲出，可見透明膜形成及肺出血。部分肺毛細血管腔內透明血栓形成，細小支氣管上皮細胞壞死、脫落。感染第 6、7 天的動物肺水腫及纖維蛋白滲出加重，肺泡腔巨噬細胞增多，肺泡壁和肺泡腔纖維化和機化明顯。與對照組相比，無論是治療組還是預防組，新冠病毒造成的實驗動物的肺部損傷較小。感染後第 5 天，兩隻動物（AC2 和 PA2）的肺泡結構基本完整，可見灶性或小片狀肺組織纖維化，並見單核細胞和淋巴細胞浸潤，但數量均較對照組明顯減少，肺泡腔巨噬細胞較多，水腫較輕，未見透明膜形成，未

見嚴重的細小支氣管和肺毛細血管病變。感染後第 6、7 天，動物肺部病理變化明顯改善，肺組織滲出性病變基本消失，可見灶性或小片狀組織纖維化。

**【0241】** 6)不同器官組織中的病毒載量

**【0242】** 為了進一步瞭解病毒在上呼吸道和肺部不同組織中的分佈，分別於攻毒後第 5、6 和 7 天採集了對照組和兩個抗體組動物氣管、支氣管、肺部不同部位的組織，測定了不同器官和組織中的病毒載量，結果表明在攻毒後第 5 天，僅在一隻預防組動物(AC2)的氣管和左支氣管中檢測到  $4-8 \times 10^5$  病毒拷貝/克，而在其它組織樣品中均未能檢測到病毒顆粒，所有治療組動物樣品中均未檢測到病毒核酸（參見圖 10a）。

**【0243】** 如圖 10b 所示，感染後第 6 天，在對照組動物（C3）的氣管、左右支氣管、左肺上葉中都檢測到  $4 \times 10^5-1 \times 10^6$  病毒拷貝/克，其它組織樣品中均未檢測到病毒顆粒。同時，在一隻預防組動物（AC3）的氣管組織中也檢測到  $3 \times 10^5$  病毒拷貝/克，其它組織樣品中均檢測不到病毒顆粒。治療組動物樣品中未檢測到病毒核酸。

**【0244】** 如圖 10c 所示，感染後第 7 天，在對照組動物（C1）的左支氣管、左肺下葉檢測到  $5 \times 10^4$  病毒拷貝/克，其它組織樣品中均檢測不到病毒顆粒。同時，預防組和治療組動物組織樣品中均檢測不到病毒顆粒。

**【0245】** 7)免疫組化分析

**【0246】** 肺組織進行了病毒的免疫組化分析結果表明，在對照組

第 5、6 和 7 天的肺部病變組織中，可在肺部檢測到病毒蛋白，而在不同時間的抗體治療組和預防組的動物肺部檢測不到病毒蛋白。

**【0247】** 以上所述的具體實施例，對本發明的目的、技術方案和有益效果進行了進一步詳細說明，應理解的是，以上所述僅為本發明的具體實施例而已，並不用於限制本發明，凡在本發明的精神和原則之內，所做的任何修改、等同替換、改進等，均應包含在本發明的保護範圍之內。

**【符號說明】**

**【0248】**

無

## 序列表

<110> 中國科學院微生物研究所

<120> 新型冠狀病毒的人源單克隆抗體及其應用

<130> MTI20238

<150> CN2020101142838  
<151> 2020-02-24

<150> CN2020101374869  
<151> 2020-03-02

<150> CN2021100445414  
<151> 2021-01-13

<160> 34

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>  
<223> 重鏈可變區的HCDR1

<400> 1  
Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr  
1                   5

<210> 2  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>  
<223> 重鏈可變區的HCDR2

<400> 2  
Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr  
1                   5

<210> 3  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 重鏈可變區的HCDR3

<400> 3

Ala Arg Val Leu Pro Met Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 輕鏈可變區的LCDR1

<400> 4

Gln Ser Ile Ser Arg Tyr

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 輕鏈可變區的LCDR2

<400> 5

Ala Ala Ser

1

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 輕鏈可變區的LCDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Glu Tyr Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

&lt;223&gt; 重鏈可變區

&lt;400&gt; 7

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 Phe Thr Val Ser Ser Asn  
                   20                   25                   30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 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 Met Asn Thr Leu Phe 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 Val Leu Pro Met Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                   105                   110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(artificial sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 輕鏈可變區

&lt;400&gt; 8

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

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 229

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 新型冠状病毒(2019-nCoV)

&lt;400&gt; 9

Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val  
 20 25 30  
 Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser  
 35 40 45  
 Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val  
 50 55 60  
 Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln  
 85 90 95  
 Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr  
 100 105 110  
 Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly  
 115 120 125  
 Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys  
 130 135 140  
 Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr  
 145 150 155 160  
 Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val  
 180 185 190  
 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly  
 195 200 205  
 Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe His  
 210 215 220  
 His His His His His  
 225

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(artificial sequence)

<220>  
 <223> 寡核苷酸引子

<400> 10  
 atggagtcgg gaaggaagtc

20

<210> 11  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(artificial sequence)

<220>  
 <223> 寡核苷酸引子

# I789711

<400> 11	
tcacggacgt tgggtggta	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(artificial sequence)	
<220>	
<223> 寡核苷酸引子	
<400> 12	
tcacggaggt ggcattgga	19
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(artificial sequence)	
<220>	
<223> 寡核苷酸引子	
<400> 13	
caggcgatga ccacgttcc	19
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(artificial sequence)	
<220>	
<223> 寡核苷酸引子	
<400> 14	
catgcgacga ccacgttcc	19
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(artificial sequence)	
<220>	
<223> 寡核苷酸引子	
<400> 15	
agggtgtcac gccgctggtc	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸引子

<400> 16

gcaggcacac aacagaggca

20

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸引子

<400> 17

aggccactgt cacagct

17

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 前導序列的胺基酸序列

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1                    5                    10                    15

Gly Ser Thr Gly Asp

20

<210> 19

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> CH的胺基酸序列

<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1                    5                    10                    15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20                    25                    30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35                    40                    45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50                    55                    60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 20

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> CL的胺基酸序列

<400> 20

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

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

<210> 21  
 <211> 805  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 21  
 Met Ser Gly Ser Phe Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe  
 20 25 30  
 Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp  
 35 40 45  
 Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn  
 50 55 60  
 Ala Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln  
 85 90 95  
 Leu Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys  
 100 105 110  
 Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser  
 115 120 125  
 Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu  
 130 135 140  
 Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu  
 145 150 155 160  
 Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu  
 165 170 175  
 Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg  
 180 185 190  
 Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu  
 195 200 205  
 Val Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu  
 210 215 220  
 Asp Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu  
 225 230 235 240  
 His Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile  
 245 250 255  
 Ser Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly  
 260 265 270  
 Arg Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys

275	280	285
Pro Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala		
290	295	300
Gln Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu		
305	310	315
Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro		
325	330	335
Gly Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly		
340	345	350
Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp		
355	360	365
Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala		
370	375	380
Tyr Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe		
385	390	395
His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys		
405	410	415
His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn		
420	425	430
Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly		
435	440	445
Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe		
450	455	460
Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met		
465	470	475
Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe		
500	505	510
Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala		
515	520	525
Leu Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile		
530	535	540
Ser Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu		
545	550	555
Gly Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala		
565	570	575
Lys Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe		
580	585	590
Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr		
595	600	605
Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu		
610	615	620
Lys Ser Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met		
625	630	635
Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu		
645	650	655
Lys Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val		
660	665	670
Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro		

675                      680                      685  
 Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile  
 690                      695                      700  
 Arg Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn  
 705                      710                      715                      720  
 Ser Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln  
 725                      730                      735  
 Pro Pro Val Ser Ile Trp Leu Ile Val Phe Gly Val Val Met Gly Val  
 740                      745                      750  
 Ile Val Val Gly Ile Val Ile Leu Ile Phe Thr Gly Ile Arg Asp Arg  
 755                      760                      765  
 Lys Lys Lys Asn Lys Ala Arg Ser Gly Glu Asn Pro Tyr Ala Ser Ile  
 770                      775                      780  
 Asp Ile Ser Lys Gly Glu Asn Asn Pro Gly Phe Gln Asn Thr Asp Asp  
 785                      790                      795                      800  
 Val Gln Thr Ser Phe  
 805

<210> 22  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(artificial sequence)

<220>  
 <223> 重鏈序列

<400> 22  
 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 Phe Thr Val Ser Ser Asn  
 20                      25                      30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 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 Met Asn Thr Leu Phe 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 Val Leu Pro Met Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100                      105                      110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115                      120                      125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130                      135                      140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145                      150                      155                      160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165                      170                      175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

	180		185		190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro					
	195		200		205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys					
	210		215		220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro					
225		230		235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser					
	245		250		255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp					
	260		265		270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn					
	275		280		285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val					
	290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu					
305		310		315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys					
	325		330		335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr					
	340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr					
	355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
	370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
385		390		395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys					
	405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
	420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
	435		440		445

Lys

- <210> 23
- <211> 217
- <212> PRT
- <213> 人工序列(artificial sequence)

- <220>
- <223> 輕鏈序列

<400> 23
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1                    5                    10                    15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
20                    25                    30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35                      40                      45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
 85                      90                      95  
 Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val  
 100                      105                      110  
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 115                      120                      125  
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 130                      135                      140  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 145                      150                      155                      160  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 165                      170                      175  
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 180                      185                      190  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 195                      200                      205  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser  
 210                      215

<210> 24  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(artificial sequence)

<220>  
 <223> CL的胺基酸序列

<400> 24  
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln  
 1                      5                      10                      15  
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly  
 20                      25                      30  
 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly  
 35                      40                      45  
 Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala  
 50                      55                      60  
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val  
 85                      90                      95  
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100

<210> 25  
 <211> 8

# I789711

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 重鏈可變區的HCDR1

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 重鏈可變區的HCDR2

<400> 26

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys

1 5

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 重鏈可變區的HCDR3

<400> 27

Thr Arg Ala Gly Trp Val Arg Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 輕鏈可變區的LCDR1

<400> 28

Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr

1 5

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 輕鏈可變區的LCDR2

<400> 29

Glu Asp Asn

1

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 輕鏈可變區的LCDR3

<400> 30

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Leu Trp Val

1                    5                    10

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 31

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 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20                    25                    30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35                    40                    45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val 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 Val Tyr Tyr Cys

85                    90                    95

Thr Arg Ala Gly Trp Val Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100                    105                    110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 輕鏈可變區

&lt;400&gt; 32

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

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 449

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(artificial sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重鏈

&lt;400&gt; 33

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 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val 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 Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Thr Arg Ala Gly Trp Val Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
                   100                   105                   110  
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
                   115                   120                   125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
                   130                   135                   140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145                    150                    155                    160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
                           165                    170                    175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
                           180                    185                    190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
                           195                    200                    205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
                           210                    215                    220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225                    230                    235                    240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                           245                    250                    255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
                           260                    265                    270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
                           275                    280                    285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
                           290                    295                    300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305                    310                    315                    320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
                           325                    330                    335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
                           340                    345                    350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
                           355                    360                    365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
                           370                    375                    380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385                    390                    395                    400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
                           405                    410                    415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
                           420                    425                    430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
                           435                    440                    445  
 Lys

<210> 34  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(artificial sequence)

<220>  
 <223> 輕鏈

<400> 34  
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

# I789711

1                    5                    10                    15  
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
                  20                    25                    30  
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val  
                  35                    40                    45  
Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
                  50                    55                    60  
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65                    70                    75                    80  
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser  
                  85                    90                    95  
Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
                  100                    105                    110  
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
                  115                    120                    125  
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
                  130                    135                    140  
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
145                    150                    155                    160  
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
                  165                    170                    175  
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
                  180                    185                    190  
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
                  195                    200                    205  
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
                  210                    215

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種特異性結合2019-nCoV受體結合結構域（RBD）的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含：

（I）胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 3所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；或與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 3所示胺基酸序列分別具有1、2或3個胺基酸差異的HCDR1、HCDR2和HCDR3；或

（II）胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26和SEQ ID NO: 27所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；或與SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26和SEQ ID NO: 27所示胺基酸序列分別具有1、2或3個胺基酸差異的HCDR1、HCDR2和HCDR3；

所述輕鏈可變區包含：

（I）胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或與SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6所示胺基酸序列分別具有1、2或3個胺基酸差異的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或

（II）胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或與SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30所示胺基酸序列分別具有1、2或3個胺基酸差異的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【請求項2】 如請求項1所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和/或輕鏈可變區，

所述重鏈可變區包含：

(I)胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；或

(II)胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

所述輕鏈可變區包含：

(I)胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(II)胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【請求項3】 如請求項2所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段包含：

(I)重鏈可變區，其具有胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 3所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；和輕鏈可變區，其具有胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或

(II)重鏈可變區，其具有胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26和SEQ ID NO: 27所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；

和輕鏈可變區，其具有胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【請求項4】 如請求項3所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，包含重鏈可變區和輕鏈可變區：

(I)所述重鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 7 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 7 所示的胺基酸序列具有至少 95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；和所述輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 8 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 8 所示的胺基酸序列具有至少 95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；或

(II)所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO: 31所示的胺基酸序列，或與SEQ ID NO: 31所示的胺基酸序列具有至少95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的胺基酸序列；和所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO: 32所示的胺基酸序列，或與SEQ ID NO: 32所示的胺基酸序列具有至少95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項4所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，包含：

(I)胺基酸序列如SEQ ID NO: 7所示的重鏈可變區和胺基酸序列如SEQ ID NO: 8所示的輕鏈可變區；或

(II)胺基酸序列如SEQ ID NO: 31所示的重鏈可變區和胺基酸序列如SEQ ID NO: 32所示的輕鏈可變區。

【請求項6】 如請求項5所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體包含重鏈和輕鏈：

(I)所述重鏈包含如 SEQ ID NO: 22 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 22 所示的胺基酸序列具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；和所述輕鏈包含如 SEQ ID NO: 23 所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 23 所示的胺基酸序列具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的胺基酸序列；或

(II)所述重鏈包含如SEQ ID NO: 33所示的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO: 33所示的胺基酸序列具有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的胺基酸序列；和所述輕鏈包含如SEQ ID NO: 34所示的胺基酸序列，或與SEQ ID NO: 34所示的胺基酸序列具有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的胺基酸序列。

【請求項7】 如請求項6所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體包含：

(I)胺基酸序列如SEQ ID NO: 22所示的重鏈，和胺基酸序列如SEQ ID NO: 23所示的輕鏈；或

(II)胺基酸序列如SEQ ID NO: 33所示的重鏈，和胺基酸序列如SEQ ID NO: 34所示的輕鏈。

【請求項8】 如請求項1至請求項7中任一項所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段，其中所述抗原結合片段選自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')<sub>2</sub>、雙抗體。

【請求項9】 一種多肽，其含有選自SEQ ID NO: 7、8、22或23所示的序列。

【請求項10】 一種多肽，其含有選自SEQ ID NO: 31、32、33或34所示的序列，其中所述多肽是特異性結合2019-nCoV 受體結合結構域（RBD）的人源單克隆抗體一部分，並且

當所述多肽含有 SEQ ID NO: 31 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 32 所示的多肽；

當所述多肽含有 SEQ ID NO: 32 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 31 所示的多肽；

當所述多肽含有 SEQ ID NO: 33 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 34 所示的多肽；或

當所述多肽含有 SEQ ID NO: 34 時，所述人源單克隆抗體還包含 SEQ ID NO: 33 所示的多肽。

【請求項11】 一種多核苷酸，其編碼請求項1至請求項8中任一項所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段或請求項9或10所述的多肽。

【請求項12】 一種表達載體，其包含請求項11所述的多核苷酸，優選地，所述載體為真核表達載體。

【請求項13】 一種宿主細胞，其包含請求項11所述的多核苷酸或請求項12所述的表達載體，優選地，所述宿主細胞是真核細胞，更優選哺乳動物細胞。

【請求項14】 一種製備如請求項1至請求項8中任一項所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段或請求項9或10所述多肽的方法，所述方法包括在適合於所述抗體或其抗原結合片段或所述多肽表達的條件下在請求項13所述的宿主細胞中表達所述抗體或其抗原結合片段或所述多肽，並從所述宿主細胞回收所表達的抗體或其抗原結合片段或所述多肽。

【請求項15】 一種藥物組合物，其含有請求項1至請求項8中任一項所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段、請求項9或10所述多肽、請求項11所述的多核苷酸、請求項12所述的表達載體和/或請求項13所述的宿主細胞，和藥用載體。

【請求項16】 一種如請求項1至請求項8中任一項所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段、請求項9或10所述多肽、請求項11所述的多核苷酸、請求項12所述的表達載體、請求項13所述的宿主細胞和/或請求項15所述的藥物組合物在製備治療和/或預防2019-nCoV感染的藥物中的用途。

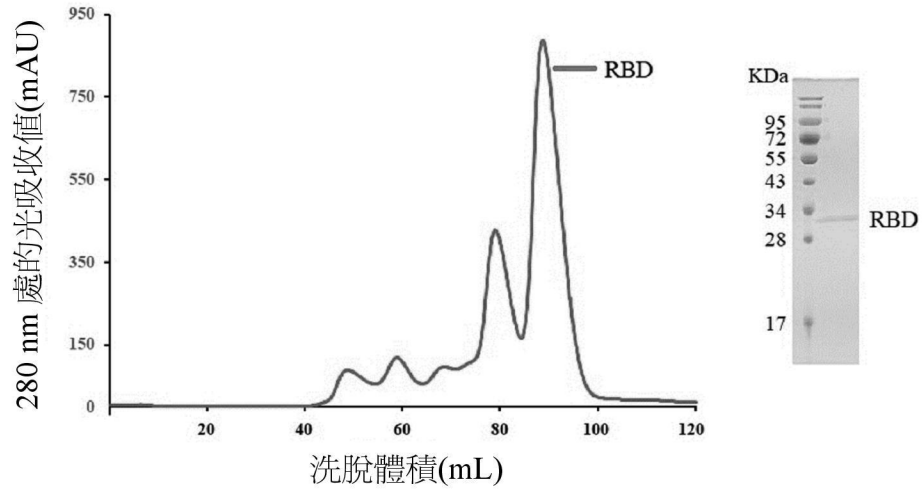
【請求項17】 一種試劑盒，其含有請求項1至請求項8中任一項所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段、請求項9或10所述多肽、請求項11所述的多核苷酸、請求項12所述的表達載體、請求項13所述的宿主細胞和/或請求項15所述的藥物組合物。

**【請求項18】** 一種如請求項17所述的試劑盒在製備診斷2019-nCoV感染的藥物中的用途。

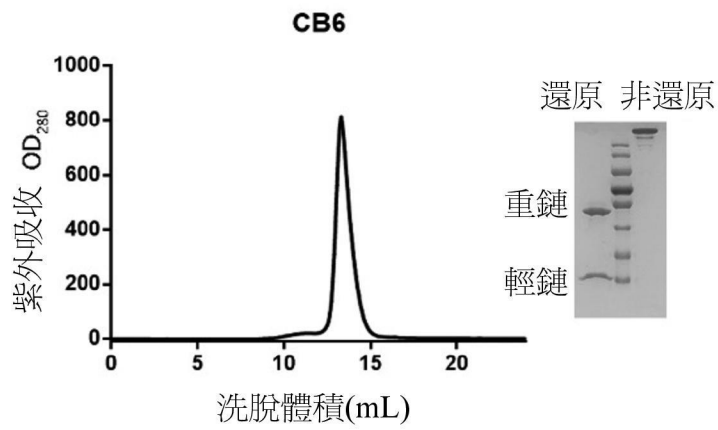
**【請求項19】** 一種檢測2019-nCoV在樣品中的存在的方法，其包含使用請求項1至請求項8中任一項所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段或請求項9或10所述多肽。

**【請求項20】** 一種用於治療和/或預防2019-nCoV感染的藥物組合物，所述藥物組合物包括如請求項1至請求項8中任一項所述的人源單克隆抗體或其抗原結合片段、請求項9或10所述多肽、請求項11所述的多核苷酸、請求項12所述的表達載體、請求項13所述的宿主細胞和/或請求項15所述的藥物組合物。

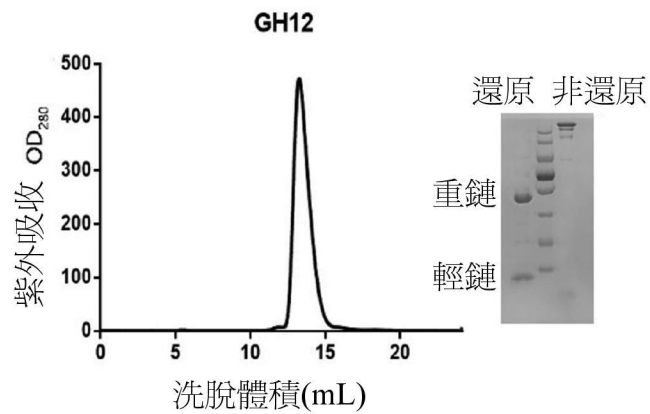
【發明圖式】



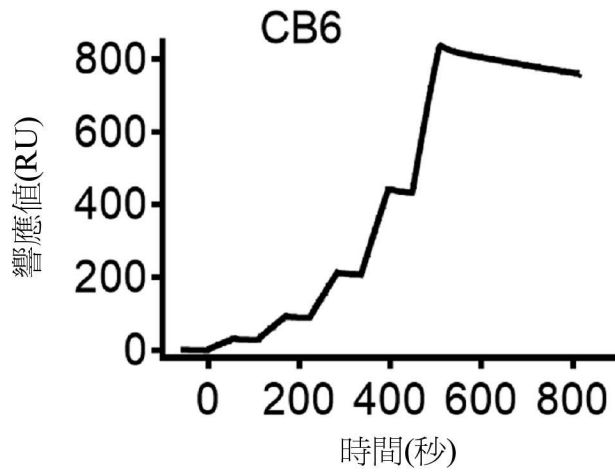
【圖 1】



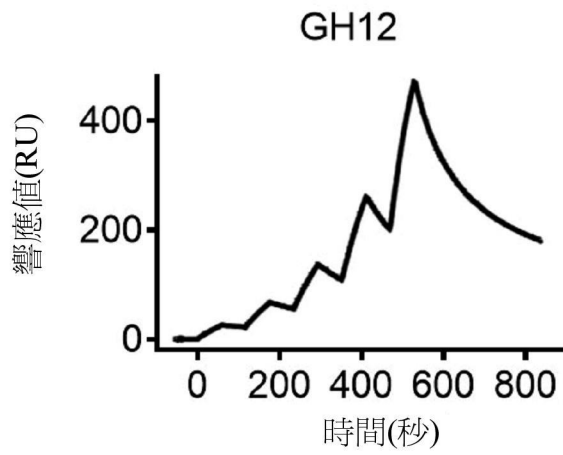
【圖 2a】



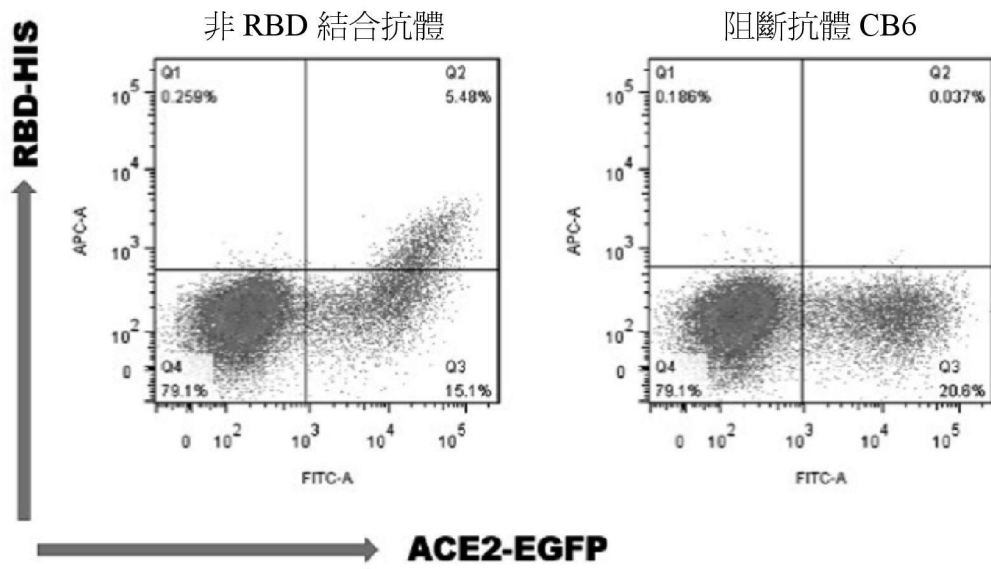
【圖 2b】



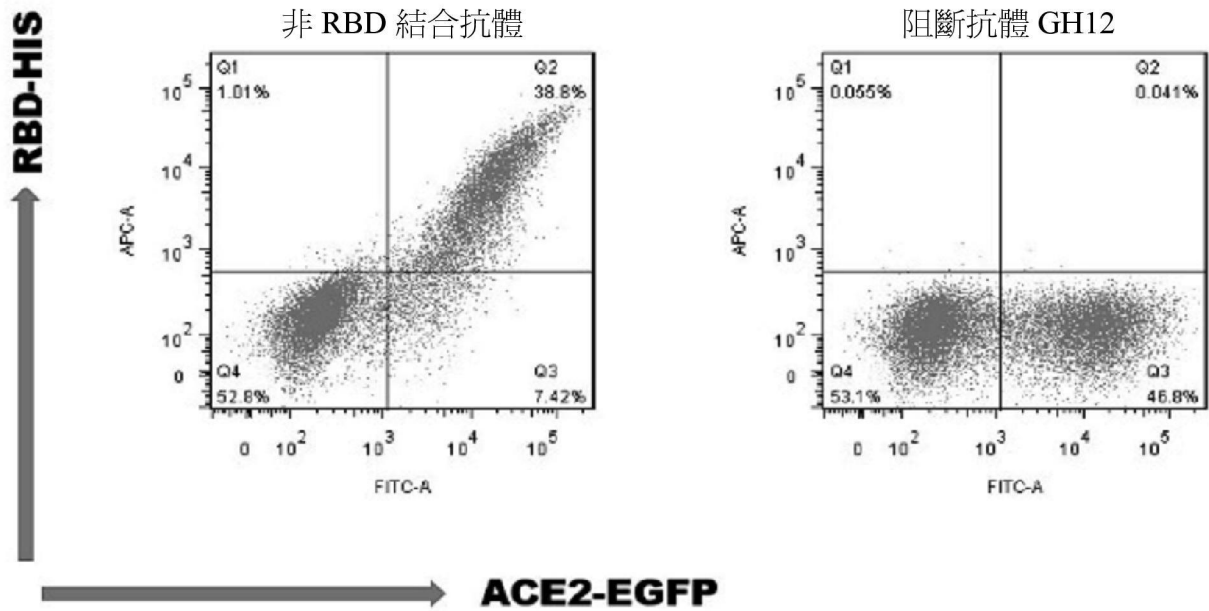
【圖 3a】



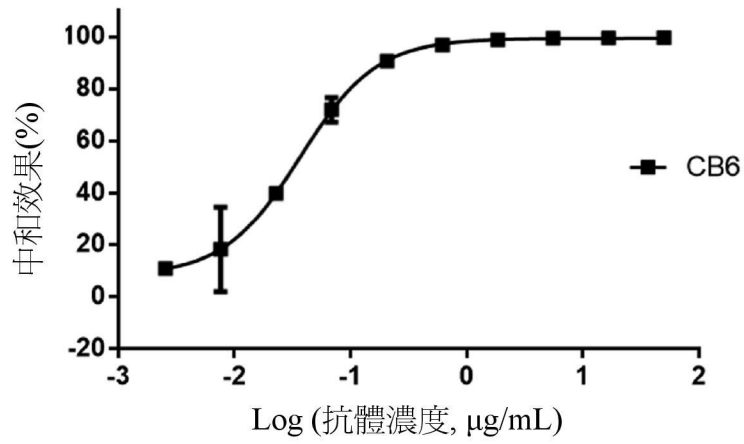
【圖 3b】



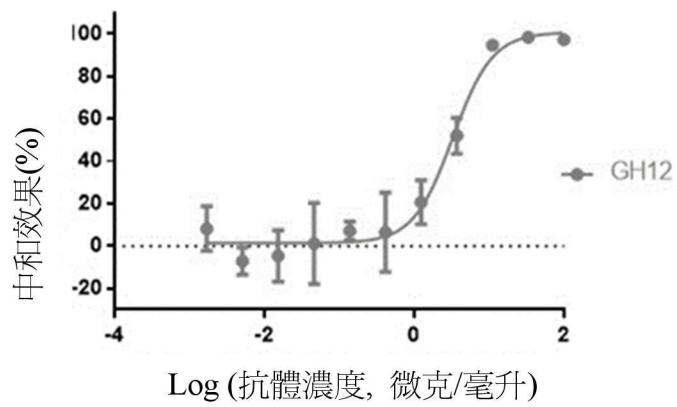
【圖 4a】



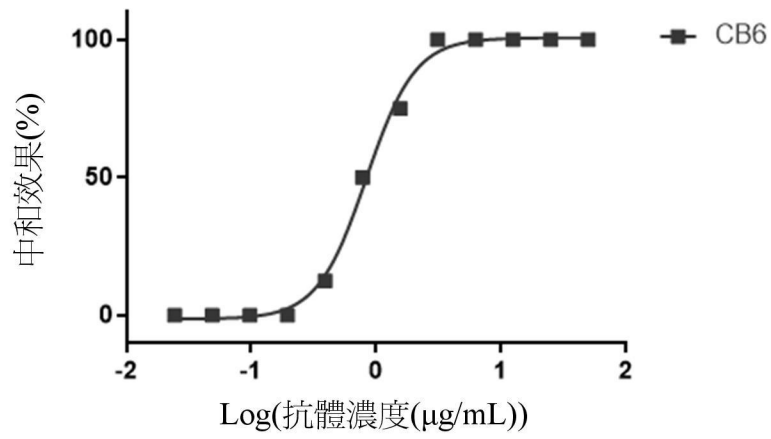
【圖 4b】



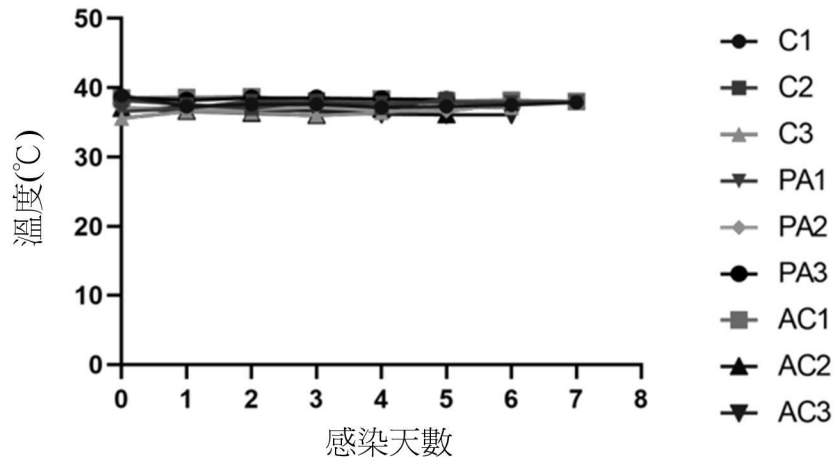
【圖 5a】



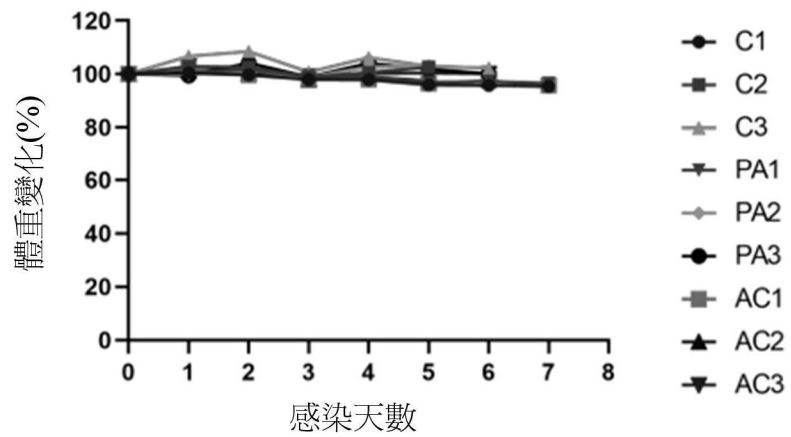
【圖 5b】



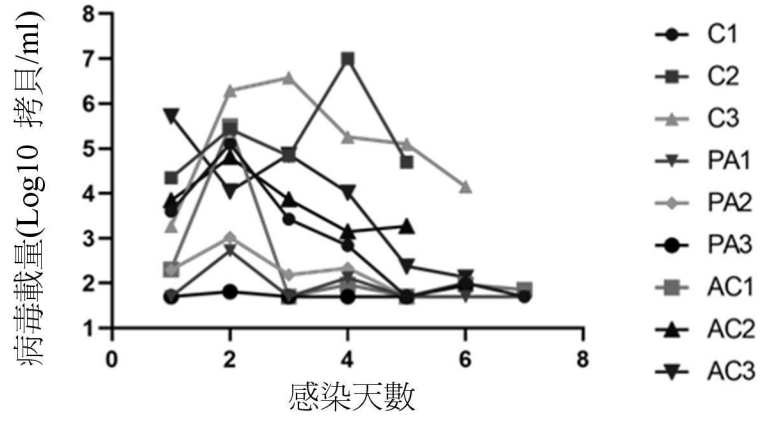
【圖 6】



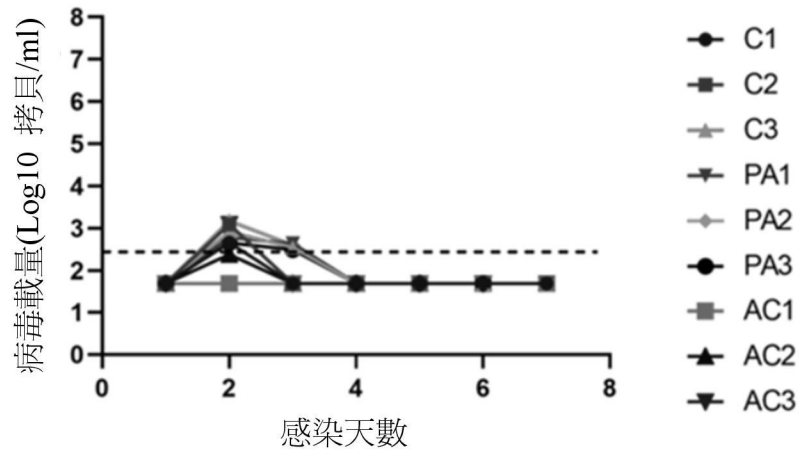
【圖 7a】



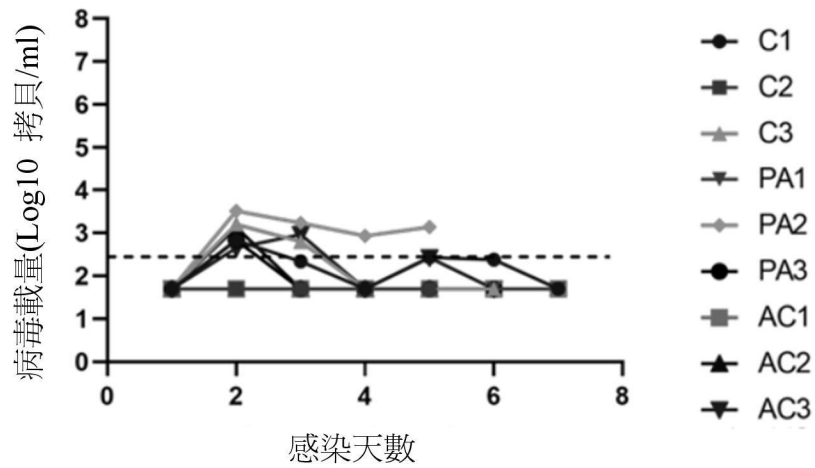
【圖 7b】



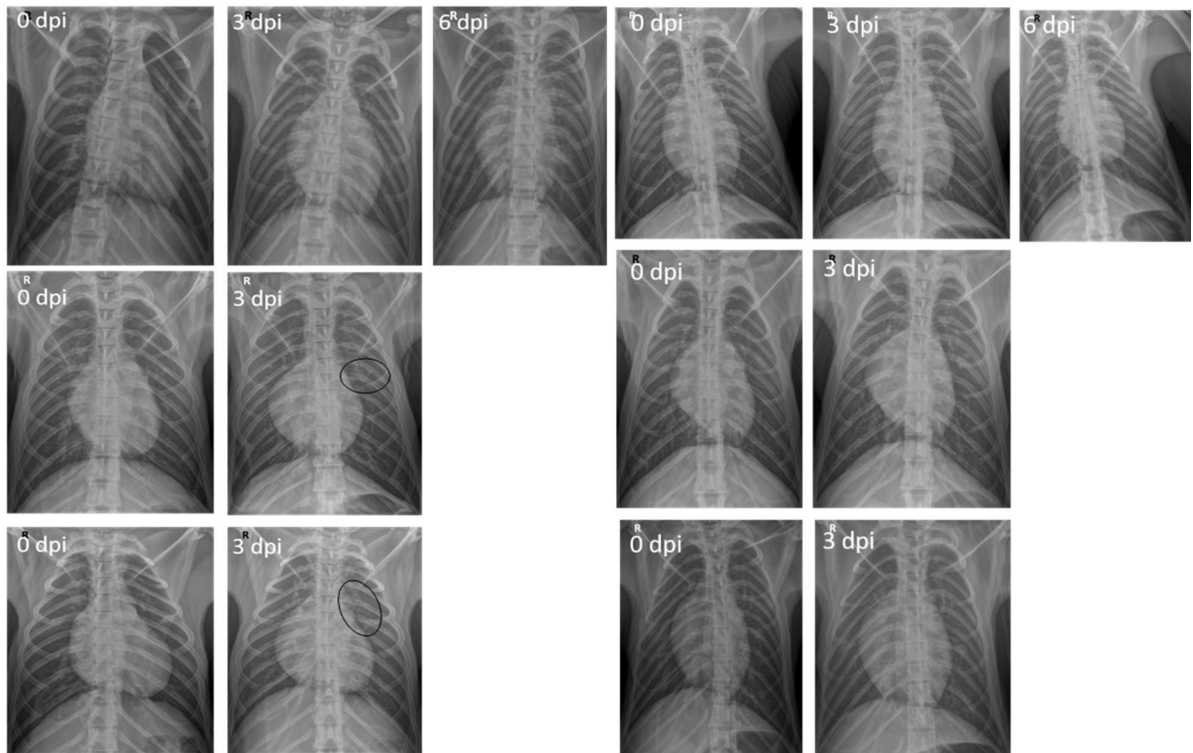
【圖 8a】



【圖 8b】

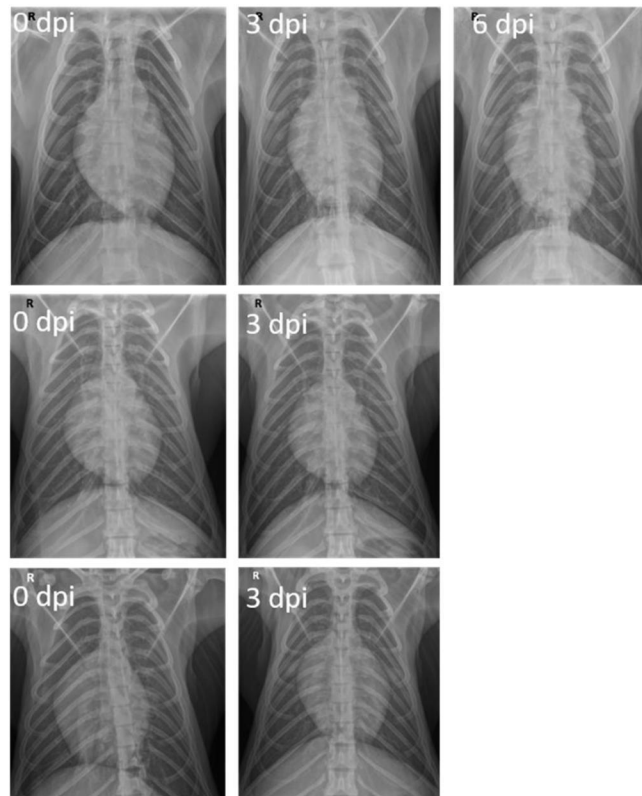


【圖 8c】

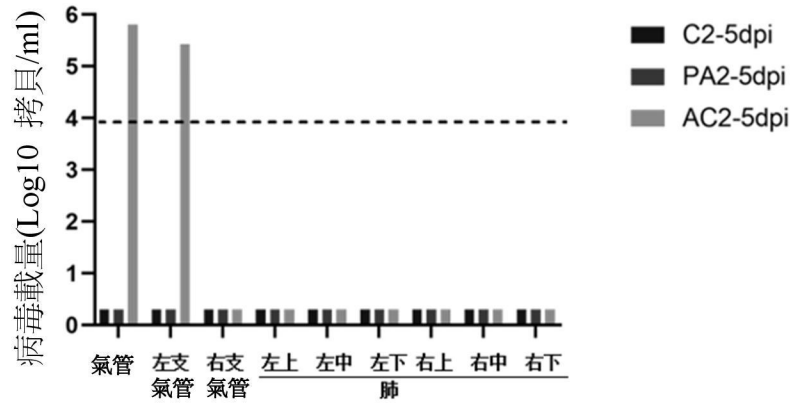


【圖 9a】

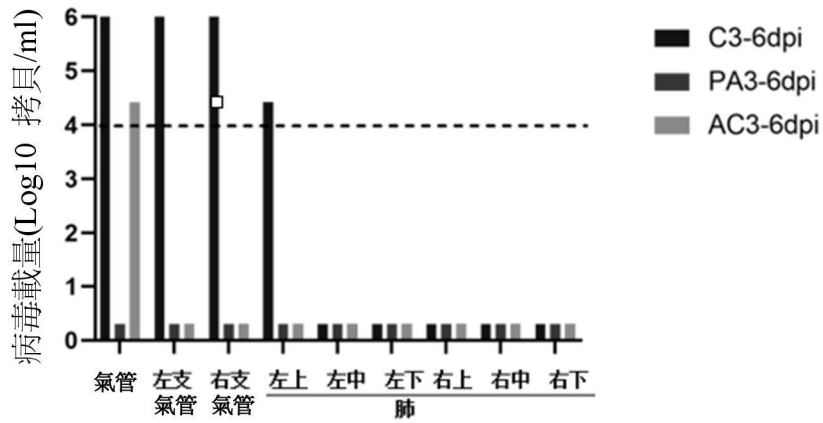
【圖 9b】



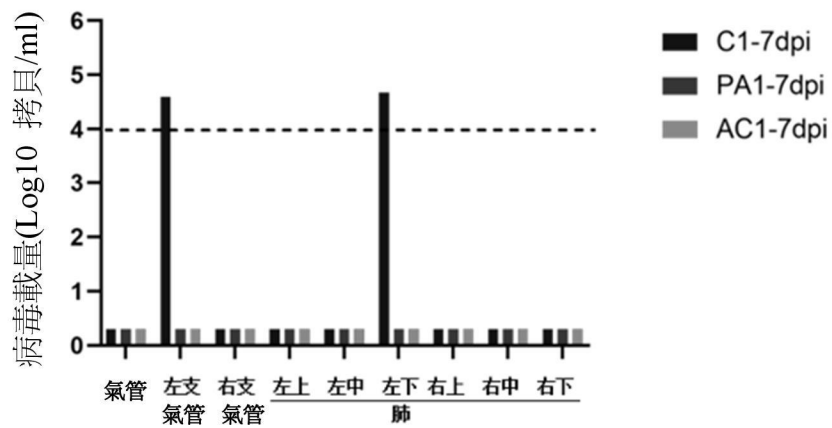
【圖 9c】



【圖 10a】



【圖 10b】



【圖 10c】