



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113766928 B

(45) 授权公告日 2024.10.25

(21) 申请号 202080005771.3

(72) 发明人 R·芭布 A·鲍姆 G·陈

(22) 申请日 2020.06.25

C·格尔森 J·汉森 T·黄

(65) 同一申请的已公布的文献号

C·基拉特索斯 W-Y·李

申请公布号 CN 113766928 A

M·马尔贝克 A·墨菲

(43) 申请公布日 2021.12.07

W·奥尔森 N·斯塔尔

G·D·扬科普洛斯

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

63/004,312 2020.04.02 US

11247

63/014,687 2020.04.23 US

专利代理人 陈迎春 黄革生

63/025,949 2020.05.15 US

(51) Int.CI.

63/034,865 2020.06.04 US

A61K 39/215 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/395 (2006.01)

2021.04.20

A61K 45/06 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 16/10 (2006.01)

PCT/US2020/039707 2020.06.25

(56) 对比文件

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 1914226 A, 2007.02.14

W02021/045836 EN 2021.03.11

US 2006240551 A1, 2006.10.26

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司

审查员 顾瑜尉

地址 美国纽约州

权利要求书2页 说明书129页  
序列表(电子公布) 附图16页

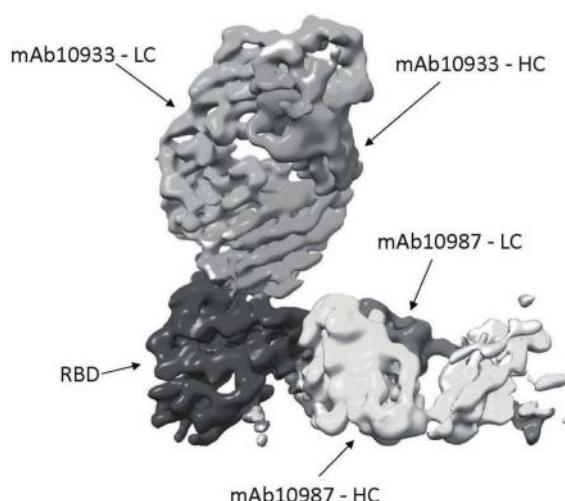
(54) 发明名称

抗SARS-CoV-2纤突糖蛋白抗体和抗原结合

片段

(57) 摘要

本公开提供了与冠状病毒纤突蛋白特异性结合的抗体和其抗原结合片段以及使用此类抗体和片段治疗或预防病毒感染(例如,冠状病毒感染)的方法。本公开提供了与SARS-CoV-2-S特异性结合的中和性人抗原结合蛋白,例如抗体或其抗原结合片段。



1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白,其中所述分离的抗体或抗原结合片段包括由SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列组成的重链可变区 (HCVR),以及由SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区 (LCVR)。
2. 根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括免疫球蛋白恒定区。
3. 根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括IgG1恒定区。
4. 根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括人IgG1恒定区。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括由SEQ ID NO:216中所示的氨基酸序列组成的重链。
6. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括由SEQ ID NO:218中所示的氨基酸序列组成的轻链。
7. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段:
  - (a) 是多特异性的;和/或
  - (b) 是重组抗体或抗原结合片段。
8. 一种药物组合物,其包括:
  - i) 根据权利要求1-7中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,以及
  - ii) 药学上可接受的载体或稀释剂。
9. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白,其中所述分离的抗体或抗原结合片段包括由SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列组成的重链可变区 (HCVR),以及由SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列组成的轻链可变区 (LCVR)。
10. 根据权利要求9所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括免疫球蛋白恒定区。
11. 根据权利要求9所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括IgG1恒定区。
12. 根据权利要求9所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括人IgG1恒定区。
13. 根据权利要求9-12中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括由SEQ ID NO:654中所示的氨基酸序列组成的重链。
14. 根据权利要求9-12中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括由SEQ ID NO:656中所示的氨基酸序列组成的轻链。
15. 根据权利要求9-12中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段:
  - (a) 是多特异性的;和/或
  - (b) 是重组抗体或抗原结合片段。
16. 一种药物组合物,其包括:
  - i) 根据权利要求9-15中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,以及
  - ii) 药学上可接受的载体或稀释剂。
17. 一种编码权利要求1所述的抗体或抗原结合片段的HCVR和LCVR的多核苷酸。
18. 权利要求17的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:201所示的HCVR核酸序列。

19. 权利要求17的多核苷酸,其中所述抗体还包含免疫球蛋白恒定区。
20. 权利要求19的多核苷酸,其中所述免疫球蛋白恒定区是IgG1恒定区。
21. 权利要求17的多核苷酸,其中所述抗体包含SEQ ID NO:216中所列的重链氨基酸序列。
22. 权利要求17的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:215所示的重链核酸序列。
23. 权利要求17的多核苷酸,其中所述多核苷酸是RNA多核苷酸。
24. 包含权利要求17的多核苷酸的载体或脂质纳米颗粒。
25. 权利要求24的载体,其中所述载体是慢病毒载体或腺相关病毒载体。
26. 分离的宿主细胞,其包含权利要求17-23中任一项所述的多核苷酸。
27. 分离的宿主细胞,其包含权利要求24或25所述的载体。
28. 分离的宿主细胞,其包含编码结合SARS-CoV-2纤突蛋白的抗体或其抗原结合片段的重链可变区 (HCVR) 的第一多核苷酸,以及编码结合SARS-CoV-2纤突蛋白的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区 (LCVR) 的第二多核苷酸,其中所述HCVR由SEQ ID NO:202所示氨基酸序列组成,其中所述LCVR由SEQ ID NO:210中列出的氨基酸序列组成。
29. 权利要求28的分离的宿主细胞,其中所述第一多核苷酸编码SEQ ID NO:216中列出的重链氨基酸序列,并且其中所述第二多核苷酸编码SEQ ID NO:218中列出的轻链氨基酸序列。
30. 一种编码权利要求9的抗体或其抗原结合片段的HCVR和LCVR的多核苷酸。
31. 权利要求30的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:639中所列的HCVR核酸序列。
32. 权利要求30的多核苷酸,其中所述抗体还包含免疫球蛋白恒定区。
33. 权利要求32的多核苷酸,其中所述免疫球蛋白恒定区是IgG1恒定区。
34. 权利要求30的多核苷酸,其中所述抗体包含SEQ ID NO:654中所列的重链氨基酸序列。
35. 权利要求30的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:653中列出的重链核酸序列。
36. 权利要求30的多核苷酸,其中所述多核苷酸是RNA多核苷酸。
37. 包含权利要求30的多核苷酸的载体或脂质纳米颗粒。
38. 权利要求37的载体,其中所述载体是慢病毒载体或腺相关病毒载体。
39. 分离的宿主细胞,其包含权利要求30-36中任一项所述的多核苷酸。
40. 分离的宿主细胞,其包含权利要求37或38所述的载体。
41. 一种分离的宿主细胞,其包含第一多核苷酸和第二多核苷酸,其中所述第一多核苷酸编码结合SARS-CoV-2纤突蛋白的抗体或其抗原结合片段的重链可变区 (HCVR) ,所述第二多核苷酸编码结合SARS-CoV-2纤突蛋白的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区 (LCVR) ,所述HCVR由SEQ ID NO:640中列出的氨基酸序列组成,所述LCVR由SEQ ID NO:646中列出的氨基酸序列组成。
42. 权利要求41的分离的宿主细胞,其中所述第一多核苷酸编码由SEQ ID NO:654所示氨基酸序列的重链,所述第二多核苷酸编码由SEQ ID NO:656所示氨基酸序列的轻链。

## 抗SARS-CoV-2纤突糖蛋白抗体和抗原结合片段

### [0001] 序列表

[0002] 序列表的正式文本作为ASCII格式的序列表通过EFS-Web以电子方式与本说明书同时提交,文件名为“10753W001-Sequence.txt”,创建于2020年6月25日并且大小为922,462字节。此ASCII格式文件中含有的序列表是本说明书的一部分,并且通过全文引用的方式并入本文中。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及与冠状病毒纤突蛋白特异性结合的抗体和抗原结合片段以及用于用所述抗体和片段治疗或预防冠状病毒感染的方法。

### 背景技术

[0004] 新鉴定的病毒(如冠状病毒)因其没有被充分表征而可能难以治疗。这些新鉴定的病毒的出现突出了对开发新型抗病毒策略的需要。严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)是引起严重急性呼吸疾病COVID-19的新出现的冠状病毒。截止2020年3月20日,世界卫生组织(World Health Organization)已经报告在168个国家、地区或区域中有209,839例确诊病例,导致8,778例死亡。COVID-19的临床特征包含发烧、干咳和疲劳,并且疾病可能会导致呼吸衰竭,从而导致死亡。

[0005] 迄今为止,还没有用于预防或治疗SARS-CoV-2感染的疫苗或治疗剂。鉴于对人类健康的持续威胁,迫切需要用于SARS-CoV-2控制的预防性和治疗性抗病毒疗法。因为这种病毒使用其纤突糖蛋白与细胞受体ACE2和丝氨酸蛋白酶TMPRSS2相互作用以进入靶细胞中,所以这种纤突蛋白表示抗体治疗的有吸引力的靶标。具体地,以高亲和力与SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)特异性结合并抑制病毒感染性的完全人抗体在预防和治疗COVID-19中可能是重要的。

### 发明内容

[0006] 需要中和治疗性抗SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)抗体和其用于治疗或预防病毒感染的用途。本公开部分地通过提供人抗SARS-CoV-2-S抗体(如表1的抗体)和其组合(包含例如与其它治疗剂(例如,抗炎剂、抗疟疾剂、抗病毒剂或其它抗体或抗原结合片段)的组合)和使用其以治疗病毒感染的方法来解决这个需要。

[0007] 本公开提供了与SARS-CoV-2-S特异性结合的中和性人抗原结合蛋白,例如抗体或其抗原结合片段。

[0008] 一方面,本公开提供了一种分离的重组抗体或其抗原结合片段,其与冠状病毒纤突蛋白(CoV-S)特异性结合,其中所述抗体具有以下特性中的一个或多个:(a)与EC<sub>50</sub>小于约10<sup>-9</sup>M的CoV-S结合;(b)证实在施用于冠状病毒感染的动物之后,所述冠状病毒感染的动物的存活率与没有进行所述施用的相当的冠状病毒感染的动物相比有所增加;和/或(c)包括包含与表1的HCVR具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内含有的

三个重链互补决定区 (CDR) (CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)；以及包含与表1的LCVR具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 内含有的三个轻链CDR (CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)。

[0009] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段包括: (a) 免疫球蛋白重链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包括表1的抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3; 和/或 (b) 免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白轻链可变区包括表1的抗体的所述CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0010] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段包括: (a) 重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包括与表1的HCVR序列具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列; 和/或 (b) 轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包括与表1的LCVR序列具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段包括表1的单抗体的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段包括免疫球蛋白,所述免疫球蛋白包括表1的单抗体的HCVR和LCVR。

[0012] 一方面,本公开提供了一种抗原结合蛋白,其与上文或本文所讨论的抗体或抗原结合片段中的任何抗体或抗原结合片段竞争与CoV-S结合。

[0013] 一方面,本公开提供了一种抗原结合蛋白,其与和CoV-S相同的表位或与所述CoV-S上的重叠表位结合作为上文或本文所讨论的任何抗体或抗原结合片段。

[0014] 在各个实施例中的任何实施例中,所述抗体或抗原结合片段可以是多特异性的。

[0015] 在各个实施例中的任何实施例中,所述抗体或抗原结合片段可以包括以下性质中的一个或多个:a) 抑制冠状病毒生长;b) 与冠状病毒的表面结合;c) 限制细胞的冠状病毒感染在体外传播;以及d) 保护被工程化成表达人ACE2或TMPRSS2蛋白的小鼠免于冠状病毒感染所引起的死亡和/或体重减轻。

[0016] 在各个实施例中的任何实施例中,CoV-S是SARS-CoV-2-S。

[0017] 在一方面,本公开提供了一种包括如上文或本文所讨论的抗体或抗原结合片段的复合物,所述复合物与CoV-S多肽结合。在一些实施例中,所述CoV-S是SARS-CoV-2-S。

[0018] 一方面,本公开提供了一种用于制备如上文或本文所讨论的抗体或抗原结合片段的方法,所述方法包括: (a) 将对所述抗体或抗原结合片段进行编码的一个或多个多核苷酸引入到宿主细胞中; (b) 在有利于表达所述一个或多个多核苷酸的条件下培养所述宿主细胞; 以及 (c) 任选地从所述宿主细胞和/或所述宿主细胞生长于的培养基中分离所述抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

[0019] 在一方面,本公开提供了一种抗体或抗原结合片段,其是上文所讨论的方法的产物。

[0020] 一方面,本公开提供了一种多肽,其包括: (a) 包括表1中所示的HCVR氨基酸序列的抗体或抗原结合片段的HCVR结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3; 或 (b) 包括表1中所示的LCVR氨基酸序列的免疫球蛋白链的LCVR结构域的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0021] 一方面,本公开提供了一种多核苷酸,其对上文所讨论的多肽进行编码。

[0022] 一方面,本公开提供了一种载体,其包括上文所讨论的多核苷酸。

[0023] 一方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包括如上文或本文所讨论的抗体或抗原结合片段或多肽或多核苷酸或载体。

[0024] 一方面,本公开提供了一种组合物或试剂盒,其包括上文或本文所讨论的抗体或抗原结合片段与另外的治疗剂的组合。

[0025] 一方面,本公开提供了一种药物组合物,其包括上文或本文所讨论的抗原结合蛋白、抗体或抗原结合片段和药学上可接受的载体以及任选地另外的治疗剂。在一些实施例中,所述另外的治疗剂是抗病毒药或疫苗。在一些实施例中,所述另外的治疗剂选自由以下组成的组:抗炎剂、抗疟疾剂、特异性结合TMPRSS2的抗体或其抗原结合片段以及与CoV-S特异性结合的抗体或抗原结合片段。在一些情况下,所述抗疟疾剂是氯喹或羟化氯喹。在一些情况下,所述抗炎剂是抗体,如萨瑞鲁单抗(sarilumab)、托珠单抗(tocilizumab)或吉西鲁单抗(gimsilumab)。在一些实施例中,所述另外的治疗剂是包括表1的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的第二抗体或抗原结合片段。

[0026] 在一方面,本公开提供了一种器皿或注射装置,其包括如上文或本文所讨论的抗原结合蛋白、抗体或抗原结合片段或组合物。

[0027] 一方面,本公开提供了一种用于治疗或预防有需要的受试者的冠状病毒感染的方法,所述方法包括施用治疗有效量的如上文或本文所讨论的抗原结合蛋白、抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,所述冠状病毒选自由SARS-CoV-2、SARS-CoV和MERS-CoV组成的组。

[0028] 在用于治疗或预防冠状病毒感染的方法的一些实施例中,向所述受试者施用一种或多种另外的治疗剂。在一些情况下,所述一种或多种另外的治疗剂是抗病毒药或疫苗。在一些情况下,所述一种或多种另外的治疗剂选自由以下组成的组:抗炎剂、抗疟疾剂、特异性结合TMPRSS2的抗体或其抗原结合片段以及与CoV-S特异性结合的抗体或抗原结合片段。在一些情况下,所述抗疟疾剂是氯喹或羟化氯喹。在一些情况下,所述抗炎剂是抗体,例如萨瑞鲁单抗、托珠单抗或吉西鲁单抗。在一些实施例中,所述另外的治疗剂是包括表1的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的第二抗体或抗原结合片段。用于在本公开的方法的背景下使用的可以单独或彼此组合或与本文所公开的抗体中的一个或多个抗体组合使用的其它抗体包含例如LY-CoV555(礼来公司(Eli Lilly)) ;47D11(Wang等人《自然通讯(Nature Communications)》文章编号:2251) ;B38、H4、B5和/或H2(Wu等人,10.1126/《科学(science).abc2241(2020)) ;STI-1499(索伦托医疗公司(Sorrento Therapeutics)) ;VIR-7831和VIR-7832(病毒生物医疗公司(Vir Biotherapeutics))。

[0029] 一方面,本公开提供了一种向受试者体内施用上文或本文所讨论的抗体或抗原结合片段的方法,所述方法包括将所述抗体或抗原结合片段注射到所述受试者体内。在一些实施例中,所述抗体或抗原结合片段皮下、静脉内或肌内注射到所述受试者体内。

[0030] 在上文或本文所讨论的各个实施例中的任何实施例中,所述抗体或抗原结合片段包括VH3-66或Vκ1-33可变结构域序列。

[0031] 一方面,本公开提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白,其中所述分离的抗体或抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内含有的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3)以及包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内含有的三个轻链互补决定区(CDR)(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0032] 在一些实施例中,所述HCDR1包括SEQ ID NO:204中所示的氨基酸序列,所述HCDR2

包括SEQ ID NO:206中所示的氨基酸序列,所述HCDR3包括SEQ ID NO:208中所示的氨基酸序列,所述LCDR1包括SEQ ID NO:212中所示的氨基酸序列,所述LCDR2包括SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列,并且所述LCDR3包括SEQ ID NO:214中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包括HCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包括LCVR,所述LCVR包括SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包括HCVR和LCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列,所述LCVR包括SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列。

[0033] 一方面,本公开提供了一种分离的抗体,其结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白,其中所述分离的抗体包括免疫球蛋白恒定区、包含SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内含有的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3)以及包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内含有的三个轻链互补决定区(CDR)(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0034] 在一些实施例中,所述HCDR1包括SEQ ID NO:204中所示的氨基酸序列,所述HCDR2包括SEQ ID NO:206中所示的氨基酸序列,所述HCDR3包括SEQ ID NO:208中所示的氨基酸序列,所述LCDR1包括SEQ ID NO:212中所示的氨基酸序列,所述LCDR2包括SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列,并且所述LCDR3包括SEQ ID NO:214中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体包括HCVR和LCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列,所述LCVR包括SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体包括:重链和轻链,所述重链包括SEQ ID NO:216中所示的氨基酸序列,所述轻链包括SEQ ID NO:218中所示的氨基酸序列。在一些情况下,所述免疫球蛋白恒定区是IgG1恒定区。在一些情况下,所述分离的抗体是重组抗体。在一些情况下,所述分离的抗体是多特异性的。

[0035] 一方面,本公开提供了一种药物组合物,其包括如上文或本文所讨论的分离的抗体和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0036] 在一些实施例中,所述药物组合物进一步包括第二治疗剂。在一些情况下,所述第二治疗剂选自由以下组成的组:结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白的第二抗体或其抗原结合片段、抗炎剂、抗疟疾剂以及结合TMPRSS2的抗体或其抗原结合片段。

[0037] 在一些实施例中,所述第二治疗剂是结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白的第二抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,所述第二抗体或其抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列的HCVR内含有的三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3)以及包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列的LCVR内含有的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些情况下,所述第二抗体或其抗原结合片段包括:HCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:642中所示的氨基酸序列;HCDR2,所述HCDR2包括SEQ ID NO:499中所示的氨基酸序列;HCDR3,所述HCDR3包括SEQ ID NO:644中所示的氨基酸序列;LCDR1,所述LCDR1包括SEQ ID NO:648中所示的氨基酸序列;LCDR2,所述LCDR2包括SEQ ID NO:650中所示的氨基酸序列;以及LCDR3,所述LCDR3包括SEQ ID NO:652中所示的氨基酸序列。在一些情况下,所述第二抗体或其抗原结合片段包括HCVR和LCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列,所述LCVR包括SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列。

在一些情况下,所述第二抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链,所述重链包括SEQ ID NO:654中所示的氨基酸序列,所述轻链包括SEQ ID NO:656中所示的氨基酸序列。

[0038] 一方面,本公开提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白,其中所述分离的抗体或抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内含有的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3)以及包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内含有的三个轻链互补决定区(CDR)(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0039] 在一些实施例中,所述HCDR1包括SEQ ID NO:642中所示的氨基酸序列,所述HCDR2包括SEQ ID NO:499中所示的氨基酸序列,所述HCDR3包括SEQ ID NO:644中所示的氨基酸序列,所述LCDR1包括SEQ ID NO:648中所示的氨基酸序列,所述LCDR2包括SEQ ID NO:650中所示的氨基酸序列,并且所述LCDR3包括SEQ ID NO:652中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包括HCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包括LCVR,所述LCVR包括SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包括HCVR和LCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列,所述LCVR包括SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列。

[0040] 一方面,本公开提供了一种分离的抗体,其结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白,其中所述分离的抗体包括免疫球蛋白恒定区、包含SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内含有的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3)以及包含SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内含有的三个轻链互补决定区(CDR)(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0041] 在一些实施例中,所述HCDR1包括SEQ ID NO:642中所示的氨基酸序列,所述HCDR2包括SEQ ID NO:499中所示的氨基酸序列,所述HCDR3包括SEQ ID NO:644中所示的氨基酸序列,所述LCDR1包括SEQ ID NO:648中所示的氨基酸序列,所述LCDR2包括SEQ ID NO:650中所示的氨基酸序列,并且所述LCDR3包括SEQ ID NO:652中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体包括HCVR和LCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:640中所示的氨基酸序列,所述LCVR包括SEQ ID NO:646中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述分离的抗体包括:重链和轻链,所述重链包括SEQ ID NO:654中所示的氨基酸序列,所述轻链包括SEQ ID NO:656中所示的氨基酸序列。在一些情况下,所述免疫球蛋白恒定区是IgG1恒定区。在一些情况下,所述分离的抗体是重组抗体。在一些情况下,所述分离的抗体是多特异性的。

[0042] 一方面,本公开提供了一种药物组合物,其包括如上文或本文所讨论的分离的抗体和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0043] 在一些实施例中,所述药物组合物进一步包括第二治疗剂。在一些情况下,所述第二治疗剂选自由以下组成的组:结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白的第二抗体或其抗原结合片段、抗炎剂、抗疟疾剂以及结合TMPRSS2的抗体或其抗原结合片段。

[0044] 在一些实施例中,所述第二治疗剂是结合包括SEQ ID NO:832中所示的氨基酸序列的SARS-CoV-2纤突蛋白的第二抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,所述第二抗体或其抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列的HCVR内含有的三个重链

CDR (HCDR1、HCDR2和HCDR3) 以及包含SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列的LCVR内含有的三个轻链CDR (LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些情况下,所述第二抗体或其抗原结合片段包括:HCDR1,所述HCDR1包括SEQ ID NO:204中所示的氨基酸序列;HCDR2,所述HCDR2包括SEQ ID NO:206中所示的氨基酸序列;HCDR3,所述HCDR3包括SEQ ID NO:208中所示的氨基酸序列;LCDR1,所述LCDR1包括SEQ ID NO:212中所示的氨基酸序列;LCDR2,所述LCDR2包括SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列;以及LCDR3,所述LCDR3包括SEQ ID NO:214中所示的氨基酸序列。在一些情况下,所述第二抗体或其抗原结合片段包括HCVR和LCVR,所述HCVR包括SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列,所述LCVR包括SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列。在一些情况下,所述第二抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链,所述重链包括SEQ ID NO:216中所示的氨基酸序列,所述轻链包括SEQ ID NO:218中所示的氨基酸序列。

[0045] 在各个实施例中,上文或本文所讨论的实施例的特征或组分中的任何特征或组分可以组合,并且此类组合涵盖在本公开的范围内。上文或本文所讨论的任何特定值可以与上文或本文所讨论的另一个相关值组合以列举具有表示范围的上端和下端的值的范围,并且此类范围涵盖在本公开的范围内。

## 附图说明

[0046] 图1示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0047] 图2示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0048] 图3示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0049] 图4示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0050] 图5示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0051] 图6示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0052] 图7示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0053] 图8示出了防止纤突蛋白与其受体ACE2结合的针对SARS-CoV-2纤突蛋白的所选择的抗SARS-CoV-2-S抗体的ELISA阻断数据。

[0054] 图9A和图9B显示了 VelocImmune® 小鼠 (图9A; N=185) 和恢复期人供体 (图9B; N=68) 的针对SARS-CoV-2的分离的中和抗体的成对的重链 (X轴) 和轻链 (Y轴) 的V基因频率。圆圈的阴影和大小对应于分离的中和抗体的受体中存在的重链和轻链对的数量。在VSV假颗粒中和测定中,中和被定义为在抗体的稀释度为1:4 (~ 2μg/ml) 的情况下>70%。

[0055] 图10A和图10B显示了中和效力。图10A显示了抗SARS-CoV-2纤突mAb的中和效力。将抗纤突mAb、IgG1同种型对照和重组二聚ACE2 (hACE2 . hFc) 的连续稀释液与pVSV-SARS-CoV-2-S-mNeon一起添加到Vero细胞,并在感染后24小时以病毒感染性的读数对mNeon表达

进行测量。将数据绘制为仅相对于病毒感染对照中和的百分比。图10B显示了单独的抗纤突mAb和针对VeroE6细胞中的SARS-CoV-2-S病毒的mAb的组合的中和效力。

[0056] 图11显示了根据针对不同的抗SARS-CoV-2mAb的预混合结合测定的矩阵进行的表位箱(bin)分析。针对如所描述的九个抗SARS-CoV-2mAb进行表位分箱(binning)。每个图有三个阶段(I、II和III)。在阶段I中,将抗SARS-CoV-2mAb(20ug/ml)装载到抗人Fc探针。在阶段II中,人IgG1阻断mAb溶液(100ug/ml)。在阶段III中,每个600nM抗SARS-CoV-2mAb结合位点的100nM SARS-CoV-2RBD-MMH预混合复合物的溶液流动经过mAb捕获探针。

[0057] 图12显示了纤突蛋白RBD结构域的结构的3D表面模型,其示出了ACE2界面和HDX-MS表位映射结果。用表示如通过HDX-MS实验测定的保护程度的阴影来指示受抗SARS-CoV2纤突抗体保护的RBD残基。根据PDB 6M17重现RBD结构。

[0058] 图13A和图13B显示了mAb10933和mAb10987与SARS-CoV-2RBD的复合物。图13A显示了mAb10933+RBD+mAb10987复合物的3.9 Å cryoEM图,根据图13B的细化模型中的链对其进行阴影描绘。鉴定了RBD、mAb10933重链和轻链以及mAb10987重链和轻链。

[0059] 图14显示了cryoEM数据统计。报告了针对图13A和图13B中所示出的mAb10987+mAb10933+SARS-CoV-2RBD复合物结构的数据收集和细化统计。

## 具体实施方式

[0060] 在描述本发明方法之前,应当理解本发明不限于所描述的具体方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应理解,本文所使用的术语仅出于描述具体实施例的目的,而不旨在是限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求限制。

[0061] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语和科学术语均具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管在本发明的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本文所提到的所有出版物均通过全文引用的方式并入本文中。

[0062] 术语“冠状病毒”或“CoV”是指冠状病毒家族的任何病毒,包含但不限于SARS-CoV-2、MERS-CoV和SARS-CoV。SARS-CoV-2是指被鉴定为新出现的冠状病毒。SARS-CoV-2也被称为2019-nCoV。其通过病毒纤突蛋白与人宿主细胞受体血管紧张素转换酶2(ACE2)结合。纤突蛋白还与活化纤突蛋白以对病毒进行膜融合的TMPRSS2结合并由其切割。

[0063] 术语“CoV-S”(也被称为“S”或“S蛋白”)是指冠状病毒的纤突蛋白,并且可以是指特异性S蛋白,如SARS-CoV-2-S、MERS-CoV S和SARS-CoV S。SARS-CoV-2纤突蛋白是组装成构成包膜冠状病毒颗粒的表面上的纤突或膜粒的三聚体的1273氨基酸类型I膜糖蛋白。蛋白质具有归因于S蛋白的N端(S1)部分和C端(S2)部分的两个重要功能:宿主受体结合和膜融合。CoV-S通过S1亚基中存在的受体结合结构域(RBD)与其同源受体结合。全长SARS-CoV-2纤突蛋白的氨基酸序列通过SEQ ID NO:832中提供的氨基酸序列来例示。术语“CoV-S”包含从不同的CoV分离物分离的CoV纤突蛋白的蛋白质变体以及重组CoV纤突蛋白或其片段。所述术语还涵盖与例如组氨酸标签、小鼠或人Fc或单个序列(ROR1)偶联的CoV纤突蛋白或其片段。

[0064] 如本文所使用的,术语“冠状病毒感染”或“CoV感染”是指感染冠状病毒,如SARS-CoV-2、MERS-CoV或SARS-CoV。所述术语包含通常在下呼吸道中的冠状病毒呼吸道感染。症

状可以包含高烧、干咳、呼吸短促、肺炎、胃肠道症状(如腹泻)、器官衰竭(肾衰竭和肾功能障碍)、脓毒性休克和严重病例的死亡。

[0065] 病毒

[0066] 本发明包含用于治疗或预防受试者的病毒感染的方法。术语“病毒”包含其在受试者体内的感染可通过施用抗CoV-S抗体或其抗原结合片段来治疗或预防的任何病毒(例如,其中病毒的感染性至少部分地依赖于CoV-S)。在本发明的实施例中,“病毒”是表达纤突蛋白(例如,CoV-S)的任何病毒。术语“病毒”还包含CoV-S依赖性呼吸道病毒,其是使受试者的呼吸组织(例如,上和/或下呼吸道、气管、细支气管、肺)感染并且可通过施用抗CoV-S抗体或其抗原结合片段治疗或预防的病毒。例如,在本发明的实施例中,病毒包含冠状病毒、SARS-CoV-2(严重急性呼吸综合征冠状病毒2)、SARS-CoV(严重急性呼吸综合征冠状病毒)和MERS-CoV(中东呼吸综合征(MERS)冠状病毒)。冠状病毒可以包含 $\alpha$ 冠状病毒、 $\beta$ 冠状病毒、 $\gamma$ 冠状病毒和 $\delta$ 冠状病毒的属。在一些实施例中,本文所提供的抗体或抗原结合片段可以与 $\alpha$ 冠状病毒、 $\beta$ 冠状病毒、 $\gamma$ 冠状病毒和/或 $\delta$ 冠状病毒结合和/或中和所述 $\alpha$ 冠状病毒、所述 $\beta$ 冠状病毒、所述 $\gamma$ 冠状病毒和/或所述 $\delta$ 冠状病毒。在某些实施例中,这种结合和/或中和可以对特定冠状病毒属或对属的特定亚群具有特异性。“病毒感染”是指病毒在受试者体内的侵袭和繁殖。

[0067] 冠状病毒是球形的,其直径为大约125nm。冠状病毒最显著的特征是从病毒体的表面产生的棒状纤突突出。这些纤突是病毒体的定义性特征并且给予其日冕的外观,这促使其具有冠状病毒这一名称。在病毒体的包膜内的是核衣壳。冠状病毒具有螺旋对称的核衣壳,这在正义RNA病毒之间是不常见的,但对于负义RNA病毒而言是更加常见的。SARS-CoV-2、MERS-CoV和SARS-CoV属于冠状病毒家族。病毒体到宿主细胞的初始附着是通过S蛋白与其受体之间的相互作用而引发的。受体结合结构域(RBD)在冠状病毒S蛋白的S1区内的位点取决于病毒而变化,其中一些病毒的RBD在S1的C端处。S蛋白/受体相互作用是冠状病毒使宿主物种感染的主要决定因素并且还控制病毒的组织向性。许多冠状病毒将胰酶用作其细胞受体。受体结合后,病毒接下来必须获得进入宿主细胞细胞质的途径。这通常通过组织蛋白酶、TMPRSS2或另一种蛋白酶对S蛋白进行酸依赖性蛋白切割、然后将病毒和细胞膜融合来完成。

[0068] 抗CoV-S抗体和抗原结合片段

[0069] 本发明提供了与CoV纤突蛋白或其抗原片段特异性结合的抗原结合蛋白,如抗体和其抗原结合片段。

[0070] 如本文所使用的,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,其包括四个多肽链、通过二硫键(即,“全抗体分子”)互连的两个重链(HC)和两个轻链(LC)及其多聚体(例如,IgM)。示例性抗体包含例如表1中所列的抗体。每个重链包括重链可变区(“HCVR”或“ $V_H$ ”)和重链恒定区(包含结构域 $C_H1$ 、 $C_H2$ 和 $C_H3$ )。每个轻链包含轻链可变区(“LCVR”或“ $V_L$ ”)和轻链恒定区( $C_L$ )。 $V_H$ 区和 $V_L$ 区可以被进一步细分成被称作互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着更保守的被称作构架区(FR)的区。每个 $V_H$ 和 $V_L$ 包括从氨基端到羧基端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链CDR也可以被称作HCDR或CDR-H,并且如上文所描述的进行编号(例如,HCDR1、HCDR2和HCDR3或CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)。同样,轻链CDR可以被称作LCDR或CDR-L,并编号LCDR1、LCDR2和LCDR3或CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在

本发明的某些实施例中,抗体(或其抗原结合片段)的FR与人种系序列相同,或者是天然或人工修饰的。示例性人种系序列包含但不限于VH3-66和V<sub>k</sub>1-33。因此,本公开提供了抗CoV-S抗体或其抗原结合片段(例如,抗SARS-CoV-2-S抗体或其抗原结合片段),其包括VH3-66或V<sub>k</sub>1-33可变重链或轻链区内的表1的HCDR和LCDR序列。本公开进一步提供了抗CoV-S抗体或其抗原结合片段(例如,抗SARS-CoV-2-S抗体或其抗原结合片段),其包括选自IgKV4-1、IgKV1-5、IgKV1-9、IgKV1-12、IgKV3-15、IgKV1-16、IgKV1-17、IgKV3-20、IgLV3-21、IgKV2-24、IgKV1-33、IgKV1-39、IgLV1-40、IgLV1-44、IgLV1-51、IgLV3-1、IgKV1-6、IgLV2-8、IgKV3-11、IgLV2-11、IgLV2-14、IgLV2-23或IgLV6-57的轻链和选自IgHV1-69、IgHV3-64、IgHV4-59、IgHV3-53、IgHV3-48、IgHV4-34、IgHV3-33、IgHV3-30、IgHV3-23、IgHV3-20、IgHV1-18、IgHV3-15、IgHV3-11、IgHV3-9、IgHV1-8、IgHV3-7、IgHV2-5、IgHV1-2、IgHV2-70、IgHV3-66、IgHV5-51、IgHV1-46、IgHV4-39、IgHV4-31、IgHV3-30-3、IgHV2-26或IgHV7-4-1的重链的组合内的表1的HCDR和LCDR序列。本公开进一步提供了抗CoV-S抗体或其抗原结合片段(例如,抗SARS-CoV-2-S抗体或其抗原结合片段),其包括选自IgKV4-1、IgKV1-5、IgKV1-9、IgKV1-12、IgKV3-15、IgKV1-16、IgKV1-17、IgKV3-20、IgLV3-21、IgKV2-24、IgKV1-33、IgKV1-39、IgLV1-40、IgLV1-44、IgLV1-51、IgLV3-1、IgKV1-6、IgLV2-8、IgKV3-11、IgLV2-11、IgLV2-14、IgLV2-23或IgLV6-57的轻链和选自IgHV1-69、IgHV3-64、IgHV4-59、IgHV3-53、IgHV3-48、IgHV4-34、IgHV3-33、IgHV3-30、IgHV3-23、IgHV3-20、IgHV1-18、IgHV3-15、IgHV3-11、IgHV3-9、IgHV1-8、IgHV3-7、IgHV2-5、IgHV1-2、IgHV2-70、IgHV3-66、IgHV5-51、IgHV1-46、IgHV4-39、IgHV4-31、IgHV3-30-3、IgHV2-26或IgHV7-4-1的重链的组合内的表1的HCVR和LCVR序列。

[0071] 通常,重免疫球蛋白链和轻免疫球蛋白链两者的可变结构域包括三个高变区(也称为互补决定区(CDR)),其位于相对保守的构架区(FR)内。通常,从N端到C端,轻链可变结构域和重链可变结构域两者包括FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。在本发明的实施例中,将氨基酸分配给每个结构域是根据以下文献中的定义进行的:《免疫学目的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,Kabat等人;国立卫生研究院(National Institutes of Health),贝塞斯达,马里兰州;第5版;NIH出版第91-3242号(1991);Kabat(1978)《先进蛋白质化学(Adv.Prot.Chem.)》,32:1-75;Kabat等人,(1977),《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》,252:6609-6616;Chothia等人,《分子生物学杂志(J Mol.Biol.)》(1987),196:901-917或Chothia等人,(1989),《自然》,342:878-883。

[0072] 本发明包含单克隆抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)以及包括多个分离的单克隆抗原结合蛋白的单克隆组合物。如本文所使用的,术语“单克隆抗体”是指基本上同质的抗体的群,即,除可以少量存在的可能的天然存在的突变之外,包括所述群的抗体分子的氨基酸序列相同。此类单克隆抗体和片段在组合物中的“多个”是指相同(即,如上文所讨论的,除可以少量存在的可能的天然存在的突变之外,氨基酸序列相同)的抗体和片段的浓度,所述浓度高于自然界中正常存在(例如,在如小鼠或人的宿主生物体的血液中)的浓度。

[0073] 在本发明的实施例中,抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)包括例如IgA型(例如,IgA1或IgA2)、IgD型、IgE型、IgG型(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)或IgM型的重链恒定结构域。在本发明的实施例中,抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)包括

例如κ型或λ型的轻链恒定结构域。

[0074] 如本文所使用的,术语“人”抗原结合蛋白(如抗体)包含具有衍生自人细胞中或移植到非人细胞(例如,小鼠细胞)中的人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。参见例如,US8502018、US6596541或US5789215。本发明的人mAb可以包含并非由例如CDR(并且具体地,CDR3)中的人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”不旨在包含其中衍生自另一种哺乳动物物种(例如,小鼠)的种系的CDR序列已经移植到人FR序列上的mAb。所述术语包含在非人哺乳动物或非人哺乳动物细胞中重组产生的抗体。所述术语不旨在包含从人类受试者中分离或产生的抗体。参见下文。

[0075] 本发明包含抗CoV-S嵌合抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)和其使用方法。如本文所使用的,“嵌合抗体”是具有来自第一抗体的可变结构域和来自第二抗体的恒定结构域的抗体,其中第一抗体和第二抗体来自不同物种。(US4816567;以及Morrison等人,(1984),《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,81:6851-6855)。

[0076] 本发明包含抗CoV-S杂交抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)和其使用方法。如本文所使用的,“杂交抗体”是具有来自第一抗体的可变结构域和来自第二抗体的恒定结构域的抗体,其中第一抗体和第二抗体来自不同物种,或者其中可变结构域而不是恒定区来自第一物种。例如,可变结构域可以从从人分离的且用未从所述抗体分离的固定恒定区表达抗体中获取。在实例1中对示例性杂交抗体进行了描述,其是指分别克隆到含有重恒定区和轻恒定区的表达载体中的抗体重链可变区和轻链可变区衍生的PCR产物。因为杂交抗体含有的可变区和恒定区未从单个天然来源分离,所以所述杂交抗体是合成的且非天然存在的。

[0077] 术语“重组”抗原结合蛋白(如抗体或其抗原结合片段)是指通过本领域已知为重组DNA技术(其包含例如DNA剪接和转基因表达)的技术或方法而产生、表达、分离或获得的此类分子。所述术语包含在非人哺乳动物(包含转基因非人哺乳动物,例如转基因小鼠)或细胞(例如,CHO细胞)表达系统或非人细胞表达系统中表达或从重组组合人抗体文库分离的抗体。在一些实施例中,重组抗体与从生物体(例如,小鼠或人)分离但已经通过重组DNA技术表达的抗体共享序列。此类抗体的翻译后修饰(例如,糖基化)可能与如从生物体分离的抗体不同。

[0078] 本文所公开的重组抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和抗原结合片段)也可以在大肠杆菌(E.coli)/T7表达系统中产生。在这个实施例中,对本发明的抗CoV-S抗体免疫球蛋白分子(例如,如在表1中发现的)进行编码的核酸可以插入基于pET的质粒中并在大肠杆菌/T7系统中表达。例如,本发明包含用于在细胞中包括表达T7 RNA聚合酶的宿主细胞(例如,细菌宿主细胞,如大肠杆菌,如BL21或BL21DE3)中表达抗体或其抗原结合片段或其免疫球蛋白链的方法,所述宿主细胞还包含对可操作地连接到T7启动子的免疫球蛋白链进行编码的多核苷酸。例如,在本发明的实施例中,细菌宿主细胞(如大肠杆菌)包含对可操作地连接到lac启动子的T7 RNA聚合酶基因进行编码的多核苷酸,并且聚合酶和链的表达是通过将宿主细胞与IPTG(异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷)一起温育而诱导的。参见US4952496和US5693489或Studier和Moffatt,“使用噬菌体T7 RNA聚合酶指导克隆基因的选择性高水平表达(Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective

high-level expression of cloned genes)" ,《分子生物学杂志》,1986年5月5日;189(1):113-30。

[0079] 本领域具有几种已知的产生重组抗体的方法。在US4816567中公开了用于重组产生抗体的方法的一个实例。

[0080] 转化可以通过用于将多核苷酸(例如,DNA或RNA,包含mRNA)引入宿主细胞中的任何已知方法。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域众所周知的,并且包含葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、多烯介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将一种或多种多核苷酸包封在脂质体中、脂质纳米颗粒技术、生物弹射以及直接将DNA微量注射到细胞核中。另外,核酸分子可以通过病毒载体(如慢病毒或腺相关病毒)引入哺乳动物细胞中。转化细胞的方法是本领域公知的。参见例如,美国专利第4,399,216号;第4,912,040号;第4,740,461号和第4,959,455号。在一些实施例中,本公开的抗体或抗原结合片段可以以核酸形式(例如,DNA或RNA,包含mRNA)引入到受试者,使得受试者的自身细胞产生抗体。本公开进一步提供对本文所描述的抗CoV-S抗体进行编码的核苷酸序列的修饰,所述修饰使得抗体表达增加、抗体稳定性增加、核酸(例如,mRNA)稳定性增加或抗体对CoV纤突蛋白的亲和力或特异性提高。

[0081] 因此,本发明包含用于制备本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白(如抗体或其抗原结合片段)或其免疫球蛋白链的重组方法,所述方法包括(i)引入对例如表1的抗原结合蛋白的轻和/或重免疫球蛋白链或CDR进行编码的一个或多个多核苷酸(例如,包含表2的序列中的任何一个或多个序列的核苷酸序列),例如其中所述多核苷酸位于载体中;和/或整合到宿主细胞染色体中和/或可操作地连接到启动子;(ii)在有利于表达多核苷酸的条件下培养宿主细胞(例如,CHO或毕赤酵母(Pichia)或巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)),以及(iii)任选地从宿主细胞和/或宿主细胞生长于的培养基分离抗原结合蛋白(例如,抗体或片段)或链。例如,多核苷酸可以例如在使用基因编辑系统(例如,CRISPR(例如,CRISPR-Cas9)、TALEN、megaTAL、锌指或阿尔戈诺特(Argonaute))对染色体进行切割之后通过用载体(如腺相关病毒(AAV))进行的靶向插入整合到宿主细胞染色体中。靶向插入可以例如在宿主细胞基因座(白蛋白或免疫球蛋白基因组基因座)处发生。可替代地,插入可以例如使用载体(如慢病毒)位于随机基因座处。当制备包括多于一个免疫球蛋白链的抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段),例如包括两个重免疫球蛋白链和两个轻免疫球蛋白链的抗体时,如果此类链被分泌,则在单个宿主细胞中的共表达所述链会导致链例如在细胞中、在细胞表面或在细胞外缔合,以便形成抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)。所述方法包含其中表达仅重免疫球蛋白链或仅轻免疫球蛋白链(例如,本文所讨论的任何重免疫球蛋白链或轻免疫球蛋白链,包含其成熟片段和/或可变结构域)的方法。例如,在表达包含此类链的抗体或抗原结合片段时,此类链可用作中间体。例如,本发明还包含包括由包括表2中所示的核苷酸序列的多核苷酸编码的重链免疫球蛋白(或其可变结构域或包括其CDR)和由表2中所示的核苷酸序列编码的轻链免疫球蛋白(或其可变结构域或包括其CDR)的抗CoV-S抗原结合蛋白(如抗体和其抗原结合片段),其是此类产生方法以及任选地本文所示的纯化方法的产物。例如,在一些实施例中,所述方法的产物是抗CoV-S抗原结合蛋白,其是包括包括表1中所示的氨基酸序列的HCVR和包括表1中所示的氨基酸序列的LCVR的抗体或片段,其中HCVR和LCVR序列选自表1中所列的单抗体。在一些实施例中,所述方法的产物是

抗CoV-S抗原结合蛋白,其是包括包括表1中所示的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3和包括表1中所示的氨基酸序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗体或片段,其中六个CDR序列选自表1中所列的单抗体。在一些实施例中,所述方法的产物是抗CoV-S抗原结合蛋白,其是包括包括表1中所示的HC氨基酸序列的重链和表1中所示的LC氨基酸序列的轻链的抗体或片段。

[0082] 真核和原核宿主细胞(包含哺乳动物细胞)可以用作用于表达抗CoV-S抗原结合蛋白的宿主。此类宿主细胞是本领域中众所周知的,并且许多可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)获得。这些宿主细胞尤其包含中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0、SP2细胞、海拉细胞(HeLa cell)、小仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、A549细胞、3T3细胞、HEK-293细胞和许多其它细胞系。哺乳动物宿主细胞包含人、小鼠、大鼠、狗、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞。可以使用的其它细胞系是昆虫细胞系(例如,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*))、两栖动物细胞、细菌细胞、植物细胞和真菌细胞。真菌细胞包含酵母和丝状真菌细胞,所述丝状真菌细胞包含例如,毕赤酵母、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、喜海藻糖毕赤酵母(*Pichia trehalophila*)、科克拉马毕赤酵母(*Pichia koclamae*)、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、微小毕赤酵母(*Pichia minuta*) (甲醇诱导型酵母(*Ogataea minuta*))、林氏毕赤酵母(*Pichia lindneri*))、仙人掌毕赤酵母(*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母(*Pichia salictaria*)、松栎毕赤酵母(*Pichia guercuum*)、皮杰普毕赤酵母(*Pichia pijperi*)、树干毕赤酵母(*Pichia stiptis*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、毕赤酵母菌(*Pichia sp.*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母菌(*Saccharomyces sp.*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母菌(*Kluyveromyces sp.*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、卢克诺文思金孢子菌(*Chrysosporium lucknowense*)、镰刀菌(*Fusarium sp.*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium gramineum*)、镰孢霉(*Fusarium venenatum*)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)以及粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)。本发明包含分离的宿主细胞(例如,CHO细胞),其包括抗原结合蛋白,如表1的抗原结合蛋白;或对其多肽进行编码的多核苷酸。

[0083] 术语“特异性结合”是指与抗原(如CoV-S蛋白(例如,SARS-CoV-2-S))具有结合亲和力的那些抗原结合蛋白(例如,mAb),所述结合亲和力表示为如例如通过在25°C或37°C下进行的实时无标记生物层干涉测定(例如,Octet®HTX生物传感器)或通过表面等离振子体共振(例如,BIACORE™)或通过溶液-亲和力ELISA测量为至少约10<sup>-8</sup>M的K<sub>D</sub>。本发明包含与CoV-S蛋白特异性结合的抗原结合蛋白。

[0084] 如本文所使用的,术语抗体或抗原结合蛋白的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”等包含任何与抗原特异性结合以形成复合物的天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白。抗原结合片段的非限制性实例包含:(i)Fab片段;(ii)F(ab')<sub>2</sub>片段;(iii)Fd片段;(iv)Fv片段;(v)单链Fv(scFv)分子;(vi)dAb片段;以及(vii)由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,分离的互补决定区(CDR),如CDR3肽)或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。其它工程化分子如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如,如W008/

020079或W009/138519中定义的) (例如,单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也涵盖在如本文所使用的表述“抗原结合片段”内。在本发明的实施例中,抗原结合片段包括表1的抗体的三个或更多个CDR (例如,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;或CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)。

**[0085]** 在本发明的实施例中,抗体的抗原结合片段将包括至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成,并且通常包括至少一个与一个或多个构架序列相邻或在所述构架内的CDR。在具有与V<sub>L</sub>结构域相关联的V<sub>H</sub>结构域的抗原结合片段中,V<sub>H</sub>结构域和V<sub>L</sub>结构域可以以任何适合的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体并且含有V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域。

**[0086]** 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可以含有共价连接到至少一个恒定结构域的至少一个可变结构域。可以在本发明的抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包含: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; 以及 (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>。在可变结构域和恒定结构域的任何构型中(包含上文所列的任何示例性构型),可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分铰链或连接子区连接。铰链区可以由至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成,所述氨基酸导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,本发明的抗体的抗原结合片段可以包括上文所列的任何可变结构域和恒定结构域构型的同二聚体或异二聚体(或其它多聚体),其彼此非共价结合和/或与一个或多个单体V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域共价结合(例如,通过一个或多个二硫键)。

**[0087]** 抗原结合蛋白(例如,抗体和抗原结合片段)可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。多特异性抗原结合蛋白将在本文中进一步进行讨论。

**[0088]** 在具体实施例中,本发明的抗体或抗体片段可以与部分(如配体)或治疗性部分(“免疫缀合物”)(如抗病毒药、第二抗流感抗体或可用于治疗病毒感染(例如,流感病毒感染)的任何其它治疗性部分)缀合。参见下文。

**[0089]** 本发明还提供了一种复合物,所述复合物包括本文讨论的与抗CoV-S抗体或片段特异性结合的CoV-S多肽或其抗原片段和/或第二抗体或抗原结合片段(例如,可检测地标记的第二抗体)复合的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)。在本发明的实施例中,抗体或片段处于体外(例如,固定到固体基质)或处于受试者体内。在本发明的实施例中,CoV-S处于体外(例如,固定到固体基质)或处于病毒的表面上或处于受试者体内。共价连接到不溶性基质材料(例如,玻璃或多糖(如琼脂糖或琼脂糖凝胶),例如,其珠粒或其它颗粒)的固定化抗CoV-S抗体和其抗原结合片段也是本发明的一部分;任选地,其中固定化抗体与CoV-S或其抗原片段或第二抗体或其片段复合。

**[0090]** “分离的”抗原结合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多肽、多核苷酸和载体至少部分不含来自产生其的细胞或细胞培养物中的其它生物分子。此类生物分子包含核酸、蛋白质、其它抗体或抗原结合片段、脂质、碳水化合物或其它物质,如细胞碎片和生长培养基。分离的抗体的抗原结合片段可以进一步至少部分地不含表达系统组分(如来自宿主细胞或其生长培养基的生物分子)。通常,术语“分离的”并不旨在是指完全不存在此类生物分子,也不

是指不存在水、缓冲液或盐或指包含抗体或片段的药物调配物的组分。

[0091] 术语“表位”是指与抗原结合蛋白的特定抗原结合位点(例如,称为互补位的抗体分子的可变区)相互作用的抗原决定簇(例如,CoV-S多肽)。单个抗原可以具有多个表位。因此,不同的抗体可以与抗原上的不同区域结合,并且可以具有不同的生物学效应。术语“表位”还可以指B和/或T细胞对其应答的抗原上的位点。其还指抗体结合的抗原的区。表位可以定义为结构性或功能性的。功能性表位通常是结构性表位的子集,并且具有直接有助于相互作用的亲和力的那些残基。表位可以是线性或构象的(即,由非线性氨基酸构成)。在某些实施例中,表位可以包含决定簇,所述决定簇是分子的化学活性表面基团(如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基),并且在某些实施例中,可以具有特定的三维结构特性和/或特定的电荷特性。

[0092] 用于确定抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)的表位的方法包含丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke, (2004),《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》,248:443-63)、肽切割分析、晶体学研究和NMR分析。另外,可以采用如抗原的表位切除、表位提取及化学修饰等方法(Tomer, (2000),《蛋白质科学(Prot.Sci.)》,9:487-496)。可以用于鉴定与抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测氢/氘交换。一般而言,氢/氘交换方法涉及对所关注蛋白质进行氘标记,然后将抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)与经氘标记的蛋白质结合。接下来,CoV-S蛋白/抗原结合蛋白复合物转移到水中,并且受抗体复合物保护的氨基酸内的可交换质子以比并非是界面的一部分的氨基酸内的可交换质子慢的速率经历氢-氘反交换。因此,形成蛋白质/抗原结合蛋白界面的一部分的氨基酸可以保留氘,并且因此表现出与并未包含在界面中的氨基酸相比相对较高的质量。在解离抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)后,靶蛋白经历蛋白酶切割和质谱法分析,由此揭示与抗原结合蛋白与之相互作用的特定氨基酸相对应的经氘标记的残基。参见例如,Ehring (1999)《分析生物化学(Analytical Biochemistry)》267:252-259;Engen和Smith (2001)《分析化学(Anal.Chem.)》,73:256A-265A。

[0093] 如本文所使用的,术语“竞争物”是指与抗原(例如,CoV-S)结合并且抑制或阻断另一种抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)与抗原的结合的抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)。所述术语还包含两个方向上的两个抗原结合蛋白(例如,抗体)之间的竞争,即,结合并且阻断第二抗体结合的第一抗体,反之亦然。在某些实施例中,第一抗原结合蛋白(例如,抗体)和第二抗原结合蛋白(例如,抗体)可以与相同的表位结合。可替代地,第一抗原结合蛋白和第二抗原结合蛋白(例如,抗体)可以与不同但例如重叠的表位结合,其中一个的结合例如通过空间位阻抑制或阻断第二抗体的结合。抗原结合蛋白(例如,抗体)之间的竞争可以通过本领域已知的方法来测量,例如,通过实时无标记生物层干涉测定。表位作图(例如,通过丙氨酸扫描或氢-氘交换(HDX))可以用于测定两个或更多个抗体是否是非竞争的(例如,纤突蛋白受体结合结构域(RBD)单体)、竞争同一表位或者竞争但是与不同的微表位竞争(例如,通过HDX鉴定的)。在本发明的实施例中,第一抗CoV-S抗原结合蛋白与第二抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)之间的竞争是通过以下测定的:测量固定化第一抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)(最初未与CoV-S蛋白复合)与与第二抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)复合的可溶CoV-S蛋白结合的能力。第一抗CoV-S抗原结合蛋白(例

如,抗体)与复合的CoV-S蛋白结合的能力相对于未复合的CoV-S蛋白有所降低指示第一抗CoV-S抗原结合蛋白和第二抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体)竞争。竞争程度可以表示为结合的降低的百分比。此类竞争可以使用实时无标记生物层干涉测定(例如,在Octet RED384生物传感器(颇尔富迪生物公司(Pall ForteBio Corp.)上)、ELISA(酶联免疫吸附测定)或通过SPR(表面等离振子共振)进行测量。

[0094] 抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,单克隆抗体(mAb))之间的结合竞争可以在Octet RED384生物传感器(颇尔富迪生物公司)上使用实时无标记生物层干涉测定来测定。例如,为了测定两种抗CoV-S单克隆抗体之间的竞争,可以首先通过将尖端浸入抗CoV-S mAb的溶液中来将抗CoV-S mAb(后续称为“mAb1”)捕获到抗hFc抗体涂覆的Octet生物传感器尖端上(颇尔富迪生物公司,#18-5060)。作为阻断的阳性对照,然后可以用已知的阻断同种型对照mAb(后续称为“阻断mAb”)使捕获抗体的生物传感器尖端通过浸入阻断mAb的溶液中而饱和。为了测定mAb2是否与mAb1竞争,可以随后将生物传感器尖端浸入已经预温育一段时间的CoV-S多肽和第二抗CoV-S mAb(随后称为“mAb2”)的共复合溶液中,并且可以测定mAb1与CoV-S多肽的结合。在实验的每个步骤之间,可以将生物传感器尖端在缓冲液中洗涤。可以在实验过程期间监测实时结合应答,并且可以记录每个步骤结束时的结合应答。

[0095] 例如,在本发明的实施例中,竞争测定在25°C和约7(例如,7.4)的pH下、例如在存在缓冲液、盐、表面活性剂和非特异性蛋白质(例如,牛血清白蛋白)的情况下进行。

[0096] 通常,以某种方式修饰的本发明的抗体或抗原结合片段保留与CoV-S特异性结合的能力,例如,当以摩尔为基础表达其CoV-S结合活性时,保留所述活性的至少10%(在与亲本抗体相比时)。优选地,本发明的抗体或抗原结合片段与亲本抗体相比保留CoV-S结合亲和力的至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更多。本发明的抗体或抗原结合片段还旨在可以包含基本上不改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代(称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”)。

[0097] 多肽(如免疫球蛋白链(例如,mAb8021 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、HC或LC、mAb8028 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、HC或LC或mAb8029 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、HC或LC))的“变体”是指包括与本文所示的(例如,SEQ ID NO:2、10、18、20、22、30、38、40、42、50、58或60中所示的)参考氨基酸序列至少约70-99.9%(例如,70%、72%、74%、75%、76%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%)相同或类似的氨基酸序列的多肽;当通过BLAST算法进行比较时,其中算法的参数被选择成给出在相应参考序列的整个长度内的相应序列之间的最大匹配(例如,预期阈值:10;字号:3;查询范围内的最大匹配数:0;BLOSUM 62矩阵;空位罚分:存在11,扩展1;条件组成得分矩阵调整)。

[0098] 多核苷酸的“变体”是指包括与本文所示的(例如,SEQ ID NO:1、9、17、19、21、29、37、39、41、49、57或59中所示的)参考核苷酸序列至少约70-99.9%(例如,至少约70%、72%、74%、75%、76%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%)相同的核苷酸序列的多核苷酸;当通过BLAST算法执行比较时,其中算法的参数被选择成给出在相应参考序列的整个长度内的相应序列之间的最大匹配(例如,预期阈值:10;字号:28;查询范围内的最大匹配数:0;匹配/不匹配得分:1,-2;空位罚分:线性)。

[0099] 在本发明的实施例中,本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合

片段)包含与表1中所示的HCVR氨基酸序列具有至少70% (例如,80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)氨基酸序列同一性的重链免疫球蛋白可变区;和/或与表1中所示的LCVR氨基酸序列具有至少70% (例如,80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)氨基酸序列同一性的轻链免疫球蛋白可变区。

[0100] 另外,变体抗CoV-S抗原结合蛋白可以包含包括本文所示的氨基酸序列(除一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个)突变(例如,错义突变(例如,保守取代)、无义突变、缺失或插入)之外)的多肽。例如,本发明包含抗原结合蛋白,其包含包括表1中所示的LCVR氨基酸序列但具有此类突变中的一个或多个突变的免疫球蛋白轻链变体和/或包括表1中所示的HCVR氨基酸序列但具此类突变中的一个或多个突变的免疫球蛋白重链变体。在本发明的实施例中,变体抗CoV-S抗原结合蛋白包含:包括CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的免疫球蛋白轻链变体,其中此类CDR中的一个或多个(例如,1个或2个或3个)具有此类突变(例如,保守取代)中的一个或多个突变;和/或包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的免疫球蛋白重链变体,其中此类CDR中的一个或多个(例如,1个或2个或3个)具有此类突变(例如,保守取代)中的一个或多个突变。取代可以位于CDR、构架或恒定区中。

[0101] 本发明进一步提供了变体抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段),其包括本文所示的与例如表1的重链和轻链CDR具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%序列同一性或类似性的一个或多个变体CDR(例如,CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3中的任何一个或多个)。

[0102] 本发明的实施例还包含变体抗原结合蛋白(例如,抗CoV-S抗体和其抗原结合片段),其包括免疫球蛋白 $V_H$ 和 $V_L$ ;或HC和LC,其包括与本文具体所示的对应的 $V_H$ 、 $V_L$ 、HC或LC的氨基酸序列具有70%或更高(例如80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)整体氨基酸序列同一性或类似性的氨基酸序列,但其中此类免疫球蛋白的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3不是变体并且包括表1中所示的CDR氨基酸序列。因此,在此类实施例中,变体抗原结合蛋白内的CDR本身不是变体。

[0103] 保守修饰变体抗CoV-S抗体和其抗原结合片段也是本发明的一部分。“保守修饰的变体”或“保守取代”是指其中多肽中的氨基酸被具有类似特性(例如,电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸取代一次或多次的变体。在不显著破坏抗体或片段的生物活性的情况下可以经常进行此类改变。本领域技术人员认识到,通常,多肽的非必需区中的单个氨基酸取代基本上不会改变生物活性(参见,例如,Watson等人,(1987),《基因的分子生物学(Molecular Biology of the Gene)》,本杰明/卡明斯出版公司(Benjamin/Cummings Pub.Co.),第224页,(第4版))。另外,结构或功能上类似的氨基酸的取代不太可能显著破坏生物活性。

[0104] 其侧链具有类似化学性质的氨基酸的基团的实例包含1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸以及7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、

丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是在Gonnet等人,(1992),《科学(Science)》,256:1443-45中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。

[0105] 抗CoV-S抗体和其抗原结合片段的功能保守变体也是本发明的一部分。抗CoV-S抗体和其抗原结合片段(如本文所讨论的)的变体中的任何变体可以是“功能保守变体”。在一些情况下,此类功能保守变体也可以被表征为保守修饰的变体。如本文所使用的,“功能保守变体”是指其中一个或多个氨基酸残基在没有显著改变抗体或片段的一个或多个功能性质的情况下已经变化的抗CoV-S抗体或其抗原结合片段的变体。在本发明的实施例中,本发明的功能保守变体抗CoV-S抗体或其抗原结合片段包括变体氨基酸序列,并且表现出以下功能性质中的一个或多个功能性质:

[0106] ●抑制冠状病毒(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV和/或MERS-CoV)在表达ACE2和/或TMPRSS2的细胞(例如,Calu-3细胞)中的生长;

[0107] ●不会与没有表达ACE2和/或TMPRSS2的MDCK/Tet-on细胞显著结合;

[0108] ●显示细胞(例如,Calu-3,)的冠状病毒感染(例如,通过SARS-CoV-2、SARS-CoV和/或MERS-CoV)的体外传播;和/或

[0109] ●任选地,当与第二治疗剂组合时,保护被工程化成表达人TMPRSS2和/或ACE2蛋白的小鼠免于冠状病毒感染(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS-CoV)所引起的死亡,例如其中小鼠感染以其它方式致死的剂量的病毒。

[0110] ●任选地,当与第二治疗剂组合时,保护被工程化成表达人TMPRSS2和/或ACE2蛋白的小鼠免于冠状病毒感染(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS-CoV)所引起的体重减轻,例如其中小鼠感染以其它方式引起体重减轻的剂量的病毒。

[0111] “中和”或“拮抗剂”抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)是指以任何可检测的程度抑制CoV-S的活性(例如,抑制CoV-S与要被蛋白酶(如TMPRSS2)切割的受体(如ACE2)结合或介导病毒进入宿主细胞中或病毒在宿主细胞中繁殖的活性)的分子。

[0112] 表1是指包括如下文所示的重链或V<sub>H</sub>(或其变体)和轻链或V<sub>L</sub>(或其变体)的抗原结合蛋白(如抗体和其抗原结合片段);或者所述抗原结合蛋白包括:V<sub>H</sub>,其包括其CDR(CDR-H1(或其变体)、CDR-H2(或其变体)和CDR-H3(或其变体));和V<sub>L</sub>,其包括其CDR(CDR-L1(或其变体)、CDR-L2(或其变体)和CDR-L3(或其变体)),例如,其中免疫球蛋白链、可变区和/或CDR包括如下所描述的特定氨基酸序列。

[0113] 本文所描述的抗体还包含其中V<sub>H</sub>与野生型IgG4(例如,其中残基108为S)或与IgG4变体(例如,其中残基108为P)融合的实施例。

[0114] 本发明的抗体和抗原结合片段包括包含本文所示的氨基酸序列的免疫球蛋白链以及对抗体的细胞和体外翻译后修饰。例如,本发明包含与CoV-S特异性结合的抗体和其抗原结合片段,其包括本文所示的重和/或轻链氨基酸序列(例如,CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和/或CDR-L3)以及其中一个或多个氨基酸残基被糖基化、一个或多个Asn残基被脱去酰胺基、一个或多个残基(例如,Met、Trp和/或His)被氧化、N端Gln是焦谷氨酸(pyroE)和/或C端赖氨酸缺失的抗体和片段。

[0115] 示例性抗SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)抗体的氨基酸序列和核苷酸序列在下文的示例性序列表中示出。

## [0116] 示例性序列表

[0117]	抗体名称 <b>mAb10933</b>	组分部分 HCVR	序列	SEQ ID NO
			氨基酸	
			QVQLVESGGGLVKGGSRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYITYSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKSSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGTTMVPFDYWGQGTLVT VSS	202

[0118]	HC DR1	GFTFSDYY	204
	HC DR2	ITYSGSTI	206
	HC DR3	ARDRGTTMVPFDY	208
	LC VR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASNLETGVPSRFSGSGSQDFTFTISGLQPE DIATYYCQQYDNLPLTFGGGTKEIK	210
	LC DR1	QDITNY	212
	LC DR2	AAS	55
	LC DR3	QQYDNLPLT	214
	HC	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYITYSGSTIYADSVKGRFTISRDNAKSSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGTTMVPFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQ TYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	216
	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASNLETGVPSRFSGSGSQDFTFTISGLQPE DIATYYCQQYDNLPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	218
<b>核酸</b>			
HC VR	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCA AGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGC CAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCATACAT TACTTATAGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTG AAGGGCGATTCAACCACCTCCAGGGACAACGCCAAGA GCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCGGTAC AACTATGGTCCCCTTGACTACTGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCA	201	
HC DR1	GGATTCACCTTCAGTGACTACTAC	203	
HC DR2	ATTACTTATAGTGGTAGTACCAT	205	
HC DR3	GCGAGAGATCGCGGTACAACATGGTCCCCTTGACTAC	207	
LC VR	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCAGGGAG TCAGGACATTACCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAA ACCAGGGAAAGCCCTAAAGCTCTGATCTACGCTGCAT CCAATTGGAAACAGGGTCCCATCAAGGTTAGTGG AGTGGATCTGGGACAGATTTACTTTCACCATCAGCGGC CTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAG TATGATAATCTCCCTCTCACTTCGGCGGAGGGACCAAG	209	

[0119]		GTGGAGATCAAA	
	LCDR1	CAGGACATTACCAACTAT	211
	LCDR2	GCTGCATCC	54
	LCDR3	CAACAGTATGATAATCTCCCTCTCACT	213
	HC	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGTCA AGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGC CAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCATACAT TACTTATAGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTG AAGGGCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAGA GCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCGGTAC AACTATGGTCCCCTTGACTACTGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCAAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTGTTGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCCTGTCTTACA GTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCG TGCCCTCCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACTACACA TGCCCACCGTCCCAGCACCTGAACACTCCTGGGGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT GTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAACA AAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACA CCCTCCCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATG CTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGC AGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	215
	LC	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCAGGGAG TCAGGACATTACCAACTATTTAATTGGTATCAGCAGAA ACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCTGATCTACGCTGCAT CCAATTGGAAACAGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGG AGTGGATCTGGGACAGATTACTTCACCATCAGCGGC CTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAG TATGATAATCTCCCTCTCACTTCCGGCAGGGACCAAG GTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTT	217

[0120]

		CATCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGCTGCTGATAACTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGGAGAACACAAAGTC TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG	
		<b>氨基酸</b>	
	HCVR	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGITFSNAWMSWVRQ APGKGLEWVGRIKSKTDDGTTDYAAPVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTARWDWYFDLWGRGTLV TVSS	220
	HCDR1	GITFSNAW	222
	HCDR2	IKSKTDGGTT	224
	HCDR3	TTARWDWYFDL	226
	LCVR	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQDIWNYINWYQQKP GKAPKLLIYDASNLKTGVPSRFSGSQSGTDFTFTISSLQPE DIATYYCQQHDDLPPTFGQGTKVEIK	228
	LCDR1	QDIWNY	230
	LCDR2	DAS	194
	LCDR3	QQHDDLPPT	232
	HC	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGITFSNAWMSWVRQ APGKGLEWVGRIKSKTDDGTTDYAAPVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTARWDWYFDLWGRGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHPKNTVKDKKVEPKSCDKTHCPVCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	234
	LC	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQDIWNYINWYQQKP GKAPKLLIYDASNLKTGVPSRFSGSQSGTDFTFTISSLQPE DIATYYCQQHDDLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVKYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	236
		<b>核酸</b>	
	HCVR	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAA AGCCTGGGGGGTCCCTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGAATCACTTCAGTAACGCCCTGGATGAGTTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCGT ATTAAAAGCAAAACTGATGGTGGGACAACAGACTACGC CGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATG ATTCAAAAACACGCTGTATCTACAAATGAACAGCCTG AAAACCGAGGACACAGCCGTATTACTGTACCACAGC	219

		GAGGTGGGACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCA CCCTGGTCACTGTCCTCA	
	HCDR1	GGAATCACTTCAGTAACGCCCTGG	221
	HCDR2	ATTAAGCAAAACTGATGGTGGGACAACA	223
	HCDR3	ACCACAGCGAGGTGGACTGGTACTTCGATCTC	225
[0121]	LCVR	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCAGGGAG TCAGGACATTGGAATTATATAAATTGGTATCAGCAGAA ACCAGGGAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCAT CCAATTGAAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTAGTGGA AGTGGATCTGGGACAGATTACTTCACCATCAGCAGC CTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAG CATGATGATCTCCCTCCGACCTCGGCCAAGGGACCAA GGTGGAAATCAA	227
	LCDR1	CAGGACATTGGAATTAT	229
	LCDR2	GATGCATCC	193
	LCDR3	CAACAGCATGATGATCTCCCTCCGACC	231
	HC	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTAA AGCCTGGGGGGTCCCTAGACTCTCTGTGCAGCCTCT GGAATCACTTCAGTAACGCCCTGGATGAGTTGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGT ATTAAAAGCAAAACTGATGGTGGGACAACAGACTACGC CGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATG ATTCAAAAACACGCTGTATCTACAAATGAACAGCCTG AAAACCGAGGACACAGCCGTATTACTGTACCACAGC GAGGTGGACTGGTACTTCGATCTCTGGGCCGTGGCA CCCTGGTCACTGTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAAGAGCACCTC TGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGC GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGCTCCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTGGGGGG ACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACCAAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCACGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTATCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCGTGCTGGACTC	233

		CGACGGCTCCTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGTCCCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA	
	LC	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCAGGCGAG TCAGGACATTGGAATTATATAAATTGGTATCAGCAGAA ACCAGGGAGGGCCCTAAGCTCTGATCTACGATGCAT CCAATTGAAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTAGTGG AGTGGATCTGGGACAGATTTACTTCACCATCAGCAGC CTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAG CATGATGATCTCCCTCCGACCTTGGCCAAGGGACCAA GGTGGAAATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCT TCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGC CCGTCACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGTAG	235
<b>氨基酸</b>			
[0122]	HCVR	QVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSNYAMYWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRTEDTAVYYCAGSDYGDYLLVYWGQGTL VTVSS	640
	HCDR1	GFTFSNYA	642
	HCDR2	ISYDGSNK	499
	HCDR3	ASGSDYGDYLLVY	644
	LCVR	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMYDVSKRPSGVSNRSGSKSGNTASLTISGL QSEDEADYYCNSLTSISTWVFGGKLTQL	646
	LCDR1	SSDVGGYNY	648
	LCDR2	DVS	650
	LCDR3	NSLTSISTWV	652
	HC	QVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSNYAMYWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRTEDTAVYYCAGSDYGDYLLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	654
mAb10987	LC	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMYDVSKRPSGVSNRSGSKSGNTASLTISGL	656

[0123]

		QSEDEADYYCNSLTSISTWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS	
<b>核酸</b>			
	HCVR	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCC AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTACCTTCAGTAACATATGCTATGTACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT ATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGGCTCCGACTA CGGTGACTACTTATTGGTTACTGGGCCAGGAAACCCCT GGTCACCGTCTCCTCA	639
	HCDR1	GGATTACCTTCAGTAACATATGCT	641
	HCDR2	ATATCATATGATGGAAGTAATAAA	498
	HCDR3	GCGAGTGGCTCCGACTACGGTGACTACTTATTGGTTAC	643
	LCVR	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCCTCGTGTCTGGGTC TCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCAGTGGAAACCA GCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACC AACAAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTAT GATGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTTCTAATCGCTTC TCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCAT CTCTGGGCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTACTG CAACTCTTGACAAGCATCAGCACTGGGTGTTGGCG GAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	645
	LCDR1	AGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTAT	647
	LCDR2	GATGTCAGT	649
	LCDR3	AACTCTTGACAAGCATCAGCACTGGGTG	651
	HC	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCC AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTACCTTCAGTAACATATGCTATGTACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT ATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGGCTCCGACTA CGGTGACTACTTATTGGTTACTGGGCCAGGAAACCCCT GGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCGTGTCTAC GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACA TGCCCAACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACC	653

[0124]		GTCAGTCTTCCTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTACATCGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGCTCCAACA AAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACACGCCCTCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACACGC AGAAGTCCCTCTCCGTCTCCGGTAAATGA	
	LC	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCGTGTCTGGGTC TCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCA GCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACC AACAAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTAT GATGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTTCTAATCGCTTC TCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCAT CTCTGGGCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTG CAACTCTTGACAAGCATCAGCACTGGGTGTCGGCG GAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGCCAGGCCAAGGC CGCCCCCTCCGTGACCTGTTCCCCCCCCTCCCTCCGAGG AGCTGCAGGCCAACAAAGCCACCCCTGGTGTGCCTGATC TCCGACTTCTACCCGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAA GGCCGACTCCTCCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACC ACCACCCCTCCAAGCAGTCAAACAACAAGTACGCCGC CTCCTCCTACCTGTCCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAAGT CCCACCGGTCTACTCCTGCCAGGTGACCCACGAGGGC TCCACCGTGGAGAAGACCGTGGCCCCACCGAGTGCTC CTGA	655
mAb10989	<b>氨基酸</b>		
	HCVR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYYMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGGANYAQKFQQRVTLRTDTSIT TVYMECSRRLRFDDTAVYYCARGSRYDWNNQNNWFDPWG QGTLTVVSS	678
	HCDR1	GYIFTGYY	680
	HCDR2	INPNSSGA	682
	HCDR3	ARGSRYDWNNQNNWFDP	684
	LCVR	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYNYVSWYQQ HPGKAPKLMIFDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSFTTSSTVVFGGGTKLTVL	686
	LCDR1	SSDVGTYNY	688
	LCDR2	DVS	650
	LCDR3	SSFTTSSTVV	690

[0125]	HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFTGYYMHWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGGANYAQKFQGRVTLRDTSTIT TVYMEELSRLRFDDTAVYYCARGSRYDWNNWFDPWG QGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	692
	LC	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGTYNYVSWYQQ HPGKAPKLMIFDVSNRPSGVSDRFSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSFTTSSTVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAFTVAWKADSSPVKA GVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	694
	<b>核酸</b>		
	HCVR	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGATACATCTCACCGGCTACTATATGCACGGTGC CAGGCCCTGGACAGGGCTTGAGTGGATGGATGGAT CAACCTAACAGTGGGGCGCAAACATATGCACAGAA TTCAGGGCAGGGTCACCTGACCAGGGACACGTCCATC ACCACAGTCTACATGGAACACTGAGCAGGCTGAGATTGA CGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGATCCCGT ATGACTGGAACCAGAACAACTGGTCACCCCTGGGC CAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA	677
	HCDR1	GGATACATCTCACCGGCTACTAT	679
	HCDR2	ATCAACCTAACAGTGGGGCGCA	681
	HCDR3	GCGAGAGGATCCGGTATGACTGGAACCAGAACAACTG GTTCGACCCCC	683
	LCVR	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCCTCCGTGTCTGGGTC TCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCA GCAGTGACGTGGTACTTATAACTATGTCTCCTGGTACC AACAAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATT GATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTCTGATCGCTTC TCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCAT CTCTGGGCTCAGGCTGAGGACGGAGGCTGATTATTACT GCAGCTCATTACAACCAGCAGCACTGTGGTTTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	685
	LCDR1	AGCAGTGACGTTGGTACTTATAACTAT	687
	LCDR2	GATGTCAGT	649
	LCDR3	AGCTCATTACAACCAGCAGCACTGTGGTT	689
	HC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT GGATACATCTCACCGGCTACTATATGCACGGTGC CAGGCCCTGGACAGGGCTTGAGTGGATGGATGGAT	691

[0126]		CAACCCCTAACAGTGGTGGCGCAAACACTATGCACAGAAGT TTCAGGGCAGGGTCACCCCTGACCAGGGACACGTCATC ACCACAGTCTACATGGAACACTGAGCAGGCTGAGATTGA CGACACGGCCGTATTACTGTGCGAGAGGATCCCGT ATGACTGGAACCAGAACAACTGGTTGACCCCTGGGGC CAGGGAAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAAGA GCACCTCTGGGGCAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGTTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCAACCGTGCCAGCACCTGAACCTCC TGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACAC AGGTGTACACCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACC AAGAACCAAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAT GA	
	LC	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTC TCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGACTGGAACCA GCAGTGACGTTGGTACTTATAACTATGTCTCCTGGTACC AACAAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATT GATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTCTGATCGCTTC TCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCAT CTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGGAGGCTGATT GCAGCTCATTACAACCAGCAGCAGCACTGTGGTTTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGCCAGCCAAAG CCGCCCCCTCCGTGACCCCTGTTCCCCCCTCCCTGGAG GAGCTGCAGGCCAACAAAGGCCACCCCTGGTGTGCC CTCCGACTTCTACCCCGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AGGCCGACTCCTCCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGAC CACCAACCCCTCCAAGCAGTCAAACAAACAAAGTACGCC CCTCCTCCTACCTGTCCCTGACCCCGAGCAGTGGAG TCCCACCGGTCTACTCCTGCCAGGTGACCCACGAGGG CTCCACCGTGGAGAACAGACCGTGGCCCCCACCGAGTGCT	693

[0127]  CCTGA

[0128] 抗体的施用

[0129] 本发明提供了用于施用本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,表1的那些)的方法,所述方法包括将抗原结合蛋白引入受试者(例如,人)体内。例如,所述方法包括用注射器的针刺穿受试者的身体,并且将抗原结合蛋白注射到受试者的体内,例如,注射到受试者

的静脉、动脉、肿瘤、肌肉组织或皮下组织。

[0130] 本发明提供了包括本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,表1的那些)的器皿(例如,塑料或玻璃小瓶,例如具有盖或色谱柱、空心孔针或注射器筒)。

[0131] 本发明还提供了包括与CoV-S特异性结合的一个或多个抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)(例如,表1的那些)或其药物组合物的注射装置。注射装置可以包装成试剂盒。注射装置是通过肠胃外途径(例如,肌内、皮下或静脉内)将物质引入受试者体内的装置。例如,注射装置可以是注射器(例如,预先填充有药物组合物,如自动注射器),所述注射器例如包含用于保持要注射的流体(例如,包括抗体或其片段或药物组合物)的圆筒或针筒、用于将皮肤和/或血管穿刺以注射液体的针头;以及用于将流体推出圆筒并通过针孔的柱塞。在本发明的实施例中,包括来自本发明的组合的抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)或其药物组合物的注射装置是静脉内(IV)注射装置。此类装置可以在可以附接到管的套管或套管针/针中包含抗原结合蛋白或其药物组合物,所述管可以附接到用于保持通过套管或套管针/针引入受试者体内的流体(例如,生理盐水)的袋或储器。在本发明的实施例中,一旦套管针和套管插入受试者的静脉中,就可以将抗体或片段或其药物组合物引入装置中并将套管针从插入的套管去除。IV装置可以例如插入外周静脉(例如,在手或手臂中)中;上腔静脉或下腔静脉或在心脏的右心房(例如,中央IV)内;或到锁骨下静脉、颈内静脉或股静脉中,例如向心脏前进,直到其到达上腔静脉或右心房(例如,中央静脉线)为止。在本发明的实施例中,所述注射装置是自动注射器;喷射注射器或外部输注泵。喷射注射器使用穿透表皮以将抗体或片段或其药物组合物引入受试者体内的高压窄射流。外部输注泵是以控制量将抗体或片段或其药物组合物递送到受试者体内的医疗装置。外部输注泵可以电力地或机械地供以动力。不同的泵以不同的方式进行操作,例如,注射泵将流体保持在注射器的储器中,并且可移动活塞控制流体递送;弹性泵将流体保持在可伸缩球囊储器中,并且来自球囊的弹性壁的压力驱动流体递送。在蠕动泵中,一组辊向下压紧在一段柔性管上,从而推动流体前进。在多通道泵中,流体可以以多种速率从多个储器递送。

[0132] 人抗体的制备

[0133] 用于在转基因小鼠中产生人抗体的方法是本领域已知的。可将任何此类已知方法用于本发明中用于制备与CoV-S特异性结合的人抗体的上下文。包括以下任何一种的免疫原可以用于产生针对CoV-S的抗体。在本发明的某些实施例中,本发明的抗体从用全长CoV-S或用减毒或灭活的病毒或用对蛋白质或其片段进行编码的DNA免疫的小鼠获得。可替代地,可以使用标准的生物化学技术产生CoV-S蛋白或其片段,并且对其进行修饰并且用作免疫原。在本发明的一个实施例中,免疫原是重组产生的CoV-S蛋白或其片段。在本发明的某些实施例中,免疫原可以是CoV-S多肽疫苗。在某些实施例中,可以施用一种或多种加强注射。在某些实施例中,免疫原可以是在大肠杆菌或在任何其它真核或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)中表达的重组CoV-S多肽。

[0134] 使用VELOCIMMUNE®技术(参见例如,US 6,596,541,再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals),VELOCIMMUNE®)或用于产生单克隆抗体的任何其它已知方法,可以初步分离具有人可变区和小鼠恒定区的针对CoV-S的高亲和力嵌合抗体。VELOCIMMUNE®技术涉及具有基因组的转基因小鼠的产生,所述基因组包括可操作地连接到内源性小鼠恒定区基因座的人重链可变区和人轻链可变区,使得小鼠响应于抗原性刺激而产生包括人可

变区和小鼠恒定区的抗体。对抗体的重链可变区和轻链可变区进行编码的DNA被分离，并且可操作连接到对人重链恒定区和人轻链恒定区进行编码的DNA。然后DNA在能够表达完全人抗体的细胞中表达。

[0135] 通常,用所关注抗原攻击VELOCIMMUNE®小鼠,并且从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞(如B细胞)。可以将淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合以制备永生的杂交瘤细胞系,并且对此类杂交瘤细胞系进行筛选和选择以鉴定产生对所关注抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。对重链可变区和轻链可变区的进行编码DNA可以被分离并且连接到重链和轻链的期望同种型恒定区。此类抗体蛋白可以在如CHO细胞等细胞中产生。可替代地,对抗原特异性嵌合抗体或轻链可变结构域和重链可变结构域的进行编码DNA可以直接从抗原特异性淋巴细胞分离。

[0136] 最初,分离具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。如在下文的实验部分中,表征并选择抗体以获得期望特性,包含亲和力、选择性、表位等。将小鼠恒定区替换为期望的人恒定区以产生本发明的完全人抗体,例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4。虽然所选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特性存在于可变区中。

[0137] 包括Fc变体的抗冠状病毒纤突蛋白抗体

[0138] 根据本发明的某些实施例,提供了包括Fc结构域的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段),所述Fc结构域包括增强或减少抗体与FcRn受体例如在酸性pH下(如与中性pH相比)的结合的一个或多个突变。例如,本发明包含在Fc结构域的C<sub>H</sub>2区或C<sub>H</sub>3区中包括突变的抗CoV-S抗体,其中一个或多个突变增加Fc结构域在酸性环境中(例如,在pH范围为约5.5到约6.0的核内体中)对FcRn的亲和力。当施用于动物时,此类突变可以导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包含例如以下位置处的修饰:第250位(例如,E或Q);第250位和第428位(例如,L或F);第252位(例如,L/Y/F/W或T)、第254位(例如,S或T)和第256位(例如,S/R/Q/E/D或T);或第428位和/或第433位(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或第434位(例如,A、W、H、F或Y[N434A、N434W、N434H、N434F或N434Y]);或第250位和/或第428位;或第307位或第308位(例如,308F、V308F)和第434位。在一个实施例中,修饰包括428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L(例如,T250Q和M428L)修饰;以及307和/或308(例如,308F或308P)修饰。在又另一个实施例中,修饰包括265A(例如,D265A)和/或297A(例如,N297A)修饰。

[0139] 例如,本发明包含包括Fc结构域的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段),所述Fc结构域选自由以下组成的组的一对或多对突变或一组或多组突变:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);257I和311I(例如,P257I和Q311I);257I和434H(例如,P257I和N434H);376V和434H(例如,D376V和N434H);307A、380A和434A(例如,T307A、E380A和N434A);以及433K和434F(例如,H433K和N434F)。

[0140] 设想了包括本文所示的包括前述Fc结构域突变的任何可能的组合的V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)在本发明的范围内。

[0141] 本发明还包含抗CoV-S抗原结合蛋白、抗体或抗原结合片段,其包括本文所示的V<sub>H</sub>

和嵌合重链恒定 (C<sub>H</sub>) 区, 其中所述嵌合C<sub>H</sub>区包括衍生自多于一种的免疫球蛋白同种型的C<sub>H</sub>区的区段。例如, 本发明的抗体可以包括嵌合C<sub>H</sub>区, 其包括衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4分子、与衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4分子的C<sub>H</sub>3结构域的一部分或全部组合的C<sub>H</sub>2结构域的一部分或全部。根据某些实施例, 本发明的抗体包括具有嵌合铰链区的嵌合C<sub>H</sub>区。例如, 嵌合铰链可以包括衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”氨基酸序列(根据EU编号来自第216位到第227位的氨基酸残基), 其与衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列(根据EU编号来自第228位到第236位的氨基酸残基)组合。根据某些实施例, 嵌合铰链区包括衍生自人IgG1或人IgG4上铰链的氨基酸残基和衍生自人IgG2下铰链的氨基酸残基。在某些实施例中, 包括本文所述的嵌合C<sub>H</sub>区的抗体可以表现出不会不利地影响抗体的治疗或药代动力学性质的经过修饰的Fc效应子功能。(参见例如, WO2014/022540)。

#### [0142] 免疫缀合物

[0143] 本发明涵盖与另一个部分(例如, 治疗性部分(免疫缀合物), 如类毒素或治疗流感病毒感染的抗病毒药)缀合的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如, 抗体或抗原结合片段)。在本发明的实施例中, 将抗CoV-S抗体或片段与本文所示的任何另外的治疗剂缀合。如本文所使用的, 术语“免疫缀合物”是指与放射性药剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告基因部分、酶、肽或蛋白质或治疗剂化学或生物连接的抗原结合蛋白(例如, 抗体或抗原结合片段)。抗原结合蛋白可以沿分子能够结合其靶标(CoV-S)的长度在任何位置处连接到放射性药剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告基因部分、酶、肽或蛋白质或治疗剂。免疫缀合物的实例包含抗体-药物缀合物和抗体-毒素融合蛋白。在本发明的一个实施例中, 药剂可以是与CoV-S特异性结合的第二不同抗体。可以与抗CoV-S抗原结合蛋白(例如, 抗体或片段)缀合的治疗性部分的类型将考虑要治疗的病状和要实现的期望的治疗效果。参见例如, Arnon等人, “用于在癌症疗法中免疫靶向药物的单克隆抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)”, 《单克隆抗体和癌症疗法(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)》, Reisfeld等人(编著), 第243-56页(Alan R.Liss公司(Alan R.Liss, Inc.) 1985); Hellstrom等人, “用于药物递送的抗体(Antibodies For Drug Delivery)”《受控药物递送(Controlled Drug Delivery)》(第2版), Robinson等人(编著), 第623-53页(马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.) 1987); Thorpe, “癌症疗法中的细胞毒性剂的抗体载体: 综述(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)”, 单克隆抗体(Monoclonal Antibodies) 1984:《生物学和临床应用(Biological And Clinical Applications)》, Pinchera等人(编著), 第475-506页(1985); “放射标记抗体在癌症疗法中的治疗性用途的分析、结果和未来展望(Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)”《用于癌症检测和疗法的单克隆抗体(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)》, Baldwin等人(编著), 第303-16页(学术出版社(Academic Press) 1985)以及Thorpe等人, “抗体-毒素缀合物的制备和细胞毒性性质(The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates)”《免疫学综述(Immunol.Rev.)》, 62:119-58(1982)。

#### [0144] 多特异性抗体

[0145] 本发明包含抗CoV-S抗原结合蛋白(例如, 抗体和其抗原结合片段)以及其使用方

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

[0146] 表1的抗体包含多特异性分子(例如,抗体或抗原结合片段),所述多特异性分子分别包含那些抗体的CDR-H和CDR-L、V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>或HC和LC(包含本文所示的其变体)。

[0147] 在本发明的实施例中,与CoV-S特异性结合的抗原结合结构域可以包含在多特异性分子中,所述抗原结合结构域包括:

[0148] (1)

[0149] (i) 重链可变结构域序列,其包括表1中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3氨基酸序列,以及

[0150] (ii) 轻链可变结构域序列,其包括表1中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列;

[0151] 或者

[0152] (2)

[0153] (i) 重链可变结构域序列,其包括表1中所示的氨基酸序列,以及

[0154] (ii) 轻链可变结构域序列,其包括表1中所示的氨基酸序列;

[0155] 或者

[0156] (3)

[0157] (i) 重链免疫球蛋白序列,其包括表1中所示的氨基酸序列,以及

[0158] (ii) 轻链免疫球蛋白序列,其包括表1中所示的氨基酸序列。

[0159] 在本发明的实施例中,多特异性抗体或片段包含多于两种不同的结合特异性(例如,三特异性分子),例如,与第一和/或第二抗原结合结构域相同或不同的一个或多个另外的抗原结合结构域。

[0160] 在本发明的一个实施例中,双特异性抗原结合片段包括对第一表位(例如,CoV-S)具有结合特异性的第一scFv(例如,包括表1的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列)和对第二不同表位具有结合特异性的第二scFv。例如,在本发明的实施例中,第一和第二scFv与接头(例如肽接头(例如,GS接头,如(GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:834)))拴系在一起,其中n为例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。其它双特异性抗原结合片段包含双特异性IgG抗体的F(ab)<sub>2</sub>,其包括表1和与不同表位结合的另一个抗体的重和轻链CDR。

[0161] 治疗方法

[0162] 本发明提供用于通过向需要此类治疗或预防的受试者(例如,人)施用治疗有效量的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)来治疗或预防病毒感染(例如,冠状病毒感染)的方法。

[0163] 受试者体内的冠状病毒感染可以通过向受试者施用本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白来治疗或预防。

[0164] 有效或治疗有效剂量的(例如,表1的)用于治疗或预防病毒感染的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)指的是足以减轻所治疗受试者的感染的一种或多种体征和/或症状的抗体或片段的量,无论所述减轻是通过诱导此类体征和/或症状的消退或消除完成的还是通过抑制此类体征和/或症状的进展完成的。剂量可以根据待施用的受试者的年龄和体型、目标疾病、病状、施用途径等而变化。在本发明的实施例中,用于治疗或预防病毒感染(例如,在成人受试者中)的本发明的抗体或其抗原结合片段的有效或治疗有效剂量为约0.01到约200mg/kg,例如多达约150mg/kg。在本发明的实施例中,剂量多达约10.8或11克(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11克)。根据感染的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。在某些实施例中,本发明的抗原结合蛋白可以以初始剂量和随后的一个或多个二次剂量来施用。在某些实施例中,可以在初始剂量之后施用第二或多个后续剂量的抗体或其抗原结合片段,所述第二或多个后续剂量的量可以近似于或小于初始剂量的量,其中后续剂量间隔至少1天到3天;至少一周、至少2周;至少3周;至少4周;至少5周;至少6周;至少7周;至少8周;至少9周;至少10周;至少12周;或至少14周。

[0165] 如本文所使用的,术语“受试者”是指需要预防和/或治疗疾病或病症(如病毒感染或癌症)的哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、猫、狗、牛、猪、绵羊、马、山羊、兔子),优选地例如人。受试者可以患有病毒感染(例如,流感感染)或易患上感染。易患上感染的受试者或感染上感染(例如,冠状病毒或流感病毒感染)的风险较高的受试者包含由于自身免疫性疾病导致的免疫系统受损的受试者、接受免疫抑制疗法(例如,器官移植后)的受试者、患有人类免疫缺陷症综合征(HIV)或获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的受试者、患有会耗尽或破坏白细胞的贫血形式的受试者、接受放射或化学疗法的受试者或患有炎性病症的受试者。另外地,年龄非常年轻(例如,5岁或更小)或年龄较大(例如,65岁或更大)的受试者处于较高风险中。此外,受试者由于接近疾病的爆发(例如,受试者居住在人口密集城市中或接近已经确诊或疑似患有病毒感染的受试者)或职业选择(例如,医院工作者、药物研究者、到过感染区域的旅行者或经常乘飞机者)而处于感染上病毒感染的风险中。

[0166] “治疗(treat)”或“治疗(treating)”意指向具有疾病或感染(例如,病毒感染)的一种或多种体征或症状的受试者施用本发明(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段),对于所述疾病或感染而言,所述抗原结合蛋白在以有效或治疗有效量或剂量(如本文所讨论的)施用于受试者时是有效的。

[0167] 本发明还涵盖向处于病毒感染风险中的受试者预防性地施用本发明(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)以便预防此类感染。已经证明基于被动抗体的免疫预防法是预防受试者患上病毒感染的有效策略。参见例如,Berry等人,被动广谱流感免疫预防(Passive broad-spectrum influenza immunoprophylaxis).《流感研究和治疗(Influenza Res Treat.)》2014;2014:267594。电子版发布于2014年9月22日;以及Jianqiang等人,预防和控制甲型流感感染的被动免疫中和策略(Passive immune

neutralization strategies for prevention and control of influenza A infections),《免疫疗法(Immunotherapy)》2012年2月;4(2):175-186;Prabhu等人,《抗病毒素疗法(Antivir Ther.)》2009;14(7):911-21,对H5血凝素具有特异性的嵌合单克隆抗体对致命的H5N1型流感的预防和治疗功效(Prophylactic and therapeutic efficacy of a chimeric monoclonal antibody specific for H5 hemagglutinin against lethal H5N1 influenza)。“预防(prevent)”或“预防(preventing)”意指向受试者施用本发明(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)以抑制疾病或感染(例如,病毒感染)在受试者体内的表现,对于所述疾病或感染,所述抗原结合蛋白在以有效或治疗有效量或剂量(如本文所讨论的)施用于受试者时是有效的。

[0168] 在本发明的实施例中,受试者的病毒感染的体征或症状是例如通过病毒滴度测定(例如,将冠状病毒在鸡胚中繁殖或冠状病毒纤突蛋白测定)测定的病毒在受试者体内的存活或增殖。病毒感染的其它体征和症状在本文中进行了讨论。

[0169] 如上所述,在一些实施例中,受试者可以是非人动物,并且本文所讨论的抗原结合蛋白(例如,抗体和抗原结合片段)可以在治疗和/或预防非人动物(例如,猫、狗、猪、牛、马、山羊、兔子、绵羊等)的疾病的兽医情景中使用。

[0170] 本发明提供了用于治疗或预防病毒感染(例如,冠状病毒感染)或用于诱导病毒感染的至少一种体征或症状的消退或消除或抑制所述至少一种体征或症状的进展的方法,如:

[0171] ●发烧或感到发热/发冷;

[0172] ●咳嗽;

[0173] ●咽喉痛;

[0174] ●流鼻涕或鼻塞;

[0175] ●打喷嚏;

[0176] ●肌肉或身体疼痛;

[0177] ●头痛;

[0178] ●疲劳(疲倦);

[0179] ●呕吐;

[0180] ●腹泻;

[0181] ●呼吸道感染;

[0182] ●胸闷;

[0183] ●呼吸短促;

[0184] ●支气管炎;和/或

[0185] ●肺炎,

[0186] (对于病毒感染而言次要的体征或症状),对有需要的受试者(例如,人)进行的所述治疗或预防或所述诱导或抑制是通过向所述受试者施用治疗有效量的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,通过将蛋白质注射到受试者体内)进行的。

[0187] 组合和药物组合物

[0188] 为了制备(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和其抗原结合片段)的药物组合物,将抗原结合蛋白与药学上可接受的载体或赋形剂混合。参见例如,《雷明顿药

物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》和《美国药典:国家处方集(U.S.Pharmacopeia:National Formulary)》,麦克出版公司(Mack Publishing Company),伊斯顿,宾夕法尼亚州,(1984);Hardman等人,(2001),《古德曼,吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,麦格劳希尔出版公司(McGraw-Hill),纽约市,纽约州;Gennaro(2000)《雷明顿:药物科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott, Williams, and Wilkins),纽约市,纽约州;Avis等人(编著),(1993),《药物剂型:胃肠外药物(Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications)》,马塞尔德克尔公司,纽约;Lieberman等人(编著),(1990),《药物剂型:胃肠外药物(Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets)》,马塞尔·德克尔公司,纽约;Lieberman等人(编著),(1990),《药物剂型:胃肠外药物(Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems)》,马塞尔德克尔公司,纽约;Weiner和Kotkoskie(2000)《赋形剂毒性和安全性(Excipient Toxicity and Safety)》,马塞尔德克尔公司,纽约市,纽约州)。在本发明的一个实施例中,药物组合物是无菌的。此类组合物是本发明的一部分。

[0189] 本发明的范围包含干燥的(例如,冻干的)组合物,所述组合物包括(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)或包含药学上可接受的载体但基本上缺乏水的其药物组合物。

[0190] 在本发明的另外的实施例中,与本文所公开的(例如,表1)的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)组合施用于受试者的另外的治疗剂是根据根据医师案头参考(Physicians' Desk Reference)2003(汤姆森医疗保健(Thomson Healthcare);第57版(2002年11月1日))向受试者施用的。

[0191] 施用模式可以变化。施用途径包含口服、直肠、透粘膜、肠、肠胃外;肌内、皮下、真皮内、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、眼内、吸入、吹入、局部、皮肤、透皮或动脉内。

[0192] 本发明提供了用于施用(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)的方法,所述方法包括将蛋白质引入受试者体内。例如,所述方法包括用注射器的针刺穿受试者的身体,并且将抗原结合蛋白注射到受试者的体内,例如,注射到受试者的静脉、动脉、肿瘤、肌肉组织或皮下组织。

[0193] 本发明提供了一种器皿(例如,塑料或玻璃小瓶,例如具有盖或色谱柱、空心孔针或注射器筒),所述器皿包括以下中的任何一个:(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)、多肽(例如,表1的HC、LC、V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>)或(例如,表2的)多核苷酸或本文所示的载体或包括药学上可接受的载体的其药物组合物。

[0194] 在本公开的实施例中,本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)与一个或多个另外的治疗剂组合施用。另外的治疗剂包含但不限于:抗炎剂;抗疟疾剂;特异性结合TMPRSS2的第二抗体或其抗原结合片段;和与CoV-S特异性结合的第二抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,所述抗疟疾剂是氯喹或羟化氯喹。在一些实施例中,所述抗炎剂是抗体,如萨瑞鲁单抗、托珠单抗或吉西鲁单抗。在一些实施例中,另外的治疗剂是本文所公开的(例如,表1的)第二抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,表1的一个、两个、三个、四个或更多个抗体或其抗原结合片段可以组合(例如,同时或顺序地)施

用。表1的抗体的具体组合在下文的示例性抗体组合表中列出(每个编号表示特定组合,例如mAb10989和mAb10987是组合1,mAb10989和mAb10934是组合2,以此类推)。在一些实施例中,抗体的组合可以选自与不同的表位簇结合的那些抗体。例如,本文所描述的某些抗体属于如下的表位簇:簇1,mAb10987、mAb10922、mAb10936和mAb10934;簇2,mAb10989、mAb10977和mAb10933;簇3,mAb10920;簇4,mAb10954、mAb10986和mAb10964;和簇5,mAb10984。因此,两个抗体的组合可以选自例如簇1和簇2、簇1和簇3、簇1和簇4、簇1和簇5、簇2和簇3、簇2和簇4、簇2和簇5、簇3和簇4、簇3和簇5以及簇4和簇5。在一些实施例中,特异性结合TMPRSS2的抗体是H1H7017N,如国际专利公开号W0/2019/147831号中所描述的。

[0195] 示例性抗体组合表

	mAb 10989	mAb 10987	mAb 10934	mAb 10933	mAb 10920	mAb 10922	mAb 10936	mAb 10954	mAb 10964	mAb 10977	mAb 10984	mAb 10986
mAb 10989	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
mAb 10987	12	X	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
mAb 10934	23	24	X	25	26	27	28	29	30	31	32	33
mAb 10933	34	35	36	X	37	38	39	40	41	42	43	44
mAb 10920	45	46	47	48	X	49	50	51	52	53	54	55
mAb 10922	56	57	58	59	60	X	61	62	63	64	65	66
mAb 10936	67	68	69	70	71	72	X	73	74	75	76	77
mAb 10954	78	79	80	81	82	83	84	X	85	86	87	88
mAb 10964	89	90	91	92	93	94	95	96	X	97	98	99
mAb 10977	100	101	102	103	104	105	106	107	108	X	109	110
mAb 10984	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	X	121
mAb 10986	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	X

[0196] 在一些实施例中,来自不同人供体的抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗SARS-CoV-2-S抗体或其抗原结合片段)可以组合。本发明包含一种包括来自人受试者的可变结构域的两个(或更多个)抗SARS-CoV-2-S抗体或抗原结合片段的组合物,其中所述两个(或更多个)抗体或抗原结合片段衍生自不同的受试者(例如,两个不同的人受试者)。衍生自人B细胞的抗体可变区在例如实例1和2(表3)中进行了讨论,其描述了克隆自此类B细胞的可变结构域与并非来自那些B细胞的恒定区组合以产生杂交抗体。此类抗体可变区的来源(供体)在下文的示例性人源性抗体可变区表中示出。在一些实施例中,组合物可以包括具有衍生自供体1的可变结构域的抗体或其抗原结合片段和具有衍生自供体2的可变结构域的抗体或其抗原结合片段的组合。在一些实施例中,组合物可以包括具有衍生自供体1的可变结构域的抗体或其抗原结合片段和具有衍生自供体3的可变结构域的抗体或其抗原结合片段的组合。在一些实施例中,组合物可以包括具有衍生自供体2的可变结构域的抗体或其抗原结

合片段和具有衍生自供体3的可变结构域的抗体或其抗原结合片段的组合。在一些实施例中,组合物可以包括来自供体1的mAb10987(例如,包括表1中所示出的CDR、可变区或重链和轻链序列的抗体)和来自供体3的mAb10989(例如,包括表1中所示出的CDR、可变区或重链和轻链序列的抗体)的组合。

[0199] 示例性人源性抗体可变区表

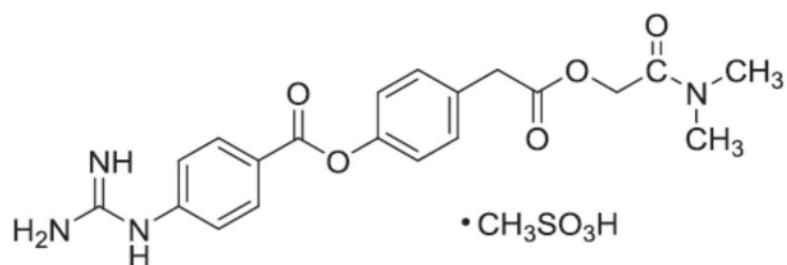
	<b>mAb</b>	<b>供体</b>
[0200]	mAb10954	供体 3
	mAb10955	供体 3
	mAb10956	供体 3
	mAb10957	供体 3
	mAb10964	供体 1
	mAb10965	供体 2
	mAb10966	供体 3
	mAb10967	供体 3
	mAb10970	供体 1
[0201]	mAb10971	供体 1
	mAb10977	供体 1
	mAb10984	供体 1
	mAb10985	供体 1
	mAb10986	供体 1
	mAb10987	供体 1
	mAb10988	供体 3
	mAb10989	供体 3
	mAb10969	供体 1

[0202] 在一些实施例中,所述另外的治疗剂是抗病毒药和/或疫苗。如本文所使用的,术语“抗病毒药”是指用于治疗、预防或减轻受试者的病毒感染的任何抗感染药。术语“抗病毒药”包含但不限于阳离子类固醇抗菌剂、亮抑酶肽、抑肽酶、利巴韦林(ribavirin)或干扰素- $\alpha$ 2b。用于通过与作为本发明的一部分的另外的治疗剂组合施用表1的抗体或抗原结合片段来治疗或预防需要所述治疗或预防的受试者的病毒(例如,冠状病毒)感染的方法。

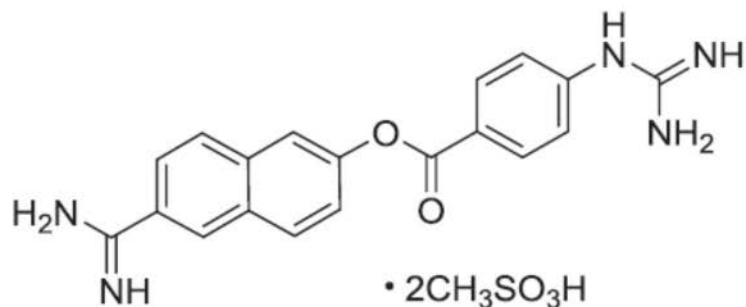
[0203] 例如,在本发明的实施例中,所述另外的治疗剂是疫苗,例如冠状病毒疫苗。在本发明的实施例中,疫苗是灭活/杀伤病毒疫苗、减毒活病毒疫苗或病毒亚基疫苗。

[0204] 例如,在本发明的实施例中,所述另外的治疗剂是:

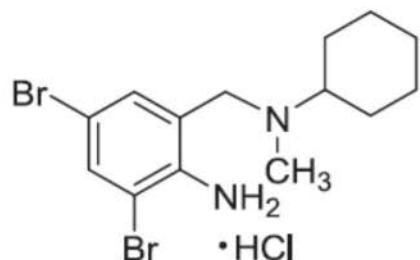
[0205]



(卡莫他特甲磺酸盐);

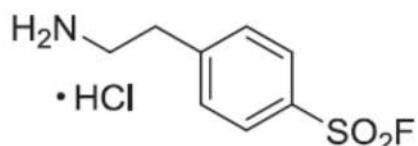


(萘莫司他甲磺酸盐);

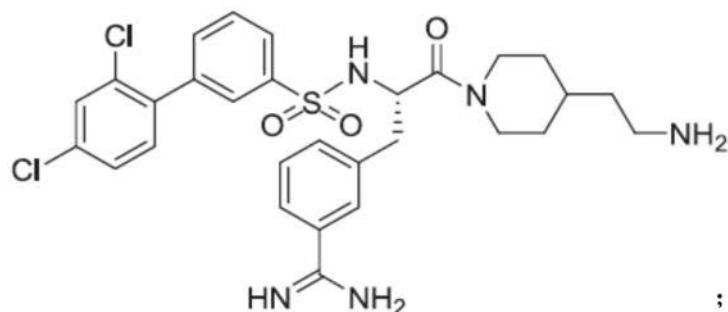


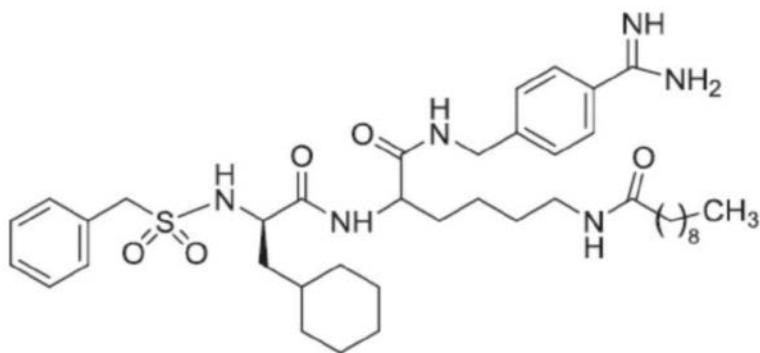
[0206]

(盐酸溴己新 (BHH));



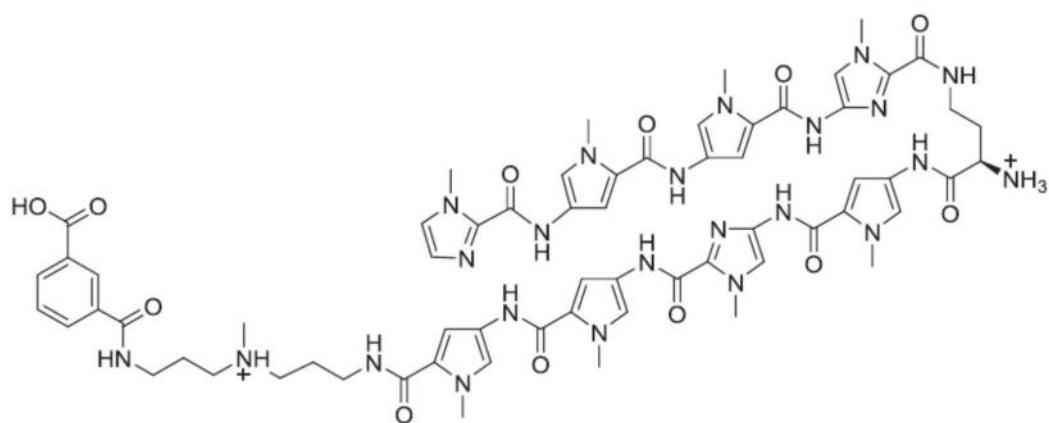
(4-(2-氨基甲基)苯磺酰氟盐酸盐 (AEBSF));





；或

[0207]



[0208] (聚酰胺)。参见Shen等人《生物化学 (Biochimie)》142:1-10 (2017)。

[0209] 在本发明的实施例中,所述抗病毒药是与冠状病毒(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS-CoV)特异性结合的抗体或抗原结合片段。示例性抗CoV-S抗体包含但不限于:H4sH15188P;H1H15188P;H1H15211P;H1H15177P;H4sH15211P;H1H15260P2;H1H15259P2;H1H15203P;H4sH15260P2;H4sH15231P2;H1H15237P2;H1H15208P;H1H15228P2;H1H15233P2;H1H15264P2;H1H15231P2;H1H15253P2;H1H15215P;以及H1H15249P2(如国际专利申请公开号WO/2015/179535中所示的)或其抗原结合片段,例如其中所述抗体或片段包括包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3(例如,其V<sub>L</sub>或轻链)的轻链免疫球蛋白;以及包含任何前述抗CoV-S抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3(例如,其V<sub>H</sub>或其重链)的重链。

[0210] 在本发明的某些实施例中,所述另外的治疗剂不是抑肽素、亮抑酶肽、阳离子类固醇抗菌剂、流感疫苗(例如,杀伤、活、减毒全病毒或亚基疫苗)或针对流感病毒的抗体(例如,抗血凝素抗体)。

[0211] 术语“与……组合”指示可以将本发明的组分、抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)与另一种试剂一起调配成单个组合物例如以进行同时递送,或单独地调配成两种或更多种组合物(例如,试剂盒)。可以在与施用其它组分不同的时间将每种组分施用于受试者;例如,每次施用可以在给定的时间间隔内非同时(例如,分别或按照顺序)给予。此外,单独的组分可以通过相同途径或通过不同途径施用于受试者(例如,其中抗CoV-S抗体或其抗原结合片段)。

[0212] 试剂盒

[0213] 另外提供了包括与包含但不限于如本文所讨论的另外的治疗剂的一个或多个另外的组分组合的包含但不限于如本文所讨论的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)的一个或多个组分的试剂盒。抗原结合蛋白和/或另外的治疗剂可以

被调配为单个组合物或以两个或更多个组合物(例如,与药学上可接受的载体)单独地调配在药物组合物中。

[0214] 在本发明的一个实施例中,所述试剂盒在一个容器(例如,无菌玻璃或塑料小瓶)中包含本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)或其药物组合物并且在另一个容器(例如,无菌玻璃或塑料小瓶)中包含另外的治疗剂。

[0215] 在另一个实施例中,所述试剂盒包括本发明的组合,所述组合在单个共用容器中包含任选地一起调配在药物组合物中的本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)或其药物组合物以及一个或多个另外的治疗剂。

[0216] 如果试剂盒包含用于向受试者进行肠胃外施用的药物组合物,则所述试剂盒可以包含用于进行此类施用的装置(例如,注射装置)。例如,所述试剂盒可以包含一个或多个皮下注射针或如上文所讨论的含有本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)的其它注射装置。

[0217] 试剂盒可以包含包装插入物(package insert),所述包装插入物包含关于试剂盒中的药物组合物和剂型的信息。通常,此类信息帮助患者和医师有效地且安全地使用包封的药物组合物和剂型。例如,可以在插入物中提供关于本发明的组合的以下信息:药代动力学、药效学、临床研究、功效参数、适应症和用法、禁忌症、警告、注意事项、不良反应、过剂量、合适的剂量和施用、如何供应、合适的储存条件、参考资料、制造商/经销商信息和专利信息。

[0218] 抗体的诊断用途

[0219] 本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)可以用于检测和/或测量样品中的CoV-S。针对CoV-S的示例性测定可以包含例如使样品与本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白接触,其中所述抗CoV-S抗原结合蛋白标记有可检测标记或报告基因分子或用作捕获配体以选择性地将CoV-S从样品分离。与CoV-S复合的抗CoV-S抗原结合蛋白的存在指示CoV-S存在于样品中。可替代地,未经标记的抗CoV-S抗体可以与本身被可检测标记的第二抗体组合使用。可检测的标记或报告基因分子可以是如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>125</sup>I等放射性同位素;荧光或化学发光部分,如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或酶,如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可以用于检测或测量样品中的CoV-S的具体示例性测定包含中和测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选(FACS)。因此,本发明包含用于检测样品中的纤突蛋白多肽的存在的方法,所述方法包括使样品与抗CoV-S抗原结合蛋白接触以及检测CoV-S/抗CoV-S抗原结合蛋白的存在,其中复合物的存在指示CoV-S的存在。

[0220] 本发明的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白可以在用于检测样品中的CoV-S或其片段的存在的蛋白质印迹或免疫蛋白质印迹程序中使用。此种程序形成本发明的一部分并且包含例如以下步骤:

[0221] (1) 提供包括要针对CoV-S的存在进行测试的样品的膜或其它固体基质,例如任选地包含使用本领域已知的方法(例如,半干印迹或罐印迹)将来自要针对CoV-S的存在进行测试的样品(例如,来自对样品中的蛋白质进行PAGE或SDS-PAGE电泳分离)的蛋白质转移到膜或其它固体基质上;以及使要针对CoV-S的存在进行测试的膜或其它固体基质或其片段与本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白接触。

[0222] 此类膜可以采用要针对CoV-S在非变性PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)凝胶或SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)凝胶中的存在进行测试的蛋白质(例如,在凝胶中的电泳分离后)已经转移到其的基于硝化纤维或乙烯基(例如,聚偏二氟乙烯(PVDF))的膜的形式。在使所述膜与抗CoV-S抗原结合蛋白接触之前,任选地用例如无脂干奶等阻断膜,以便结合膜上的非特异性蛋白质结合位点。

[0223] (2) 将所述膜洗涤一次或多次以将未结合的抗CoV-S抗原结合蛋白和其它未结合的物质去除;以及

[0224] (3) 检测结合的抗CoV-S抗原结合蛋白。

[0225] 检测结合的抗原结合蛋白指示CoV-S蛋白在所述膜或基质上和在所述样品中呈递。检测结合的抗原结合蛋白可以通过使抗原结合蛋白与可检测地标记的第二抗体(抗免疫球蛋白抗体)结合、并且然后检测第二抗体标记的存在来进行。

[0226] 本文所公开的(例如,表1的)抗CoV-S抗原结合蛋白(例如,抗体和抗原结合片段)也可以用于进行免疫组织化学。此种方法形成本发明的一部分并且包括例如

[0227] (1) 使要针对CoV-S蛋白的存在进行测试的组织与本发明的抗CoV-S抗原结合蛋白接触;以及

[0228] (2) 在所述组织上或中检测抗原结合蛋白。

[0229] 如果抗原结合蛋白自身可检测地标记,则可以直接检测到其。可替代地,抗原结合蛋白可以通过可检测地标记的第二抗体结合,其中然后检测所述标记。

[0230] 实例

[0231] 提出以下实例,以向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是其发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,份数是重量份数,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,室温是约25°C,并且压力为大气压或接近大气压。

[0232] 实例1:针对SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)的人抗体的产生

[0233] 在包括对人免疫球蛋白重链可变区和κ轻链可变区或人免疫球蛋白重链可变区和λ轻链可变区的进行编码DNA的VELOCIMMUNE®小鼠中产生针对SARS-CoV-2纤突蛋白(SARS-CoV-2-S)的人抗体。用表达SARS-CoV-2-S受体结合结构域(RBD)(NCBI登录号(MN908947.3)SEQ ID NO:832的氨基酸1-1273)的载体、然后用带有SARS-CoV-2-S载体或SARS-CoV-2-S蛋白的增强剂使每个小鼠产生免疫。由SARS-CoV-2-S特异性免疫测定来监测抗体免疫应答。当达到期望的免疫应答时,收获淋巴细胞并使其与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生SARS-CoV-2-S特异性抗体的细胞系。如美国专利7582298所描述的,抗SARS-CoV-2-S抗体直接从抗原阳性的小鼠B细胞中分离,而不与骨髓瘤细胞融合,所述专利通过全文引用的方式并入。使用这种方法,获得了完全人抗SARS-CoV-2-S抗体(即,具有人可变结构域和人恒定结构域的抗体)。

[0234] 将抗体可变区从人血液样品分离。实验室确认SARS-CoV-2和症状性COVID-19疾病的PCR测试为阳性后3-4周,采集患者全血。使用基于氯化铵的裂解缓冲液(生命技术公司(Life Technologies))裂解红细胞,并通过阴性选择富集B细胞。通过荧光活化细胞分选(FACS)分离结合SARS-CoV-2纤突蛋白的单个B细胞。将分离的B细胞单孔铺板并与抗体轻和

重可变区域特异性PCR引物混合。每个B细胞的cDNA通过逆转录酶(RT)反应合成。然后将每个所产生的RT产物分离并转移到两个对应的孔中以用于后续的抗体重链和轻链PCR。首先将一组所产生的RT产物通过使用对抗体重可变区前导序列具有特异性的5'简并引物或对抗体轻链可变区前导序列具有特异性的5'简并引物和对抗体恒定区具有特异性的3'引物的PCR进行扩增以形成扩增子。然后将扩增子通过使用对抗体重可变区构架1具有特异性的5'简并引物或对抗体轻链可变区构架1具有特异性的5'简并引物和对抗体恒定区具有特异性的3'引物的PCR再次进行扩增以产生用于进行克隆的扩增子。将抗体重链和轻链衍生的PCR产物分别克隆到含有重恒定区和轻恒定区的表达载体中,由此产生杂交抗体的表达载体。将表达全长重和轻链对的表达载体转染到CHO细胞以产生抗体蛋白以进行测试。

[0235] 根据这个实例的方法产生的示例性抗体的生物学性质在下文所示的实例中详细描述。

[0236] 实例2:重链和轻链可变区氨基酸和核苷酸序列

[0237] 表1示出了示例性抗SARS-CoV-2-S抗体的重链和轻链可变区和CDR以及重链和轻链序列的氨基酸序列标识符。相应的核酸序列标识符列于表2中。

[0238] 表1:氨基酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO									
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HC	LC
mAb10913	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
mAb10915	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
mAb10916	2	4	6	8	10	12	14	16	42	20
mAb10917	44	46	26	49	51	53	55	57	59	61
mAb10918	22	24	26	28	30	32	34	36	63	40
mAb10920	65	67	69	71	73	75	55	77	79	81
mAb10921	83	85	26	87	89	91	55	93	95	97
mAb10922	99	101	103	105	107	109	111	113	115	117
mAb10923	119	121	123	125	127	129	55	131	133	135
mAb10924	137	139	141	143	145	147	149	151	153	155
mAb10925	65	67	69	71	73	75	55	77	157	81
mAb10926	83	85	26	87	89	91	55	93	159	97
mAb10927	99	101	103	105	107	109	111	113	161	117
mAb10928	119	121	123	125	127	129	55	131	163	135
mAb10929	137	139	141	143	145	147	149	151	165	155
mAb10930	167	169	171	173	175	129	55	177	179	181
mAb10931	167	169	171	173	175	129	55	177	183	181
mAb10932	185	187	26	189	191	75	194	196	198	200
mAb10933	202	204	206	208	210	212	55	214	216	218
mAb10934	220	222	224	226	228	230	194	232	234	236
mAb10935	238	24	26	240	242	244	194	246	248	250
mAb10936	252	254	256	258	260	129	55	262	264	266
mAb10937	268	270	272	274	276	129	55	278	280	282
mAb10940	284	169	286	288	290	292	294	296	298	300
mAb10938	302	24	26	304	306	308	194	310	312	314
mAb10939	316	187	319	321	323	325	55	327	329	331

[0239]

[0240]

mAb10941	333	85	26	336	338	340	294	296	342	344
mAb10942	185	187	26	189	191	75	194	196	346	200
mAb10943	202	204	206	208	210	212	55	214	348	218
mAb10944	220	222	224	226	228	230	194	232	350	236
mAb10945	238	24	26	240	242	244	194	246	352	250
mAb10946	252	254	256	258	260	129	55	262	354	266
mAb10947	268	270	272	274	276	129	55	278	356	282
mAb10948	302	24	26	304	306	308	194	310	358	314
mAb10949	316	187	319	321	323	325	55	327	360	331
mAb10951	333	85	26	336	338	340	294	296	362	344
mAb10950	284	169	286	288	290	292	294	296	364	300
mAb10954	366	85	26	370	372	244	194	375	377	379
mAb10955	381	383	26	385	387	389	194	310	392	394
mAb10956	396	187	26	399	401	389	194	403	405	407
mAb10957	409	411	26	414	416	53	55	418	420	422
mAb10958	366	85	26	370	372	244	194	375	424	379
mAb10959	381	383	26	385	387	389	194	310	426	394
mAb10960	396	187	26	399	401	389	194	403	428	407
mAb10961	409	411	26	414	416	53	55	418	430	422
mAb10964	432	434	436	438	440	442	55	445	447	449
mAb10965	451	453	26	455	457	459	34	462	464	466
mAb10966	468	187	26	470	472	389	194	474	476	478
mAb10967	480	24	483	485	487	389	194	489	491	493
mAb10969	495	497	499	501	503	389	194	214	506	508
mAb10970	510	24	26	512	514	516	194	518	520	522
mAb10971	524	411	26	528	530	532	55	534	536	538
mAb10973	432	434	436	438	440	442	55	445	540	449
mAb10974	451	453	26	455	457	459	34	462	542	466
mAb10975	468	187	26	470	472	389	194	474	544	478
mAb10976	480	24	483	485	487	389	194	489	546	493
mAb10977	548	550	552	554	556	558	294	560	562	564
mAb10978	495	497	499	501	503	389	194	214	566	508
mAb10979	510	24	26	512	514	516	194	518	568	522
mAb10980	524	411	26	528	530	532	55	534	570	538
mAb10981	548	550	552	554	556	558	294	560	572	564
mAb10982	574	187	576	578	580	582	584	586	588	590
mAb10983	574	187	576	578	580	582	584	586	592	590
mAb10984	594	596	26	598	600	12	14	602	604	606
mAb10985	608	169	610	612	614	616	584	618	620	622
mAb10986	624	626	26	628	630	582	632	634	636	638
mAb10987	640	642	499	644	646	648	650	652	654	656
mAb10988	658	660	662	664	666	668	670	672	674	676
mAb10989	678	680	682	684	686	688	650	690	692	694
mAb10990	594	596	26	598	600	12	14	602	696	606
mAb10991	608	169	610	612	614	616	584	618	698	622
mAb10992	624	626	26	628	630	582	632	634	700	638
mAb10993	640	642	499	644	646	648	650	652	702	656
mAb10994	658	660	662	664	666	668	670	672	704	676

[0241]

mAb10995	678	680	682	684	686	688	650	690	706	694
mAb10996	708	24	26	711	713	129	55	715	717	719
mAb10997	708	24	26	711	713	129	55	715	721	719
mAb10998	723	187	26	725	727	129	55	729	731	733
mAb10999	723	187	26	725	727	129	55	729	735	733
mAb11000	737	24	26	739	741	743	55	745	747	749
mAb11001	737	24	26	739	741	743	55	745	751	749
mAb11002	753	24	26	755	713	129	55	715	757	719
mAb11003	753	24	26	755	713	129	55	715	759	719
mAb10914	44	46	26	49	51	53	55	57	762	61
mAb11004	764	766	499	768	770	91	55	772	774	776
mAb11005	764	766	499	768	770	91	55	772	778	776
mAb11006	780	782	26	784	786	53	55	788	790	792
mAb11007	780	782	26	784	786	53	55	788	794	792
mAb11008	796	24	26	798	800	53	55	802	804	806
mAb11009	796	24	26	798	800	53	55	802	808	806
mAb11010	810	812	814	816	818	129	820	822	824	826
mAb11011	810	812	814	816	818	129	820	822	828	826

[0242]

表2:核酸序列标识符

[0243]

抗体名称	SEQ ID NO									
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HC	LC
mAb10913	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
mAb10915	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39
mAb10916	1	3	5	7	9	11	13	15	41	19
mAb10917	43	45	47	48	50	52	54	56	58	60
mAb10918	21	23	25	27	29	31	33	35	62	39
mAb10920	64	66	68	70	72	74	54	76	78	80
mAb10921	82	84	47	86	88	90	54	92	94	96
mAb10922	98	100	102	104	106	108	110	112	114	116
mAb10923	118	120	122	124	126	128	54	130	132	134
mAb10924	136	138	140	142	144	146	148	150	152	154
mAb10925	64	66	68	70	72	74	54	76	156	80
mAb10926	82	84	47	86	88	90	54	92	158	96
mAb10927	98	100	102	104	106	108	110	112	160	116
mAb10928	118	120	122	124	126	128	54	130	162	134
mAb10929	136	138	140	142	144	146	148	150	164	154
mAb10930	166	168	170	172	174	128	54	176	178	180
mAb10931	166	168	170	172	174	128	54	176	182	180
mAb10932	184	186	47	188	190	192	193	195	197	199
mAb10933	201	203	205	207	209	211	54	213	215	217
mAb10934	219	221	223	225	227	229	193	231	233	235
mAb10935	237	23	47	239	241	243	193	245	247	249
mAb10936	251	253	255	257	259	128	54	261	263	265
mAb10937	267	269	271	273	275	128	54	277	279	281
mAb10940	283	168	285	287	289	291	293	295	297	299

mAb10938	301	23	47	303	305	307	193	309	311	313
mAb10939	315	317	318	320	322	324	54	326	328	330
mAb10941	332	334	47	335	337	339	293	295	341	343
mAb10942	184	186	47	188	190	192	193	195	345	199
mAb10943	201	203	205	207	209	211	54	213	347	217
mAb10944	219	221	223	225	227	229	193	231	349	235
mAb10945	237	23	47	239	241	243	193	245	351	249
mAb10946	251	253	255	257	259	128	54	261	353	265
mAb10947	267	269	271	273	275	128	54	277	355	281
mAb10948	301	23	47	303	305	307	193	309	357	313
mAb10949	315	317	318	320	322	324	54	326	359	330
mAb10951	332	334	47	335	337	339	293	295	361	343
mAb10950	283	168	285	287	289	291	293	295	363	299
mAb10954	365	367	368	369	371	373	193	374	376	378
mAb10955	380	382	47	384	386	388	193	390	391	393
mAb10956	395	397	47	398	400	388	193	402	404	406
mAb10957	408	410	412	413	415	52	54	417	419	421
mAb10958	365	367	368	369	371	373	193	374	423	378
mAb10959	380	382	47	384	386	388	193	390	425	393
mAb10960	395	397	47	398	400	388	193	402	427	406
mAb10961	408	410	412	413	415	52	54	417	429	421
mAb10964	431	433	435	437	439	441	443	444	446	448
mAb10965	450	452	47	454	456	458	460	461	463	465
mAb10966	467	397	412	469	471	388	193	473	475	477
mAb10967	479	481	482	484	486	388	193	488	490	492
mAb10969	494	496	498	500	502	388	193	504	505	507
mAb10970	509	481	412	511	513	515	193	517	519	521
mAb10971	523	525	526	527	529	531	54	533	535	537
mAb10973	431	433	435	437	439	441	443	444	539	448
mAb10974	450	452	47	454	456	458	460	461	541	465
mAb10975	467	397	412	469	471	388	193	473	543	477
mAb10976	479	481	482	484	486	388	193	488	545	492
mAb10977	547	549	551	553	555	557	293	559	561	563
mAb10978	494	496	498	500	502	388	193	504	565	507
mAb10979	509	481	412	511	513	515	193	517	567	521
mAb10980	523	525	526	527	529	531	54	533	569	537
mAb10981	547	549	551	553	555	557	293	559	571	563
mAb10982	573	186	575	577	579	581	583	585	587	589
mAb10983	573	186	575	577	579	581	583	585	591	589
mAb10984	593	595	47	597	599	11	13	601	603	605
mAb10985	607	168	609	611	613	615	583	617	619	621
mAb10986	623	625	47	627	629	581	631	633	635	637
mAb10987	639	641	498	643	645	647	649	651	653	655
mAb10988	657	659	661	663	665	667	669	671	673	675
mAb10989	677	679	681	683	685	687	649	689	691	693
mAb10990	593	595	47	597	599	11	13	601	695	605
mAb10991	607	168	609	611	613	615	583	617	697	621
mAb10992	623	625	47	627	629	581	631	633	699	637

[0244]

[0245]

mAb10993	639	641	498	643	645	647	649	651	701	655
mAb10994	657	659	661	663	665	667	669	671	703	675
mAb10995	677	679	681	683	685	687	649	689	705	693
mAb10996	707	709	47	710	712	128	54	714	716	718
mAb10997	707	709	47	710	712	128	54	714	720	718
mAb10998	722	186	47	724	726	128	54	728	730	732
mAb10999	722	186	47	724	726	128	54	728	734	732
mAb11000	736	23	47	738	740	742	54	744	746	748
mAb11001	736	23	47	738	740	742	54	744	750	748
mAb11002	752	23	47	754	712	128	54	714	756	718
mAb11003	752	23	47	754	712	128	54	714	758	718
mAb10914	760	45	47	48	50	52	54	56	761	60
mAb11004	763	765	498	767	769	90	54	771	773	775
mAb11005	763	765	498	767	769	90	54	771	777	775
mAb11006	779	781	47	783	785	52	54	787	789	791
mAb11007	779	781	47	783	785	52	54	787	793	791
mAb11008	795	709	47	797	799	52	54	801	803	805
mAb11009	795	709	47	797	799	52	54	801	807	805
mAb11010	809	811	813	815	817	128	819	821	823	825
mAb11011	809	811	813	815	817	128	819	821	827	825

[0246] 虽然本文所公开的抗体具有完全人可变区,但是可以具有小鼠恒定区(例如,小鼠IgG1Fc或小鼠IgG2 Fc(a或b同种型))或人恒定区(例如,人IgG1 Fc或人IgG4 Fc)。如本领域普通技术人员所理解的,具有特定Fc同种型的抗体可以转化为具有不同Fc同种型的抗体(例如,具有小鼠IgG1 Fc的抗体可以转化为具有人IgG4的抗体等),但无论如何,由表1和2中所示出的数字标识符指示的可变结构域(包含CDR)将保持相同,并且无论恒定结构域的性质如何,预期抗原的结合性质相同或基本上类似。

[0247] 通过下一代测序对衍生自VELOCIMMUNE®小鼠和衍生自人样品的抗体的可变区进行测序,并鉴定重链和轻链对的组库(图10A和图10B)。VI抗体的主要谱系使用与VK1-9、VK1-33或VK1-39配对的VH3-53,而人源性抗体使用与VK1-33配对的VH3-66或与VK1-39配对的VH2-70。对重叠序列的进一步分析示出VI与人源性抗体之间的分离的κ链的组库中的较强重叠。尽管λ链的组库并没有很好地重叠,这可能是由于这个试验中仅包含两只λ小鼠。VI与人源性抗体的重链的平均CDR长度类似,平均长度分别为13个和14.5个氨基酸。VI和人源性抗体的平均κCDR长度同为9个氨基酸并且接近平均长度分别为11.1个和10.6个氨基酸的λ链。人源化小鼠和人源性抗体的可用性允许更多的V基因的多样性,并且使得能够随后对非竞争抗体进行鉴定。

[0248] 如上文所描述的,从以下来源获得抗体:从产生自VELOCIMMUNE®小鼠的杂交瘤、通过从抗原阳性的VELOCIMMUNE®小鼠B细胞直接分离或衍生自从抗原阳性人B细胞克隆的可变区。这些来源的总结在表3中示出。

[0249] 表3:抗体/可变区来源

[0250]

抗体	来源
mAb10913	小鼠 B 细胞
mAb10915	小鼠 B 细胞
mAb10916	小鼠 B 细胞
mAb10917	小鼠 B 细胞
mAb10918	小鼠 B 细胞
mAb10920	小鼠 B 细胞
mAb10921	小鼠 B 细胞
mAb10922	小鼠 B 细胞
mAb10923	小鼠 B 细胞
mAb10924	小鼠 B 细胞
mAb10925	小鼠 B 细胞
mAb10926	小鼠 B 细胞
mAb10927	小鼠 B 细胞
mAb10928	小鼠 B 细胞
mAb10929	小鼠 B 细胞
mAb10930	小鼠 B 细胞
mAb10931	小鼠 B 细胞
mAb10932	小鼠 B 细胞
mAb10933	小鼠 B 细胞
mAb10934	小鼠 B 细胞
mAb10935	小鼠 B 细胞
mAb10936	小鼠 B 细胞
mAb10937	小鼠 B 细胞
mAb10940	小鼠 B 细胞
mAb10938	小鼠 B 细胞
mAb10939	小鼠 B 细胞
mAb10941	小鼠 B 细胞
mAb10942	小鼠 B 细胞
mAb10943	小鼠 B 细胞
mAb10944	小鼠 B 细胞
mAb10945	小鼠 B 细胞
mAb10946	小鼠 B 细胞
mAb10947	小鼠 B 细胞
mAb10948	小鼠 B 细胞
mAb10949	小鼠 B 细胞
mAb10951	小鼠 B 细胞
mAb10950	小鼠 B 细胞

[0251]

mAb10954	人 B 细胞
mAb10955	人 B 细胞
mAb10956	人 B 细胞
mAb10957	人 B 细胞
mAb10958	人 B 细胞
mAb10959	人 B 细胞
mAb10960	人 B 细胞
mAb10961	人 B 细胞
mAb10964	人 B 细胞
mAb10965	人 B 细胞
mAb10966	人 B 细胞
mAb10967	人 B 细胞
mAb10969	人 B 细胞
mAb10970	人 B 细胞
mAb10971	人 B 细胞
mAb10973	人 B 细胞
mAb10974	人 B 细胞
mAb10975	人 B 细胞
mAb10976	人 B 细胞
mAb10977	人 B 细胞
mAb10978	人 B 细胞
mAb10979	人 B 细胞
mAb10980	人 B 细胞
mAb10981	人 B 细胞
mAb10982	小鼠 B 细胞
mAb10983	小鼠 B 细胞
mAb10984	人 B 细胞
mAb10985	人 B 细胞
mAb10986	人 B 细胞
mAb10987	人 B 细胞
mAb10988	人 B 细胞
mAb10989	人 B 细胞
mAb10990	人 B 细胞
mAb10991	人 B 细胞
mAb10992	人 B 细胞
mAb10993	人 B 细胞
mAb10994	人 B 细胞
mAb10995	人 B 细胞
mAb10996	杂交瘤
mAb10997	杂交瘤
mAb10998	杂交瘤
mAb10999	杂交瘤
mAb11000	杂交瘤

[0252]

mAb11001	杂交瘤
mAb11002	杂交瘤
mAb11003	杂交瘤
mAb10914	小鼠 B 细胞
mAb11004	杂交瘤
mAb11005	杂交瘤
mAb11006	杂交瘤
mAb11007	杂交瘤
mAb11008	杂交瘤
mAb11009	杂交瘤
mAb11010	杂交瘤
mAb11011	杂交瘤

[0253] 实例3:通过结合ELISA表征杂交瘤上清液

[0254] 进行ELISA结合测定以鉴定与SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域(RBD)结合的抗体上清液。将由在C端处用6X组氨酸标签和两个myc表位标签(SARS-CoV-2-S-RBD-mmH;另请参见NCBI登录号MN908947.3)表达的SARS-CoV-2的RBD(氨基酸319-541)组成的蛋白质在4℃下在PBS缓冲液中以1μg/ml涂覆在96孔板上过夜。随后使用0.5% (w/v) 的含BSA的PBS的溶液阻断非特异性结合位点。仅将抗体上清液或培养基在PSA+0.5% BSA阻断缓冲液中以1:40或1:50稀释,并转移到经过洗涤的微量滴定板。在室温下温育一小时后,将孔洗涤,并用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗人IgG抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司(Jackson Immunoresearch))或与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗小鼠IgG抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)检测板结合的上清液。然后根据制造商的建议使用TMB底物溶液(BD生物科学公司)对板进行显影,并在Victor X5读板仪上测量450nm处的吸光度。

[0255] 如上文所描述的,在SARS-CoV-2-S-RBD-mmH蛋白涂覆在微板的情况下,使用结合ELISA法评估抗SARS-CoV-2-S抗体结合SARS-CoV-2-S的受体结合结构域(SARS-CoV-2-S-RBD)的能力。用HRP缀合的抗-hFc或抗-mFc抗体检测与涂覆在96孔微量滴定板上的SARS-CoV-2-S-RBD-mmH结合的单点抗体上清液。

[0256] 三个试验的结合结果汇总于表4中。指示了SARS-CoV-2结合信号(吸光度450nm),每个实验提供仅培养基背景作为阴性参考。标记有IC(不确定)的样品的板具有实验异常,并且因此所述样品报告为无值。如与仅培养基对照比较所示出的,测试的上清液显示出与SARS-CoV-2-S-RBD的大量结合。

[0257] 表4:上清液与SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域的结合

[0258]

上清液	上清液稀释度	检测抗体	结合信号 (450 nm 处的吸光度)
mAb10913	1:50	a-hFc	2.752
mAb10914	1:50	a-hFc	2.857
mAb10915	1:50	a-hFc	2.76
mAb10932	1:50	a-hFc	2.718
mAb10933	1:50	a-hFc	2.762
mAb10934	1:50	a-hFc	2.688
mAb10935	1:50	a-hFc	2.676
mAb10936	1:50	a-hFc	2.644
mAb10937	1:50	a-hFc	2.664
mAb10920	1:50	a-hFc	2.683
mAb10921	1:50	a-hFc	2.633
mAb10922	1:50	a-hFc	2.595
mAb10923	1:50	a-hFc	2.353
mAb10924	1:50	a-hFc	2.269
mAb10930	1:50	a-hFc	2.451
mAb10938	1:50	a-hFc	2.536
mAb10939	1:50	a-hFc	2.516
mAb10940	1:50	a-hFc	2.77
mAb10941	1:50	a-hFc	IC
mAb10982	1:50	a-hFc	2.537
mAb10984	1:50	a-hFc	0.716
mAb10985	1:50	a-hFc	2.35
mAb10986	1:50	a-hFc	2.331
mAb10987	1:50	a-hFc	2.438
mAb10988	1:50	a-hFc	3.062
mAb10989	1:50	a-hFc	3.116
mAb10969	1:50	a-hFc	2.629
mAb10970	1:50	a-hFc	2.807
mAb10971	1:50	a-hFc	3.052
mAb10964	1:50	a-hFc	3.086
mAb10965	1:50	a-hFc	2.918
mAb10966	1:50	a-hFc	0.421
mAb10967	1:50	a-hFc	1.732
mAb10954	1:50	a-hFc	1.963
mAb10955	1:50	a-hFc	2.469
mAb10956	1:50	a-hFc	2.6
mAb10957	1:50	a-hFc	2.49
mAb10977	1:50	a-hFc	2.925
mAb11010	1:40	a-mFc	2.896
mAb11004	1:40	a-mFc	2.908
mAb11000	1:40	a-mFc	2.725
mAb11006	1:40	a-mFc	2.619

[0259]	mAb11008	1:40	a-mFc	2.907
	mAb10998	1:40	a-mFc	2.835
	mAb10996	1:40	a-mFc	2.826
	mAb11002	1:40	a-mFc	2.581
	仅培养基	1:50	a-hFc	0.069
	仅培养基	1:40	a-mFc	0.058
	仅培养基	1:50	a-hFc	0.055

[0260] 实例4:抗体与表达SARS-CoV-2-S的病毒样颗粒的结合

[0261] 为了研究一组抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体结合SARS-CoV-2纤突糖蛋白的能力,开发了在基于电化学发光的检测平台 (MSD) 中使用表达SARS-CoV-2纤突蛋白的病毒样颗粒 (VLP) 进行体外结合测定。

[0262] 为了瞬时表达SARS-CoV-2纤突蛋白 (NCBI登录号MN908947.3,氨基酸16-1211;SEQ ID NO:833),将缺乏糖蛋白G(VSVδG)的水泡性口炎病毒 (VSV) 用S-CoV-2纤突蛋白进行假型化 (VSV-SARS-CoV-2-S) 并在HEK293T细胞中产生。作为阴性结合对照,将VSVδG用VSV G蛋白 (VSV-G) 进行假型化。

[0263] 根据以下程序进行实验。将上文所描述的两种类型的VLP稀释于PBS中,接种到96孔碳电极板 (多阵列高结合板,MSD) 中,并在4℃下温育过夜,以允许VLP粘附。将非特异性结合位点在室温下用含2% BSA (w/v) 的PBS阻断1小时。将含有从SARS CoV-2免疫小鼠或受感染人血清产生的抗体的上清液以及在1x PBS+0.5% BSA缓冲液中以1:10或1:20稀释的仅培养基对照添加到板结合的颗粒。然后将板在室温下摇动温育1小时,然后使用AquaMax2000洗板机 (MDS分析技术公司 (MDS Analytical Technologies)) 将板用1x PBS洗涤以去除未结合的抗体。在室温下用SULFO-TAGTM缀合的抗人IgG抗体 (杰克逊免疫研究实验室有限公司) 或SULFO-TAGTM缀合的抗小鼠IgG抗体 (杰克逊免疫研究实验室有限公司) 对板结合的抗体进行1小时的检测。洗涤后,根据制造商建议的程序用读取缓冲液 (MSD) 对板进行显影,并用SECTOR成像仪600 (Meso Scale Development) 仪器记录发光信号。捕获直接结合信号 (在RLU中),并计算出表达SARS-CoV-2-S的VLP与无关VLP的比率。

[0264] 如上文所描述的,使用免疫结合测定评估抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体与表达SARS-CoV-2-S的VLP的结合相较于与无关的表达VSV的VLP结合的能力。用稀释度为1:10或1:20的抗体上清液对96孔高结合平板 (MSD) 上的固定的VLP进行单点结合,结合1小时,并使用SULFO-TAGTM缀合的抗人IgG或抗小鼠IgG抗体进行检测。将来自电化学发光的结合信号记录在Sector成像仪600 (MSD) 上。测定抗体与VLP的结合的RLU值。比较表达SARS-CoV-2-S的VLP结合信号与对照VLP来计算比率。

[0265] 来自三个实验的结合结果汇总于表5中。从表达SARS-COV-2-S的VLP观察到的信号指示结合,而与阴性VLP的比较则提供了相对背景。仅培养基样品提供了二级抗体与没有上清液的样品的结合的基线信号。在表达SARS-CoV-2-S的VLP上,46种抗体的特异性结合比仅培养基样品 (20-35RLU) 高出>4倍,结合信号的范围为85-13,600RLU。表达SARS-CoV-2-S的VSV:VSV-VLP (阴性对照) 的比率的范围为1.1-22.7,其中许多在VSV-VLP上具有高背景。mAb11002的比率为0.9可能是由于上清液样品中的单克隆抗体的浓度较低。

[0266] 表5:SARS-CoV-2-S VLP结合

上清液	上清液稀释度	二级检测抗体	VSV-VLP结合信号(RLU)	VSV-SARS-CoV-2-S VLP结合信号(RLU)	结合信号的比率: VSV-SARS-CoV-2-S/VSV-VLP
[0267]	mAb10913	1:10	a-hFc	2155	3244
	mAb10914	1:10	a-hFc	3885	5181
	mAb10915	1:10	a-hFc	980	9022
	mAb10932	1:10	a-hFc	989	10451
	mAb10933	1:10	a-hFc	507	966
	mAb10934	1:10	a-hFc	3876	5041
	mAb10935	1:10	a-hFc	2087	3867
	mAb10936	1:10	a-hFc	2325	8076
	mAb10937	1:10	a-hFc	1404	1920
	mAb10920	1:10	a-hFc	8366	10041
	mAb10921	1:10	a-hFc	1194	5436
	mAb10922	1:10	a-hFc	1473	2229
	mAb10923	1:10	a-hFc	1224	1859
	mAb10924	1:10	a-hFc	487	969
	mAb10930	1:10	a-hFc	1769	3207
	mAb10938	1:10	a-hFc	1232	6623
	mAb10939	1:10	a-hFc	1777	5074
	mAb10940	1:10	a-hFc	606	2072
	mAb10941	1:10	a-hFc	673	4588
	mAb10982	1:10	a-hFc	1178	2016
	mAb10984	1:10	a-hFc	2486	8989
	mAb10985	1:10	a-hFc	2049	3279
	mAb10986	1:10	a-hFc	2044	10831
	mAb10987	1:10	a-hFc	1839	2450
	mAb10988	1:10	a-hFc	1832	2305
	mAb10989	1:10	a-hFc	672	1999
	mAb10969	1:10	a-hFc	3096	3313
	mAb10970	1:10	a-hFc	1364	5712
	mAb10971	1:10	a-hFc	1135	7266
	mAb10964	1:10	a-hFc	1439	8601
[0268]	mAb10965	1:10	a-hFc	743	1370
	mAb10966	1:10	a-hFc	1428	6574
	mAb10967	1:10	a-hFc	1446	9510
	mAb10954	1:10	a-hFc	641	6308
	mAb10955	1:10	a-hFc	932	1788
	mAb10956	1:10	a-hFc	1030	1581
	mAb10957	1:10	a-hFc	604	5544
	mAb10977	1:10	a-hFc	4141	13600
	mAb11010	1:20	a-mFc	96	363
	mAb11004	1:20	a-mFc	110	406
	mAb11000	1:20	a-mFc	333	592
	mAb11006	1:20	a-mFc	165	3747
	mAb11008	1:20	a-mFc	103	324
	mAb10998	1:20	a-mFc	74	218
	mAb10996	1:20	a-mFc	51	85
[0269]	mAb11002	1:20	a-mFc	156	146
	仅培养基	1:10	a-hFc	30	35
	仅培养基	1:20	a-mFc	35	20
	仅培养基	1:10	a-hFc	39	29

[0269] 实例5:VSV-SARS-CoV-2-S假病毒感染性的抗体中和

[0270] 为了研究一组抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体中和SARS-CoV-2的能力,开发了使用

VSV-SARS-CoV-2-S假病毒进行的体外中和测定。

[0271] 如上文所描述的,通过用对SARS-CoV-2纤突蛋白进行编码的质粒瞬时转染293T细胞来产生VSV假型化病毒。在使用125 $\mu$ L Lipofectamine LTX、30 $\mu$ L PLUS试剂和高达3mL Opti-Mem转染15 $\mu$ g/板纤突蛋白DNA前一天,在DMEM完全培养基中将细胞以每板 $1.2 \times 10^7$ 个细胞接种在15cm的板中。转染后24小时,将细胞用10mL PBS洗涤,然后在10mL的Opti-Mem中用0.1VSV<sup>ΔG:mNeon</sup>病毒的MOI感染。将病毒在细胞上温育1小时,每10分钟轻轻摇动一次。将细胞用10mL PBS洗涤3次,然后用20mL感染培养基覆盖,然后在37℃、5% CO<sub>2</sub>下温育24小时。将上清液收集在冰上的250mL离心管中,然后以3000rpm离心5分钟以沉淀任何细胞碎片,在冰上等分,然后冷冻到-80℃。在用于中和测定中之前,在Vero细胞上测试感染性。这个材料将被称为VSV-SARS-CoV-2-S。

[0272] 用VSV-SARS-CoV-2-S进行中和测定

[0273] 在第1天,将Vero细胞以80%汇合度接种在T225烧瓶中。对于种子细胞,将培养基从细胞去除,将细胞用20mL PBS (Gibco: 20012-043) 洗涤,并添加5mL TrypLE并在37℃下温育~5分钟,直到细胞脱落为止。添加5mL的完整DMEM使胰蛋白酶失活,并上下移液以分配细胞。为了计数重悬细胞,将20,000个Vero细胞平板接种在96孔黑色聚苯乙烯微板(康宁公司(Corning): 3904)中的每孔100 $\mu$ L预热的完整DMEM中。

[0274] 在第2天,将VSV-SARS-CoV-2-S在冰上解冻,并用感染培养基1:1稀释。

[0275] 在V型底96孔板中,在60 $\mu$ l感染培养基中产生每种上清液的稀释液。对于培养基(阴性)对照,将60 $\mu$ l的经过稀释的条件培养基添加到孔。除培养基对照孔外,向每个孔添加60 $\mu$ L的经过稀释的VSV-SARS-CoV-2-S。向这些孔添加60 $\mu$ L的感染培养基。然后将假病毒与上清液稀释液在室温下一起温育30分钟。将培养基从Vero细胞板去除,将100 $\mu$ L的上清液/假病毒混合物转移到细胞,并将板在37℃、5% CO<sub>2</sub>下温育24小时。1:4和1:20(并且针对一些样品,1:100)的最终上清液稀释度用于评估VSV-SARS-CoV-2-S假病毒的中和。

[0276] 在第3天,在温育24小时后,将上清液从细胞孔去除,并用100 $\mu$ L的PBS置换。然后在带有MiniMax成像细胞仪的SpectraMax i3上对板进行读取。

[0277] 使用中和荧光聚丙烯酰胺凝胶电泳评估抗SARS-CoV-2-S抗体中和基于VSV的表达SARS-CoV-2-S的假型化病毒的能力。三个测定的结合结果总结如下。与模拟上清液对照相比,每种稀释度下的抗体的中和效力表示为百分比。所有抗体展现出中和能力,并且特别是对于以1:100评价的一组抗体,示出较高中和的抗体可以表示更有效的中和能力。

[0278] 表6:VLP的中和

上清液	中和 (1:4 稀释度)	中和 (1:20 稀释度)	中和(1:100稀释度)
[0279]	mAb10913	99.5	95.5
	mAb10914	94.2	74.8
	mAb10915	96.7	74.2
	mAb10932	99.8	94.6
	mAb10933	99.8	98.9
	mAb10934	99.9	99.8
	mAb10935	99.6	98.5
	mAb10936	99.7	99.1
	mAb10937	97.5	87.7
	mAb10920	99.5	95.5
	mAb10921	98.2	91.4
	mAb10922	99.8	99.1
	mAb10923	99.5	92.9
	mAb10924	98.1	85.4
	mAb10930	99.1	91.1
	mAb10938	98.1	83
	mAb10939	98.6	90.5
	mAb10940	97	89.9
	mAb10941	98.9	92.9
	mAb10982	97.4	83.8
	mAb10984	99.8	95.1
	mAb10985	99.7	88.4
[0280]	mAb10986	99.7	98
	mAb10987	99.3	97.7
	mAb10988	97.6	87.6
	mAb10989	100	99.8
	mAb10969	97.2	91
	mAb10970	99.6	96.7
	mAb10971	99.5	97
	mAb10964	99.7	99.7
	mAb10965	98.5	87.6
	mAb10966	99.5	95.5
	mAb10967	98.9	91.4
	mAb10954	99.8	96
	mAb10955	98.8	88.6
	mAb10956	97.1	84.1
	mAb10957	97.6	76.4
	mAb10977	95.5	79
	mAb11010	85	54
	mAb11004	77	40
	mAb11000	98	82
	mAb11006	91	54
	mAb11008	96	77
	mAb10998	88	59
	mAb10996	85	58
	mAb11002	35	-1
			NT

[0281] \*NT:未测试到

[0282] 实例6:抗体在抗体依赖性细胞介导的毒性替代测定中的表征

[0283] 在使用报告基因细胞和与抗体结合的靶细胞的替代生物测定中测量了靶向SARS-CoV-2纤突蛋白的抗体与Fc  $\gamma$  R3a (在自然杀伤 (NK) 细胞上显著表达的Fc受体,其诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) ) 相互作用的能力。这个测定使用的是被工程化成在转录因子NFAT (NFAT-Luc) 以及高亲和力人Fc  $\gamma$  R3a  $^{176}$ Val同种异型受体 (Jurkat/NFAT-Luc/hFc  $\gamma$  R3a  $^{176}$ Val) 的控制下表达报告基因萤光素酶的Jurkat T细胞。靶细胞是工程化的表达人CD20的Jurkat T细胞(用作与靶向CD20的人IgG1抗体的阳性对照)和受强力霉素诱导型启动子控制的全长SARS-CoV-2纤突蛋白。将报告基因细胞与靶细胞一起温育,并且Fc  $\gamma$  R3a通过与靶细胞结合的人IgG1抗体的Fc结构域的结合导致报告基因细胞中的转录因子NFAT活化并驱动萤光素酶的表达,然后通过发光读数对所述萤光素酶的表达进行测量。

[0284] Jurkat T细胞被工程化成组成型表达全长人CD20 (NCBI登录号为NP\_690605.1的氨基酸M1-P297)、Tet3G反式活化蛋白(使用Takara pEF1 $\alpha$ -Tet3G载体克隆的,目录号631167)以及强力霉素诱导型全长SARS-CoV-2纤突蛋白 (NCBI登录号YP\_009724390.1的氨基酸M1-T1273)。对工程化的表达Jurkat/Tet3G/hCD20/SARS-CoV2纤突蛋白的细胞进行分选以使纤突蛋白进行高表达,并且随后维持在RPMI+10%无Tet的FBS+P/S/G+500 $\mu$ g/ml G418+1 $\mu$ g/ml嘌呤霉素+250 $\mu$ g/ml潮霉素生长培养基中。

[0285] Jurkat T细胞被工程化成稳定表达经活化的T细胞的核因子 (NFAT) 萤光素酶报告基因构建体以及高亲和力人Fc  $\gamma$  R3a  $^{176}$ Val同种异型受体 (NCBI登记号P08637 VAR\_003960的氨基酸M1-K254)。将工程化报告基因细胞维持在RPMI1640+10% FBS+P/S/G+0.5 $\mu$ g/ml嘌呤霉素+500 $\mu$ g/ml G418生长培养基中。

[0286] 在开始替代ADCC测定之前的36小时,在含1 $\mu$ g/ml强力霉素的RPMI+10%无Tet的FBS+P/S/G细胞培养基(西格玛公司(Sigma))中诱导 $5 \times 10^5$ 个靶细胞/ml。实验前一天,将报告基因细胞在RPMI 1640+10% FBS+P/S/G+0.5 $\mu$ g/ml嘌呤霉素+500 $\mu$ g/ml G418生长培养基中分裂成 $7.5 \times 10^5$ 个细胞/ml的密度。

[0287] 简而言之,在实验当天,将靶细胞和报告基因细胞转移到测定培养基 (RPMI+10% 无Tet的FBS+P/S/G) 中,并以3:2的比率 ( $3 \times 10^4$ 个靶细胞/孔和 $2 \times 10^4$ 个报告基因细胞/孔) 添加到384孔白色微量滴定板中,然后添加不同浓度的抗SARS-CoV-2-S抗体上清液。每个板上包含阳性对照(带有人IgG1的CD20抗体)样品和不含抗体的阴性对照样品以使抗SARS-CoV-2-S抗体上清液的检测到的ADCC活性归一化。将板在37°C/5% CO<sub>2</sub>下温育5小时,然后添加等体积的ONE-Glo<sup>TM</sup>(普洛麦格公司(Promega))试剂以裂解细胞并检测萤光素酶活性。在多标签读板仪Envision(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))上以相对光单位 (RLU) 捕获发射的光,并使用以下等式对数据进行分析和归一化:

$$[0288] \text{ADCC 活性 (\%)} = 100 \times \frac{(\text{平均 RLU (测试样品)} - \text{平均 RLU (背景信号)})}{(\text{平均 RLU (阳性对照)} - \text{平均 RLU (背景信号)})}$$

[0289] 抗SARS-CoV-2-S抗体活化Fc  $\gamma$  R3a受体的能力在替代ADCC测定中通过将Jurkat/NFAT-Luc/Fc  $\gamma$  R3a  $^{176}$ Val用作报告基因细胞并将Jurkat/hCD20/SARS-CoV2纤突用作靶细胞进行了评价。测试的每个抗体含有IgG1结构域。

[0290] 表7汇总了结果,其示出了原始萤光素酶活性,并且指示了计算出的阳性对照

的%。观察到一定范围的ADCC活性%，这表明抗体上清液使Fc  $\gamma$  R3a活化。所有样品展现出替代ADCC活性的某种度量，并且抗体上清液中的10个抗体上清液展现出的替代ADCC活性比在阳性对照中观察到的更好。

[0291] 表7:抗SARS-CoV-2-S抗体上清液的ADCC替代活性。

[0292]

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

mAb10955	6740	8.7
mAb10956	6760	8.8
mAb10957	7120	10.8
mAb10977	12980	33.8

[0293] 实例7:抗SARS-CoV-2-S抗体结合特异性测定

[0294] 进行Luminex结合测定以测定抗SARS-CoV-2-S抗体与一组抗原的结合。对于这个测定,将抗原通过链霉亲和素偶联或捕获到路明克斯(Luminex)微球,如下:将大约1千万个MagPlex微球(路明克斯公司(Luminex Corp.),MagPlex微球,目录号MC10000和MC12000)通过在pH 6.2的500 $\mu$ L 0.1M NaPO<sub>4</sub>(活化缓冲液)中涡旋而重新悬浮并且然后离心以去除上清液。因为微球对光敏感,所以使其避光。将微球重新悬浮于160 $\mu$ L的活化缓冲液中,并将羧酸酯基团(-COOH)通过添加20 $\mu$ L的50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific),目录号24525)、然后添加20 $\mu$ L的50mg/mL 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺(EDC,赛默飞世尔科技公司,目录号22980)在25℃下活化。10分钟后,通过添加pH 5的600 $\mu$ L 50mM MES(偶联缓冲液)将反应的pH降低到5.0,并将微球涡旋并离心以去除上清液。将经活化的微球立即与500 $\mu$ L的含25 $\mu$ g/mL的蛋白质抗原或链霉亲和素的偶联缓冲液混合,并在25℃下温育两小时。将偶联反应通过添加pH 8.0的50 $\mu$ L的1M Tris-HCl淬灭,并将微球涡旋、离心并用800 $\mu$ L的0.005% PBS(吐温(Tween)20 0.05%)洗涤三次,以去除未偶联的蛋白质和其它反应组分。将微球以1千万个微球/mL重新悬浮于1mL的PBS 2% BSA 0.05%叠氮化钠中。为了对抗原进行链霉亲和素捕获,将500 $\mu$ L的含12.5 $\mu$ g/mL的生物素化蛋白的PBS溶液添加到链霉亲和素偶联的微球并在25℃下温育一小时。将微球涡旋、离心并用800 $\mu$ L的PBS洗涤三次,并且然后使用500 $\mu$ L的含30mM生物素(密理博西格玛公司(Millipore-Sigma),目录号B4501)的pH 8.0的0.15M Tris阻断。将微球温育30分钟,然后涡旋、离心并用800 $\mu$ L的PBS洗涤三次。将微球以1千万个微球/mL重新悬浮于1mL的PBS 2% BSA 0.05%叠氮化钠中。

[0295] 将用于不同蛋白质和生物素化蛋白的微球以2700个珠粒/ml混合,并将75 $\mu$ L的微球平板接种在96孔ProcartaPlex平底板(赛默飞世尔科技公司,目录号:EPX-44444-000)的每个板中,并与25 $\mu$ L的含有抗体的单独的抗SARS-CoV-2上清液混合。将样品和微球在25℃下温育两小时,并且然后用200 $\mu$ L的含有0.05%吐温20的DPBS洗涤两次。为了检测抗体与单独的微球结合的水平,添加100 $\mu$ L的含2.5 $\mu$ g/mL R-藻红蛋白偶联的山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人κ(南方生物技术公司(Southern Biotech),目录号2063-09)的阻断缓冲液(用于含有鼠Fc区的抗体)或100 $\mu$ L的含1.25 $\mu$ g/mL F(ab')<sub>2</sub>片段特异性的R-藻红蛋白亲和纯化F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗小鼠IgG(杰克逊免疫研究实验室有限公司,目录号:115-116-072)的阻断缓冲液(用于含有人Fc区的抗体),并将其在25℃下温育30分钟。30分钟后,将样品用200 $\mu$ l的洗涤缓冲液洗涤两次,然后重新悬浮于150 $\mu$ l的洗涤缓冲液中。在路明克斯FlexMap 3D®(路明克斯公司)和路明克斯xPonent®软件版本4.3(路明克斯公司)中对板进行读取。测定中使用的SARS-CoV-2蛋白如下:

[0296] RBD\_(R319-F541).mmh:SEQ ID NO:829

[0297] RBD\_(R319-F541).mFc:SEQ ID NO:830

[0298] RBD\_(R319-F541).hFc:SEQ ID NO:831

[0299] 路明克斯结合的结果在表8和表9中示出为中值荧光强度(MFI)信号强度。结果示出46个抗SARS-CoV-2-S抗体上清液与SARS-CoV-2-S RBD蛋白特异性结合。这些结果还示出这些抗体中的五个抗体与SARS冠状病毒纤突RBD蛋白交叉反应,其结合信号大于1000MFI。

[0300] 表8:SARS-CoV-2纤突RBD、SARS-CoV-2纤突S1、SARS RBD、SARS纤突S1、MERS纤突和MERS RBD蛋白与抗SARS-CoV-2单克隆抗体(含有hFc)的结合信号(MFI)

上清液	SARS-CoV-2								
	SARS-CoV-2 纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	SARS-CoV-2 纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	Bt-SARS-CoV-2 纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mFc	SARS-CoV-2 纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mFc	Bt-SARS-CoV-2 纤突蛋白(RBD)(R319-F541).hFc	SARS-CoV-2 纤突蛋白(RBD)(R319-F541).hFc	SARS-CoV-2 纤突(RBD, Fc 标签)(义翘神州公司(Sino)40592-V05H)	SARS-CoV-2 纤突蛋白(S1 亚基, Fc 标签)(义翘神州公司 40591-V02H)	SARS-CoV-2 纤突蛋白(S1 亚基, His 标签)(义翘神州公司 40591-V08H)
mAb10913	30709	29247	16645	33023	27452	31929	31561	18899	24931
mAb10914	31967	29650	15986	30740	25957	30464	30591	14914	21609
mAb10915	31795	30293	20062	31772	30625	32437	31267	17595	22917
mAb10932	29984	30133	17697	30640	26220	30559	29880	17627	22099
mAb10933	33356	32090	19383	34944	30110	35106	34484	21178	27509
mAb10934	33797	32649	21238	34325	33016	35841	33636	20643	27483
mAb10935	34853	32603	19328	35886	31444	35611	35037	19991	25554
mAb10936	33947	32305	21636	33740	32810	33912	33613	19487	25187
mAb10937	33866	32225	19689	34233	31501	34624	33878	19553	26404
mAb10920	34842	34440	20254	36415	31708	36828	36277	21085	28516
mAb10921	24977	23596	11307	19429	18186	22306	21766	8959	12212
mAb10922	31768	30755	18629	32355	27854	33609	31376	18287	24678
mAb10923	35208	34289	19593	37372	33555	37756	36324	22502	28855
mAb10924	29730	27987	17044	28308	26898	28744	28423	15672	20577
mAb10930	25119	25131	16563	28560	25922	28870	28744	16530	21151
mAb10938	29409	27069	17205	30533	24638	29593	29134	15431	21163
mAb10939	32196	30883	18746	33900	28857	32864	32472	18171	23928
mAb10940	35221	35290	21000	35978	30675	36507	34945	21350	25807
mAb10941	32392	31171	20428	34061	28431	33347	33232	19668	26738
mAb10982	24263	22180	12278	23296	19935	23020	23066	10847	14017
mAb10984	27854	26197	17054	28350	22479	28442	27808	15590	19245
mAb10985	30214	27854	15488	29443	24827	31054	28936	16219	20787
mAb10986	27187	25196	15921	28407	23388	27693	27693	16034	19061
mAb10987	32171	29074	16736	33115	26059	32757	31238	17465	23089
mAb10988	23858	22160	12659	26095	21793	24822	23949	12910	16208
mAb10989	17687	17286	11189	19568	16117	22435	19316	12263	14234
mAb10969	29550	27587	15391	31386	26565	31042	30950	18466	23959
mAb10970	33154	31662	20184	34739	29182	34991	34704	21047	24625
mAb10971	29355	28850	16660	28746	24602	30032	29848	16986	21579
mAb10964	31754	28907	19225	32420	27736	33074	32317	18650	24154
mAb10965	30812	26863	13707	27139	23351	29618	28034	14133	18864
mAb10966	30939	27440	17905	30363	25115	30778	29869	16403	23308
mAb10967	28453	26496	16771	29650	24263	28660	28061	15776	21869
mAb10954	30410	28281	18394	31284	24677	31768	29604	16626	21270
mAb10955	29627	28476	16785	30790	24689	31227	31054	17858	22675
mAb10956	27900	25690	12891	28349	24505	30225	28810	15013	19981
mAb10957	23411	20615	10566	18692	16725	22560	20258	8451	11989

[0302]	mAb10977	16770	14605	8845	13827	12774	15216	16783	6476	9406
--------	----------	-------	-------	------	-------	-------	-------	-------	------	------

[0303] 表8(续)

SARS			MERS									
上清液	人 SARS 冠状病毒 纤突蛋白 (受体结合 结构域)兔 Fc(义翘神 州公司 40150- V31B2)	人 SARS 冠状病毒 纤突蛋白 (受体结合 结构域)(义 翘神州公 司 40150- V08B2)	MERS- CoV (SARS- CoV-2) S1 亚基 蛋白(His 标签)(义 翘神州公 司 40150- V08B1)	MERS- CoV (SARS- CoV-2) 纤突蛋白 (ECD, aa 1-1297, His 标签) (义翘神州 公司 40069- V08B)	MERS- CoV (SARS- CoV-2) 纤突蛋白 S2 (aa 726-1296 , His 标 签)(义翘 神州公司 40070- V08B)	MERS- CoV (SARS- CoV-2) 纤 突蛋白 S1 (aa 1-725, His 标签) (义翘神州 公司 40069- V08H)	MERS- CoV (NCoV/新 型冠状病 毒) 纤突蛋 白片段 (RBD, aa 367-606, His 标签) (义翘神州 公司 40071- V08B1)	MERS- CoV (NCoV/新 型冠状病 毒) 纤突蛋 白 S1 蛋白 (aa 1-725, His 标签) (义翘神州 公司 40069- V08B1)	MERS.mFc (mAb2663- L1)	MERS.hFc (mAb2664- L1)	Bt- MERS.hFc (mAb2664- L2)	
	mAb10913	35	39	21	20	26	14	34	26	29	28	
[0304]	mAb10914	47	39	22	19	28	15	31	23	86	71	
	mAb10915	42	40	21	18	23	15	31	24	86	91	
	mAb10932	34	26	19	14	19	12	26	19	60	49	
	mAb10933	39	31	18	14	19	14	24	17	22	21	
	mAb10934	38	27	18	15	18	10	24	20	77	68	
	mAb10935	37	25	21	15	18	14	25	17	74	67	
	mAb10936	46	36	20	19	21	13	29	20	32	26	
	mAb10937	44	50	21	19	26	14	27	22	21	23	
	mAb10920	59	68	26	24	30	13	39	27	38	35	
	mAb10921	35	31	19	19	19	12	23	18	55	44	
	mAb10922	36	41	18	19	18	9	29	22	20	21	
	mAb10923	53	66	29	23	36	14	37	25	24	29	
	mAb10924	41	30	18	17	19	12	29	22	19	22	
	mAb10930	42	49	19	16	20	14	27	22	29	24	
	mAb10938	38	36	19	16	19	13	25	20	86	65	
	mAb10939	38	50	19	16	18	14	27	19	41	27	
	mAb10940	32	28	20	15	18	11	22	19	18	21	
	mAb10941	45	37	22	19	22	15	30	24	82	69	
	mAb10982	30	54	24	17	21	13	29	20	64	60	
	mAb10984	33	31	22	21	25	13	29	20	237	341	
	mAb10985	31537	32343	22721	18	28	14	31	22	168	195	
	mAb10986	39	38	21	15	19	14	27	20	233	286	
	mAb10987	33	27	22	15	23	15	28	23	196	235	
	mAb10988	41	67	25	17	29	14	32	25	169	181	
	mAb10989	47	73	21	16	22	11	24	19	161	206	
	mAb10969	37	34	20	16	20	11	26	19	21	22	
	mAb10970	38	25	19	14	16	15	23	17	35	23	
	mAb10971	32	31	20	15	13	13	20	19	44	29	
	mAb10964	19999	23855	5186	15	17	13	20	19	19	22	
	mAb10965	30	23	16	19	20	12	26	23	58	53	
	mAb10966	35	21	20	16	16	12	24	16	56	53	
	mAb10967	35	30	21	17	19	13	23	21	61	71	
	mAb10954	30	26	15	17	16	10	18	21	57	61	
	mAb10955	36	21	14	15	18	16	20	19	57	48	
	mAb10956	32	24	16	15	16	13	22	24	58	49	
	mAb10957	32	22	16	15	18	11	22	19	40	29	
	mAb10977	36	28	23	17	19	13	24	21	17	20	

[0305] 表9:SARS-CoV-2RBD、SARS-CoV-2纤突S1、SARS RBD、SARS纤突S1、MERS纤突和MERS RBD蛋白与抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体(含有mFc)的结合信号(MFI)

SARS-CoV-2									
上清液	SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH (mAb10620-L1)	SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH (mAb10620-L2)	Bt-SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mFc (mAb10621-L2)	SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mFc (mAb10621-L1)	Bt.SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).hFc (mAb10621-L1)	SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).hFc (mAb10622-L2)	SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD, Fc 标签) (义翘神州公司 (Sino) 40592-V05H) (mAb10622-L1)	SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD, Fc 标签) (义翘神州公司 (Sino) 40591-V02H) (mAb10622-L1)	SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 纤突蛋白 (S1 亚基, Fc 标签) (义翘神州公司 (Sino) 40591-V02H) (mAb10622-L1)
mAb11010	11024	12885	9349	14432	15688	8880	9628	5136	10794
[0306]	mAb11004	3350	11337	4299	4583	7625	4877	6905	4482
	mAb11000	17802	10971	11335	23007	11593	22316	5671	9356
	mAb11006	5134	4744	1396	2866	3812	3985	3749	2052
	mAb11008	4047	3178	3047	4260	4106	2570	2311	6880
	mAb10998	1847	3837	2228	2230	467	1740	2005	717
	mAb10996	9142	2906	4319	8738	5398	2084	16101	1425
	mAb11002	11558	10181	2197	9530	5471	9382	8461	6232

[0307] 表9(续)

SARS			MERS								
人SARS冠状病毒纤突蛋白(受体结合结构域, His 标签)(义翘神州公司 40150-V31B2)	人SARS冠状病毒纤突蛋白(受体结合结构域, His 标签)(义翘神州公司 40150-V08B2)	人SARS冠状病毒 S1 亚基蛋白(His 标签)(义翘神州公司 40150-V08B1)	MERS-CoV (NCoV/新型冠状病毒) 纤突蛋白(ECD, aa 1-1297, His 标签)(义翘神州公司 40069-V08B)	MERS-CoV (NCoV/新型冠状病毒) 纤突蛋白 S2(aa 726-1296, His 标签)(义翘神州公司 40070-V08B)	MERS-CoV (NCoV/新型冠状病毒) 纤突蛋白 S1(aa 1-725, His 标签)(义翘神州公司 40069-V08H)	MERS-CoV (NCoV/新型冠状病毒) 纤突蛋白片段(RBD, aa 367-606, His 标签)(义翘神州公司 40071-V08B1)	MERS-CoV (NCoV/新型冠状病毒) 纤突蛋白 S1 蛋白(aa 1-725, His 标签)(义翘神州公司 40069-V08B1)	MERS mFc (mAb 2663-L1)	MER .hFc (mAb 2664-L1)	Bt-MERS. hFc(mAb 2664-L2)	
mAb11010	18276	16793	7421	7	14	14	19	18	134	28	28
mAb11004	5524	740	33	15	20	12	26	17	228	24	25
mAb11000	39	31	18	13	19	9	27	17	384	82	49
mAb11006	615	667	339	18	17	13	15	18	156	16	24
mAb11008	120	174	31	18	16	15	20	18	45	19	32
mAb10998	29	37	16	19	18	14	24	19	48	29	32
mAb10996	1355	1279	28	13	21	14	26	18	185	132	95
mAb11002	80	56	31	10	22	13	25	18	288	52	32

[0309] 实例8:抗SARS-CoV-2-S抗体多样性测定

[0310] 进行结合测定以测定抗SARS-CoV-2-S抗体的结合曲线。对于这个测定,如上文针对路明克斯结合测定所描述的,抗原是胺偶联的。简而言之,将用于16个不同珠粒区的大约9百万个MagPlex微球(路明克斯公司, MagPlex微球, 目录号MagPlex MC10000和MC12000)通过在pH 6.2的500 $\mu$ L 0.1M NaPO<sub>4</sub>中涡旋而重新悬浮并且然后离心以去除上清液。将微球重新悬浮于160 $\mu$ L的活化缓冲液中,并将羧酸酯基团(-COOH)通过添加20 $\mu$ L的50mg/mL-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 赛默飞世尔科技公司, 目录号24525)、然后添加20 $\mu$ L的50mg/mL-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺(EDC, 赛默飞世尔科技公司, 目录号22980)在25°C下活化。10分钟后,通过添加pH 5的600 $\mu$ L的50mM MES(偶联缓冲液)将反应的pH降低到5.0,并将微球涡旋并离心以去除上清液。将经活化的微球立即与500 $\mu$ L的含20 $\mu$ g/mL的SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541)-mmH的偶联缓冲液混合,并在25°C下温育两小时。将偶联反应通过添加pH 8.0的50 $\mu$ L的1M Tris-HCl淬灭,并将微球涡旋、离心并用1000 $\mu$ L的PBS洗涤三次。将微球以9百万个微球/mL重新悬浮于250 $\mu$ L的PBS中。

[0311] 对16个含有胺偶联的蛋白质的微球区中的15个微球区进行如下修饰以进行结合测定:将微球用PBS 5% DMSO洗涤两次,并将500 $\mu$ l的化学品或酶按照制造建议溶解并以10nM添加到上文所描述的胺偶联的微球。随后将其涡旋并在室温下旋转温育2小时。用PBS 2% BSA洗涤微球3次。将微球以9百万个微球/mL重新悬浮于1mL的PBS中。

[0312] 将经蛋白质修饰的微球和未经蛋白质修饰的(完整的)微球以2700个珠粒/mL混合,并将75 $\mu$ L的微球平板接种在96孔ProcartaPlex 96孔平底板(赛默飞世尔科技公司, 目录号:EPX-44444-000)的每个板中,并与25 $\mu$ L的含有抗体的单独的抗SARS-CoV-2-S上清液混合。将样品和微球在25°C下温育两小时,并且然后用200 $\mu$ L的含有0.05%吐温20的DPBS洗涤两次。为了检测抗体与单独的微球结合的水平,添加100 $\mu$ L的含2.5 $\mu$ g/mL R-藻红蛋白偶联的山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人κ(南方生物技术公司, 目录号2063-09)的阻断缓冲液(用于含有hFc的抗体)或100 $\mu$ L的含1.25 $\mu$ g/mL F(ab')<sub>2</sub>片段特异性的R-藻红蛋白亲和纯化F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗小鼠IgG(杰克逊免疫研究实验室有限公司, 目录号115-116-072)的阻断缓冲液(用于

含有mFc的抗体)或100 $\mu$ L的含1.25 $\mu$ g/mL R-藻红蛋白抗His(生物传奇公司(Biolegend),目录号362603)的阻断缓冲液(用于ACE-2对照,R&D,目录号933-ZN),并将其在25℃下温育30分钟。30分钟后,将样品用200 $\mu$ l的洗涤缓冲液洗涤两次,然后重新悬浮于150 $\mu$ l的洗涤缓冲液中。在FlexMap3D®(路明克斯公司)和路明克斯xPonent®软件版本4.3(路明克斯公司)中对板进行读取。

[0313] 路明克斯分箱的结果在表10中示出为中值荧光强度(MFI)信号强度。为了确定簇,相对于完整蛋白质(未经修饰的微球)对数据进行归一化并聚类。将46种抗SARS-CoV-2抗体分类为含有2种或更多种抗体的9个簇,并将11种抗体分类为单个节点。基于层次聚类和树状图的这些结果来分配簇。这些结果示出46种抗SARS-CoV-2-S抗体上清液具有不同的结合特性和曲线,这表明收集了与SARS-CoV-2纤突蛋白上的不同表位结合的抗体。

[0314] 表10:抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体与SARS-CoV-2-S RBD.mmmH(未经修饰的和经化学或酶修饰的)结合信号(MFI)和簇分配

样品	簇	未经修饰的SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	MOD1 - SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	MOD2 - SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	MOD3 - SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	MOD4 - SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	MOD5 - SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	MOD6 - SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH	MOD7 - SARS-CoV-2纤突蛋白(RBD)(R319-F541).mmH
人_ACE2(10 nM)	1	5727	873	5119	1852	5106	202	5408	5013
人_ACE2(100 nM)	1	10681	1447	10320	2260	9661	559	9593	8624
人_ACE2(50 nM)	1	9269	991	8238	2185	7707	391	7859	7577
mAb10969	3	28551	54	24177	425	26049	3546	20577	23878
mAb10965	3	28080	38	21996	135	25727	3250	22419	24062
mAb10913	4	31694	102	28389	23270	29344	5018	28738	27854
mAb10920	4	35534	162	26783	28090	32185	7105	32942	30958
mAb10923	4	38711	153	32305	33866	36082	7540	35335	33924
mAb10930	4	29502	110	21579	21533	27843	6195	26600	25103
mAb10940	4	38871	94	34337	33453	36690	7817	36128	34544
mAb10989	4	19671	49	16697	18260	15785	3369	19568	15206
mAb11006	4	2044	30	705	3773	2553	517	2024	2503
mAb10934	5	33057	81	27716	25092	31664	6648	30801	29926
mAb10924	5	39205	118	32707	29366	36507	6378	35565	34210
mAb10939	5	33647	62	24895	26392	31390	6276	31275	29594
mAb10988	5	23009	68	15983	14842	20830	3536	20176	19499
mAb10957	5	20879	52	15728	19383	19993	3582	17727	17989
mAb10914	6	36047	143	32282	26967	34199	7162	32787	31823
mAb10915	6	36690	159	32489	26427	33545	9731	33568	31823
mAb10932	6	34024	191	28833	28557	31560	9946	31123	29765
mAb10938	6	34522	174	28465	19403	31252	8932	29225	30918
mAb10941	6	36369	140	31868	26129	33637	9455	33154	31478
mAb10984	6	25759	109	22445	20925	24747	6880	23630	23895
mAb10985	6	27394	99	24286	22986	26151	5519	25874	25023
mAb10986	6	25414	118	20868	20557	23619	6591	23066	22813
mAb10977	6	16980	54	14108	16590	15851	3505	14528	12779
mAb10933	7	35267	69	30617	5243	32665	6161	32930	31043
mAb10982	7	27505	80	20338	6650	25051	4585	24178	23770
mAb10987	7	29327	54	25311	2235	27981	4110	27095	25690
mAb10935	8	31883	81	28683	12724	30329	6457	27417	27785
mAb10970	8	32271	94	26863	22547	30537	7029	27679	28333
mAb10971	8	27415	106	23890	22184	27850	6869	25337	25164
mAb10964	8	29963	122	23580	23419	27896	7085	27483	25968
mAb10921	9	31657	91	28216	18123	30441	6821	28629	28756
mAb10966	9	29489	85	22836	19866	25736	5869	24217	26013
mAb10967	9	26784	107	20787	13760	25104	6192	21329	23434
mAb10954	9	28476	74	21915	19038	26186	5948	25299	24332
mAb10955	9	28637	39	24585	21155	27912	4141	23849	24862
mAb10996	S1	3403	20	5275	164	5562	488	3042	9125
mAb10937	S2	33561	94	24890	104	31164	5904	30327	28675
mAb10936	S3	32919	136	26818	312	31261	7856	31008	29293
mAb10922	S4	33183	102	25384	1107	31348	5822	31313	29386
mAb11002	S5	9881	16	3348	155	8615	153	9542	7562
mAb10956	S6	24562	29	21685	19337	23769	2275	19422	21961
mAb11010	S7	6388	18	4155	5441	8832	384	7444	5766
mAb11008	S8	7096	26	926	1525	2776	198	2750	1007
mAb10998	S9	2557	18	247	1336	1524	104	2937	723
mAb11004	S10	6514	18	2205	604	3566	1155	4522	2229
mAb11000	S11	16670	19	3416	12787	13493	2009	17756	12409

[0317] 表10(续)

样品	簇	MOD8 - SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH	MOD9 - SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH	MOD10 - SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH	MOD11 - SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH	MOD12 - SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH	MOD13 - SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH	MOD14 - SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH	MOD15 - SARS-CoV-2 纤突蛋白 (RBD) (R319-F541).mmH	
[0318]	人_ACE2 (10 nM)	1	36	4500	4091	4618	4505	5094	4743	3173
	人_ACE2 (100 nM)	1	36	6212	7922	8440	8957	8948	7927	5370
	人_ACE2 (50 nM)	1	35	5518	6447	7064	7233	7600	7112	4407
	mAb10969	3	154	18918	24407	22409	27036	24269	23672	14196
	mAb10965	3	110	19061	22355	21414	25635	23144	23156	14072
	mAb10913	4	15939	28645	27110	28878	31159	28971	27784	26272
	mAb10920	4	17228	32758	31463	31910	35144	32185	32323	29949
	mAb10923	4	20961	34187	33809	36323	38596	35381	33338	33131
	mAb10930	4	10235	23744	24516	26738	27958	26968	25126	23951
	mAb10940	4	14572	35967	34704	36070	39285	35462	34922	33614
	mAb10989	4	6136	17756	15530	16838	15137	17411	18100	15946
	mAb11006	4	299	2442	3749	1076	4622	2818	3344	3568
	mAb10934	5	6410	31261	30364	30709	32873	30502	28591	27785
	mAb10924	5	6594	32856	33797	35875	38424	34647	33476	31524
	mAb10939	5	4808	28465	29444	30699	33475	30596	29721	27129
	mAb10988	5	2980	18329	19660	20692	21770	20130	18948	16558
	mAb10957	5	2171	17357	19487	18596	21247	18757	17810	16081
	mAb10914	6	5475	31226	31467	33235	35175	32626	31100	29217
	mAb10915	6	9277	33442	31984	32902	35462	31937	32397	30009
	mAb10932	6	9711	30122	29074	30433	33379	30283	29880	26795
	mAb10938	6	7536	28109	30308	31264	33394	30814	30538	27751
	mAb10941	6	7518	29802	31421	33958	35290	32925	31777	29159
	mAb10984	6	3527	20212	22065	22318	26163	23227	22283	19349
	mAb10985	6	6821	23642	23572	24654	27394	24677	24493	20787
	mAb10986	6	2838	20672	21766	21720	25207	23400	22214	19694
	mAb10977	6	4005	14193	12616	13320	16332	13632	14312	13136
	mAb10933	7	1556	27705	29926	30801	34427	30409	30525	24367
	mAb10982	7	1065	20361	23131	23247	26412	24027	23549	16765
	mAb10987	7	1444	25621	25345	26335	29995	27049	26082	22871
	mAb10935	8	2534	26151	27958	28752	30847	28522	27452	24816
	mAb10970	8	1968	25233	27793	27610	31869	29871	26909	23775
	mAb10971	8	1598	22587	25646	24384	27391	25761	24774	19590
	mAb10964	8	2414	24740	25658	26439	29113	27243	26783	22405
	mAb10921	9	941	23674	27586	27367	30969	28480	28331	21220
	mAb10966	9	833	21800	24332	24977	27440	26554	24585	18580
	mAb10967	9	574	19521	22352	22997	25506	22641	22836	17387
	mAb10954	9	929	22237	24516	23457	28200	24897	24539	19717
	mAb10955	9	1141	22191	24805	23688	27210	25575	24677	18944
	mAb10996	S1	28	8940	6336	6789	6229	5821	3484	1312
	mAb10937	S2	1231	27597	27092	29937	32116	29661	29386	20543
	mAb10936	S3	2916	29074	28775	30813	31711	29189	28522	21674
	mAb10922	S4	2248	29845	28629	30373	32931	30625	28962	23399
	mAb11002	S5	17	4144	6415	6790	8465	7688	6804	2016
	mAb10956	S6	331	16954	21282	21524	26646	21547	22767	15077
[0319]	mAb11010	S7	162	5567	6718	9557	12522	5287	5898	4915
	mAb11008	S8	60	2350	2759	2824	3301	2745	2130	2831
	mAb10998	S9	85	1611	2260	1206	2513	2186	727	1029
	mAb11004	S10	71	1465	12665	10667	5925	5531	11578	1144
	mAb11000	S11	56	14151	19230	17204	21718	17952	17117	5151

[0320] 实例9:抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体的Biacore结合动力学

[0321] 使用基于实时表面等离振子共振的Biacore T200/Biacore 8K生物传感器测定来自CH0t细胞或来自杂交瘤的初级上清液的不同SARS-CoV-2-S抗体的平衡解离常数( $K_D$ )。所有结合研究在25°C下在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05% v/v表面活性剂吐温-20、pH为7.4的(HBS-ET)运行缓冲液中进行。首先将Biacore CM5传感器芯片表面通过与小鼠抗人Fc特异性mAb或兔抗小鼠Fc  $\gamma$ 单克隆抗体(GE, 目录号BR-1008-38)进行胺偶联来衍生化以捕获抗SARS-CoV-2抗体。对用C端myc-myc-六组氨酸标签表达的人SARS-CoV-

2RBD细胞外结构域(SARS-CoV-2RBD-MMH)、用C端小鼠IgG2a表达的SARS-CoV-2RBD细胞外结构域(SARS-CoV-2RBD-mFc)或用C端人IgG1(SARS-CoV-2RBD-hFc)表达的SARS-CoV-2RBD细胞外结构域进行结合研究。将在HBS-ET运行缓冲液中制备的单一浓度的SARS-CoV-2RBD-MMH(100nM)；SARS-CoV-2RBD-mFc(50nM)或SARS-CoV-2RBD-hFc(50nM)以30微升/分钟的流动速率注射1.5分钟,同时在HBS-ET运行缓冲液中监测抗体结合的不同SARS-CoV-2RBD试剂的解离2分钟。在每个循环结束时,使用10秒注射20mM磷酸的小鼠抗人Fc特异性单克隆抗体表面或40秒注射pH 1.5的10mM甘氨酸、HC1的兔抗小鼠Fc  $\gamma$ 特异性多克隆抗体再生SARS-CoV-2RBD抗体捕获表面。缔合率( $k_a$ )和解离率( $k_d$ )通过使用Bia评价软件v3.1或Biacore洞察评价软件v2.0或曲线拟合软件将实时结合传感图拟合到具有质量传输限制的1:1结合模型来测定。结合解离平衡常数( $K_D$ )和解离半衰期( $t_{1/2}$ )是根据动力学速率如下计算的:

$$[0322] \quad K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ 并且 } t_{1/2} (\text{分钟}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

[0323] 不同的SARS-CoV-2单克隆抗体与本发明的不同的抗SARS-CoV-2RBD试剂在25℃下结合的结合动力学参数示出于表11和12中。

[0324] 表11:SARS-CoV-2RBD-MMH与抗SARS-CoV-2单克隆抗体在25℃下结合的结合动力学

	上清液	mAb 捕获水平 (RU)	所结合的 50 nM Ag (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
[0325]	mAb10913	2010	381	4.91E + 05	2.28E - 02	4.64E - 08	0.5
	mAb10914	3169	174	3.49E + 05	1.36E - 02	3.89E - 08	0.8
	mAb10915	824	109	8.85E + 04	3.18E - 04	3.59E - 09	36.3

[0326]

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

[0327] 表12: SARS-CoV-2RBD-mFc或SARS-CoV-2RBD-hFc与抗SARS-CoV-2单克隆抗体在25℃下结合的结合动力学

上清液	mAb 捕获水平 (RU)	所结合的 50 nM Ag (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (分钟)	
[0328]	mAb10913	961	575	6.23E + 05	1.52E - 04	2.44E - 10	76.1
	mAb10914	1467	313	1.83E + 05	1.00E - 05*	5.47E - 11	1155*
	mAb10915	392	141	2.81E + 05	1.00E - 05*	3.56E - 11	1155*
	mAb10932	1060	372	2.42E + 05	1.00E - 05*	4.13E - 11	1155*
	mAb10933	681	465	1.23E + 06	2.12E - 04	1.73E - 10	54.4
	mAb10934	1401	949	1.41E + 06	1.17E - 04	8.32E - 11	98.3
	mAb10935	1667	830	3.83E + 05	1.00E - 05*	2.61E - 11	1155*
	mAb10936	1171	699	6.52E + 05	1.00E - 05*	1.53E - 11	1155*
	mAb10937	904	575	6.39E + 05	7.28E - 05	1.14E - 10	158.7
	mAb10920	617	357	7.02E + 05	2.92E - 04	4.16E - 10	39.5
	mAb10921	489	170	2.66E + 05	1.00E - 05*	3.75E - 11	1155*
	mAb10922	1286	828	7.19E + 05	2.42E - 05	3.36E - 11	478.2
	mAb10923	613	362	6.51E + 05	2.83E - 05	4.35E - 11	407.7
	mAb10924	465	223	3.67E + 05	8.13E - 05	2.22E - 10	142.1
	mAb10930	2156	449	2.32E + 05	1.00E - 05*	4.31E - 11	1155*
	mAb10938	1363	333	3.11E + 05	1.00E - 05*	3.22E - 11	1155*
	mAb10939	904	324	2.99E + 05	1.15E - 05	3.87E - 11	1004.3
	mAb10940	1508	893	5.61E + 05	2.86E - 05	5.09E - 11	403.8
	mAb10941	1132	371	2.60E + 05	1.00E - 05*	2.15E - 11	1155*
	mAb10982	529	236	3.10E + 05	1.69E - 05	5.44E - 11	683.6
	mAb10984	1213	573	4.02E + 05	1.00E - 05*	2.49E - 11	1155*
	mAb10985	1463	1040	1.09E + 06	1.27E - 05	1.17E - 11	910.9
	mAb10986	1168	752	6.33E + 05	1.00E - 05*	1.58E - 11	1155*
	mAb10987	902	632	8.20E + 05	1.70E - 04	2.08E - 10	67.8
	mAb10988	892	628	1.24E + 06	3.46E - 04	2.79E - 10	33.4
	mAb10989	505	378	2.07E + 06	9.30E - 05	4.50E - 11	124.2
	mAb10969	1658	738	3.05E + 05	1.51E - 05	4.96E - 11	764
	mAb10970	1370	661	3.48E + 05	1.00E - 05*	2.88E - 11	1155*
	mAb10971	1081	556	3.95E + 05	1.00E - 05*	2.53E - 11	1155*
	mAb10964	875	651	1.43E + 06	1.00E - 05*	7.00E - 12	1155*
	mAb10965	762	322	2.97E + 05	1.00E - 05*	3.36E - 11	1155*
	mAb10966	921	430	4.02E + 05	1.00E - 05*	2.49E - 11	1155*
	mAb10967	945	355	3.99E + 05	1.00E - 05*	2.51E - 11	1155*
	mAb10954	734	414	5.77E + 05	1.00E - 05*	1.73E - 11	1155*
	mAb10955	634	292	3.96E + 05	2.34E - 05	5.92E - 11	493.6
	mAb10956	842	339	3.74E + 05	1.48E - 04	3.95E - 10	78
	mAb10957	449	209	3.58E + 05	1.00E - 05*	2.79E - 11	1155*
	mAb10977	161	102	5.56E + 05	1.04E - 04	1.87E-10	110.9
	mAb11010	1014	163	4.24E + 05	1.00E - 05*	2.36E - 11	1155*
	mAb11004	1101	241	3.46E + 05	6.63E - 05	1.91E - 10	174.2
	mAb11000	380	61	4.38E + 05	1.83E - 03	4.17E - 09	6.3
	mAb11006	1112	75	1.88E + 05	1.00E - 05*	5.32E - 11	1155*
[0329]	mAb11008	872	110	1.61E + 05	1.15E - 04	7.15E - 10	100.4
	mAb10998	1140	227	3.30E + 05	5.21E - 04	1.58E - 09	22.2
	mAb10996	629	83	2.88E + 05	9.32E - 04	3.24E - 09	12.4
	mAb11002	1068	60	2.69E + 05	4.49E - 03	1.67E - 08	2.6

[0330] \*:在实验条件下基于对解离速率常数和解离半衰期进行的测量的极限的估计值。

[0331] 实例10:通过阻断ELISA来表征抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体

[0332] 开发了基于ELISA的阻断测定以测定抗SARS-CoV2-S抗体阻断SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域(RBD)与人血管紧张素转化酶2(hACE2)结合的能力。

[0333] 实验中使用的SARS-CoV-2蛋白包含在c端处用人IgG1的Fc部分表达的SARS-CoV-2纤突蛋白(氨基酸Arg319到Phe541)的受体结合结构域(RBD)部分(SARS-CoV-2RBD-hFc;参见NCBI登录号MN908947.3)。实验中使用的人ACE2蛋白购自R&D系统公司(R&D systems)并包含具有c端10X组氨酸标签的氨基酸谷氨酰胺18到丝氨酸740(hACE2-His;NCBI登录号Q9BYF1)。

[0334] 使用以下程序进行实验。将单克隆抗五-His抗体(凯杰公司(Qiagen))在PBS中以1 $\mu$ g/ml在4℃下涂覆在96孔微量滴定板上过夜。将hACE2-His受体以0.2 $\mu$ g/ml添加到PBS中并在室温下结合2小时。随后使用0.5% (w/v)的含BSA的PBS的溶液阻断非特异性结合位点。在其它微量滴定板中,将恒定量的10pM或15pM(如表13中所指示的)的SARS-CoV-2RBD-hFc蛋白与在PBS+0.5% BSA中1:10或1:20稀释的抗体结合。在一小时温育后,将这些抗体-蛋白质复合物转移到涂覆有hACE2-His的微量滴定板。在室温下温育1.5小时后,将孔洗涤,并用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗人IgG抗体(杰克森)检测板结合的SARS-CoV-2RBD-hFc蛋白。然后根据制造商的建议使用TMB底物溶液(BD生物科学公司,目录号555214)对板进行显影,并在Victor X5读板仪上测量450nm处的吸光度。

[0335] 通过计算在存在抗体的情况下与不存在抗体的情况下的固定的SARS-CoV-2-S RBD-hFc浓度的信号的减少%来进行数据分析。在计算中,将每个板的恒定SARS-CoV-2-S RBD-hFc的样品在不存在抗体的情况下结合信号称为100%结合或0%阻断;并将仅培养基的样品在不存在SARS-CoV-2RBD-hFc的情况下基线信号称为0%结合或100%阻断。

[0336] 使用阻断ELISA形式评估抗SARS-CoV-2-S抗体阻断SARS-CoV-2-S RBD与人ACE2结合的能力。用HRP缀合的抗-hFc抗体检测到单点测试抗体上清液阻断了10pM或15pM SARS-CoV-2-S RBD-hFc与在涂覆在96孔微量滴定板上的抗His抗体上呈递的hACE2-His的结合。

[0337] 三个测定的阻断结果汇总于表13中。指示了SARS-CoV-2-S结合信号(450nm)和G计算的阻断%。对于测试样品,观察到一定范围的阻断。对于在第6列和第7列中指示NA的样品,在第4列和第5列中包含板校正值,因为数据与那些样品发生的单板切换一致。46个抗体上清液中的43个抗体上清液阻断大于50%的SARS-CoV-2-S RBD-hFc与板涂覆的人ACE2的结合,其中所述抗体上清液中的16个抗体上清液阻断>90%的信号。

[0338] 表13:阻断ELISA结果

上清液	SARS-CoV-2 RBD 固定浓度	上清液稀释度	板校正的 SARS-CoV-2 RBD-hFc 与 His 呈递的 ACE2 的结合 (Abs 450 nm)	板校正的 SARS-CoV-2 RBD-hFc 与 His 呈递的 ACE2 的结合的阻断%	SARS-CoV-2 RBD-hFc 与 His 呈递的 ACE2 的结合 (Abs 450 nm)	SARS-CoV-2 RBD-hFc 与 His 呈递的 ACE2 的结合的阻断%	
[0339]	mAb10913	15 pM	1:10	0.206	80.5	0.206	80.5
	mAb10914	15 pM	1:10	0.326	59.1	0.326	59.1
	mAb10915	15 pM	1:10	0.171	89.7	0.171	89.7
	mAb10932	15 pM	1:10	0.254	57.3	0.254	57.3
	mAb10933	15 pM	1:10	0.158	96.3	0.158	96.3
	mAb10934	15 pM	1:10	0.209	78	0.209	78
	mAb10935	15 pM	1:10	0.238	69.4	0.238	69.4
	mAb10936	15 pM	1:10	0.234	70.6	0.234	70.6
	mAb10937	15 pM	1:10	0.176	88.1	0.176	88.1
	mAb10920	15 pM	1:10	0.601	-56.5	0.601	-56.5
	mAb10921	15 pM	1:10	0.192	82.7	0.192	82.7
	mAb10922	15 pM	1:10	0.181	86.4	0.181	86.4
	mAb10923	15 pM	1:10	0.237	43.6	0.237	43.6
	mAb10924	15 pM	1:10	0.175	78.2	0.175	78.2
	mAb10930	15 pM	1:10	0.241	42.5	0.241	42.5
	mAb10938	15 pM	1:10	0.169	87.5	0.169	87.5
	mAb10939	15 pM	1:10	0.204	65.6	0.204	65.6
	mAb10940	15 pM	1:10	0.152	95.2	0.152	95.2
	mAb10941	15 pM	1:10	0.174	97.2	0.174	97.2
	mAb10982	15 pM	1:10	0.195	83.5	0.195	83.5
	mAb10984	15 pM	1:10	0.166	96.3	NA	NA
	mAb10985	15 pM	1:10	0.162	97	NA	NA
	mAb10986	15 pM	1:10	0.158	97.8	NA	NA
	mAb10987	15 pM	1:10	0.243	81.8	NA	NA
	mAb10988	15 pM	1:10	0.244	84	0.244	84
	mAb10989	15 pM	1:10	0.155	101.8	0.155	101.8
[0340]	mAb10969	15 pM	1:10	0.221	87.8	0.221	87.8
	mAb10970	15 pM	1:10	0.164	97.7	0.164	97.7
	mAb10971	15 pM	1:10	0.17	96.7	0.17	96.7
	mAb10964	15 pM	1:10	0.169	96.9	0.169	96.9
	mAb10965	15 pM	1:10	0.158	98.8	0.158	98.8
	mAb10966	15 pM	1:10	0.157	94.2	0.157	94.2
	mAb10967	15 pM	1:10	0.145	97.9	0.145	97.9
	mAb10954	15 pM	1:10	0.147	97.3	0.147	97.3
	mAb10955	15 pM	1:10	0.162	92.7	0.162	92.7
	mAb10956	15 pM	1:10	0.189	84.5	0.189	84.5
	mAb10957	15 pM	1:10	0.154	95.1	0.154	95.1
	mAb10977	15 pM	1:10	0.315	71.5	0.315	71.5
	mAb11010	10 pM	1:20	0.186	82.1	0.186	82.1
	mAb11004	10 pM	1:20	0.211	70	0.211	70
	mAb11000	10 pM	1:20	0.173	72.7	0.173	72.7
	mAb11006	10 pM	1:20	0.236	58	0.236	58
	mAb11008	10 pM	1:20	0.213	69.1	0.213	69.1
	mAb10998	10 pM	1:20	0.185	61.6	0.185	61.6
	mAb10996	10 pM	1:20	0.295	-18.1	0.295	-18.1
	mAb11002	10 pM	1:20	0.177	79.2	0.177	79.2

[0341] 实例11:通过氢-氘交换质谱法对针对纤突糖蛋白的抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体进行表位作图

[0342] 进行氢-氘交换质谱法 (HDX-MS) 以测定与mAb10989、mAb10987、mAb10934、mAb10933、mAb10920、mAb10922、mAb10936、mAb10954、mAb10964、mAb10977、mAb10984和mAb10986相互作用的SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域 (RBD(氨基酸R319-F541)) 的氨基酸残基。对HDX-MS方法的一般描述在例如以下文献中示出: Ehring (1999) 《分析生物化学》267 (2) :252-259; 以及Engen和Smith (2001) 《分析化学》73:256A-265A。

[0343] 在集成的HDX/MS平台上进行HDX-MS实验, 所述平台由用于氘标记和淬灭的Leaptec HDX PAL系统、用于样品消化和装载的沃特斯(Waters) Acquity I级(Binary溶剂管理器)、用于分析梯度的沃特斯Acquity I级(二元溶剂管理器)以及用于肽质量测量的赛默Q Exactive HF质谱仪组成。

[0344] 在pD 7.0下, 将标记溶液制备为D<sub>2</sub>O中的PBS缓冲液 (10mM磷酸盐缓冲液、140mM NaCl和3mM KCl, 在25°C下相当于pH 7.4)。为了进行氘标记, 在各个时间点一式两份地将10 μL的RBD蛋白或与上文所列出的12种抗体中的每种抗体预混合的RBD蛋白与90μL的D<sub>2</sub>O标记溶液在20°C下一起温育。对于mAb10989、mAb10987、mAb10934和mAb10933, 时间点分别为0分钟(非氘代对照)、5分钟和10分钟。对于mAb10920、mAb10922、mAb10936、mAb10954、mAb10964、mAb10977、mAb10984和mAb10986, 时间点分别为0分钟(非氘代对照)和10分钟。通过向每份样品添加90μL的预冷却的淬灭缓冲液 (0.5M TCEP-HCl, 4M尿素和0.5% 甲酸) 以在20°C下温育90秒钟来淬灭氘化反应。然后将淬灭的样品注射到Leaptec HDX PAL系统以进行在线胃蛋白酶/蛋白酶XIII消化。将消化的肽通过C18柱 (2.1mm × 5mm, 沃特斯) 俘获, 并通过另一个C18柱 (2.1mm × 50mm, 沃特斯) 在-5°C下以20分钟梯度(对于mAb10989、mAb10987、mAb10934和mAb10933) 或以10分钟梯度(对于mAb10920、mAb10922、mAb10936、mAb10954、mAb10956、mAb10964、mAb10977和mAb10984) 与0% 到90% 的流动相B溶液 (流动相A溶液: 含0.5% 甲酸和4.5% 乙腈的水, 流动相B溶液: 含0.5% 甲酸的乙腈) 分离。通过赛默Q Exactive HF质谱法以LC-MS/MS或LC-MS模式对洗脱的肽进行分析。

[0345] 使用Byonic搜索引擎 (Protein Metrics) 针对包含RBD蛋白、胃蛋白酶、蛋白酶XIII的氨基酸序列和其反向序列的数据库搜索来自未氘化RBD蛋白样品的LC-MS/MS数据。使用非特异性酶消化和人糖基化作为常见的变量修饰, 将搜索参数设置为默认值。然后将鉴定的肽的列表输入到HDExaminer软件 (版本3.1) 以计算所有氘化样品的氘摄取 (D-摄取) 和氘摄取百分比的差异 (Δ %D)。氘摄取百分比的差异 (Δ %D) 如下计算。

[0346] 氘摄取的差异 (Δ D) = D-摄取 (RBD-mAb) - D-摄取 (单独的RBD)

$$[0347] \text{氘摄取百分比的差异 } (\Delta \% D) = \frac{\Delta D}{\text{肽的理论最大 D 摄取}} \times 100$$

[0348] 从单独的RBD和与mAb10989样品复合的RBD两者中鉴定出总共190种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为86.06%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即, Δ % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推) 的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸467-513 (DISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL) (SEQ ID NO:835) 的肽显著受mAb10989保护。

[0349] 从单独的RBD和与mAb10987样品复合的RBD两者中鉴定出总共187种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为86.06%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即, Δ % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推) 的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基

酸432-452 (CVIAWNSNNLDSKVGGNNYL) (SEQ ID NO:836) 的肽显著受mAb10987保护。

[0350] 从单独的RBD和与mAb10934样品复合的RBD两者中鉴定出总共188种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为86.06%。将在mAb结合后表现出氨基酸摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸432-452 (CVIAWNSNNLDSKVGGNNYL) (SEQ ID NO:836)、467-474 (DISTEIYQ) (SEQ ID NO: 837) 和480-513 (CNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL) (SEQ ID NO:838) 的肽显著受mAb10934保护。

[0351] 从单独的RBD和与mAb10933样品复合的RBD两者中鉴定出总共188种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为86.06%。将在mAb结合后表现出氨基酸摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸467-510 (DISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRV) (SEQ ID NO:839) 的肽显著受mAb10933保护。

[0352] 从单独的RBD和与mAb10920样品复合的RBD两者中鉴定出总共75种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为83.27%。将在mAb结合后表现出氨基酸摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸471-486 (EIYQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO:840) 和491-515 (PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSF) (SEQ ID NO:841) 的肽显著受mAb10920保护。

[0353] 从单独的RBD和与mAb10922样品复合的RBD两者中鉴定出总共86种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氨基酸摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸432-452 (CVIAWNSNNLDSKVGGNNYL) (SEQ ID NO:836) 的肽显著受mAb10922保护。

[0354] 从单独的RBD和与mAb10936样品复合的RBD两者中鉴定出总共81种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为82.07%。将在mAb结合后表现出氨基酸摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸351-360 (YAWNRKRISN) (SEQ ID NO:842)、432-452 (CVIAWNSNNLDSKVGGNNYL) (SEQ ID NO: 836)、467-486 (DISTEIYQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO:843) 和491-513 (PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL) (SEQ ID NO:844) 的肽显著受mAb10936保护。

[0355] 从单独的RBD和与mAb10954样品复合的RBD两者中鉴定出总共84种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氨基酸摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸400-422 (FVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYN) (SEQ ID NO:845)、453-486 (YRLFRKSNLKPFERDIST EIYQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO:846) 和490-515 (FPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSF) (SEQ ID NO:847) 的肽显著受mAb10954保护。

[0356] 从单独的RBD和与mAb10964样品复合的RBD两者中鉴定出总共109种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为83.67%。将在mAb结合后表现出氨基酸摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸401-424 (VIRGDEVRQIAPGQTGKIADYN) (SEQ ID NO:848) 和471-513 (EIYQAGSTPCNGVEGF NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL) (SEQ ID NO:849) 的肽显著受mAb10964保护。

[0357] 从单独的RBD和与mAb10977样品复合的RBD两者中鉴定出总共78种来自RBD的肽,

这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸351-364 (YAWNRKRISNCVAD) (SEQ ID NO:850) 和471-486 (EIYQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO:840) 的肽显著受mAb10977保护。

[0358] 从单独的RBD和与mAb10984样品复合的RBD两者中鉴定出总共88种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸400-422 (FVIRGDEVRQIAPGQTGKIAIDYN) (SEQ ID NO:845) 和453-486 (YRLFRKSNLKPFERDIS TEIYQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO:846) 的肽显著受mAb10984保护。

[0359] 从单独的RBD和与mAb10986样品复合的RBD两者中鉴定出总共84种来自RBD的肽, 这表示RBD的序列覆盖率为87.25%。将在mAb结合后表现出氘摄取降低5%或更大(即,  $\Delta$  % D值小于-5%, 如-6%、-10%, 以此类推)的任何肽定义为显著受保护的。对应于RBD的氨基酸400-422 (FVIRGDEVRQIAPGQTGKIAIDYN) (SEQ ID NO:845)、453-486 (YRLFRKSNLKPFERDIST EIYQAGSTPCNGVEGF) (SEQ ID NO:846) 和490-515 (FPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSF) (SEQ ID NO:847) 的肽显著受mAb10986保护。

[0360] 总而言之, 所测试的大多数中和抗体以覆盖包括ACE2界面的RBD残基的方式接触RBD; 此外, 可以基于其接触RBD表面的模式对抗体进行分组。上述数据也汇总于表14-25中。

[0361] 表14:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb时显著受保护的纤突蛋白受体结合结构域 (RBD) 肽

[0362]	RBD 残基	5分钟温育			10分钟温育			
		RBD-mAb10989		RBD	RBD-mAb10989		RBD	
		D-摄取	D-摄取	$\Delta$ D	D-摄取	D-摄取	$\Delta$ D	
	467-474	2.67	3.16	-0.49	2.53	3.17	-0.64	<b>-10.5</b>
	470-473	0.48	0.98	-0.50	0.47	0.98	-0.51	<b>-28.0</b>
	470-474	0.99	1.46	-0.47	0.99	1.44	-0.45	<b>-16.9</b>
	471-474	0.51	0.89	-0.38	0.51	0.89	-0.38	<b>-20.9</b>
	475-486	2.20	2.93	-0.73	2.11	2.94	-0.83	<b>-9.7</b>
	475-487	3.31	4.50	-1.19	3.61	4.48	-0.87	<b>-11.4</b>
	475-489	2.77	4.48	-1.71	2.78	4.53	-1.75	<b>-16.0</b>
	475-490	2.63	4.96	-2.33	2.67	4.97	-2.30	<b>-19.8</b>
	480-489	1.82	3.67	-1.85	1.77	3.69	-1.92	<b>-26.2</b>
	483-486	0.31	0.78	-0.47	0.30	0.78	-0.48	<b>-26.5</b>
	487-489	0.05	0.40	-0.35	0.02	0.39	-0.37	<b>-40.4</b>
[0363]	487-490	0.11	0.90	-0.79	0.11	0.84	-0.73	<b>-42.3</b>
	487-491	0.10	1.05	-0.95	0.10	1.03	-0.93	<b>-52.0</b>
	487-495	0.62	1.59	-0.97	0.67	1.57	-0.90	<b>-17.4</b>
	487-509	5.63	6.99	-1.36	5.68	7.02	-1.34	<b>-8.3</b>
	487-510	6.08	7.37	-1.29	6.08	7.44	-1.36	<b>-7.7</b>
	487-512	5.72	6.48	-0.76	5.60	6.77	-1.17	<b>-5.1</b>
	487-513	5.15	6.16	-1.01	5.07	6.14	-1.07	<b>-5.3</b>
	488-490	0.03	0.22	-0.19	0.00	0.23	-0.23	<b>-23.2</b>
	488-491	0.04	0.37	-0.33	0.04	0.36	-0.32	<b>-36.3</b>

[0364] 表15:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10987复合物时显著受保护的纤突蛋白RBD肽

RBD 残基	5分钟温育			10分钟温育				
	RBD-mAb10987		RBD	RBD-mAb10987		RBD		
	D-摄取	D-摄取	ΔD	D-摄取	D-摄取	ΔD	Δ%D	
[0365]	432-441	1.62	2.17	-0.55	1.64	2.18	-0.54	<b>-7.6</b>
	432-449	5.60	6.59	-0.99	5.54	6.59	-1.05	<b>-7.1</b>
	432-452	6.20	7.49	-1.29	6.20	7.46	-1.26	<b>-7.5</b>
	433-441	1.50	2.00	-0.50	1.49	2.01	-0.52	<b>-8.1</b>
	440-452	3.95	4.81	-0.86	4.03	4.80	-0.77	<b>-8.3</b>
	442-449	2.49	2.98	-0.49	2.60	2.99	-0.39	<b>-8.2</b>

[0366] 表16:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10934复合物时显著受保护的RBD肽

RBD 残基	5分钟温育			10分钟温育				
	RBD-mAb10934		RBD	RBD-mAb10934		RBD		
	D-摄取	D-摄取	ΔD	D-摄取	D-摄取	ΔD	Δ%D	
[0367]	432-452	5.70	7.49	-1.79	5.62	7.46	-1.84	<b>-10.6</b>
	433-441	1.60	2.00	-0.40	1.63	2.01	-0.38	<b>-6.2</b>
	434-441	2.24	2.42	-0.18	2.13	2.52	-0.39	<b>-5.3</b>
	440-452	3.12	4.81	-1.69	3.10	4.80	-1.70	<b>-17.1</b>
	442-449	2.37	2.98	-0.61	2.37	2.99	-0.62	<b>-11.4</b>
	442-452	2.67	4.21	-1.54	2.66	4.23	-1.57	<b>-19.1</b>
	443-452	2.53	3.78	-1.25	2.52	3.78	-1.26	<b>-17.5</b>
	444-451	1.79	2.73	-0.94	1.80	2.73	-0.93	<b>-17.2</b>
	444-452	1.82	3.09	-1.27	1.75	3.09	-1.34	<b>-20.7</b>
	445-452	1.24	2.42	-1.18	1.24	2.43	-1.19	<b>-22.0</b>
	467-474	2.64	3.16	-0.52	2.58	3.17	-0.59	<b>-10.2</b>
	470-473	0.51	0.98	-0.47	0.55	0.98	-0.43	<b>-25.0</b>
[0368]	470-474	1.03	1.46	-0.43	1.01	1.44	-0.43	<b>-16.0</b>
	471-474	0.56	0.89	-0.33	0.55	0.89	-0.34	<b>-18.6</b>
	480-489	3.19	3.67	-0.48	3.19	3.69	-0.50	<b>-6.8</b>
	487-489	0.04	0.40	-0.36	0.06	0.39	-0.33	<b>-38.6</b>
	487-490	0.54	0.90	-0.36	0.53	0.84	-0.31	<b>-18.8</b>
	487-491	0.63	1.05	-0.42	0.70	1.03	-0.33	<b>-20.5</b>
	487-495	0.73	1.59	-0.86	0.71	1.57	-0.86	<b>-16.0</b>
	487-509	5.55	6.99	-1.44	5.57	7.02	-1.45	<b>-8.9</b>
	487-510	5.89	7.37	-1.48	6.00	7.44	-1.44	<b>-8.5</b>
	487-513	4.37	6.16	-1.79	4.79	6.14	-1.35	<b>-7.9</b>
	488-509	4.50	5.49	-0.99	4.60	5.52	-0.92	<b>-6.2</b>
	488-510	5.84	6.58	-0.74	5.65	6.67	-1.02	<b>-5.4</b>
	490-509	5.16	6.01	-0.85	5.30	6.12	-0.82	<b>-5.8</b>
	490-512	5.15	6.37	-1.22	5.30	6.28	-0.98	<b>-6.4</b>
	490-513	4.90	6.10	-1.20	5.05	6.05	-1.00	<b>-6.1</b>
	503-509	1.19	1.39	-0.20	1.21	1.41	-0.20	<b>-5.5</b>

[0369] 表17:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10933复合物时显著受保护的RBD肽

RBD 残基	5分钟温育			10分钟温育				
	RBD-mAb10933		RBD	RBD-mAb10933		RBD		
	D-摄取	D-摄取	ΔD	D-摄取	D-摄取	ΔD		
[0370]	467-474	2.52	3.16	-0.64	2.55	3.17	-0.62	<b>-11.7</b>
	470-474	1.03	1.46	-0.43	1.03	1.44	-0.41	<b>-15.6</b>
	471-474	0.54	0.89	-0.35	0.54	0.89	-0.35	<b>-19.5</b>
	475-487	3.62	4.50	-0.88	3.63	4.48	-0.85	<b>-9.6</b>
	475-489	3.21	4.48	-1.27	3.26	4.53	-1.27	<b>-11.8</b>
	480-486	1.79	2.06	-0.27	1.87	2.07	-0.20	<b>-5.1</b>
	480-489	2.13	3.67	-1.54	2.18	3.69	-1.51	<b>-21.2</b>
	483-486	0.61	0.78	-0.17	0.62	0.78	-0.16	<b>-9.3</b>
	487-489	0.02	0.40	-0.38	0.02	0.39	-0.37	<b>-41.6</b>
	487-490	0.42	0.90	-0.48	0.40	0.84	-0.44	<b>-25.6</b>
	487-491	0.46	1.05	-0.59	0.46	1.03	-0.57	<b>-32.0</b>
	487-495	0.74	1.59	-0.85	0.82	1.57	-0.75	<b>-14.8</b>
	487-509	6.01	6.99	-0.98	6.14	7.02	-0.88	<b>-5.7</b>
	487-510	6.29	7.37	-1.08	6.14	7.44	-1.30	<b>-7.0</b>
	488-490	0.19	0.22	-0.03	0.13	0.23	-0.10	<b>-7.4</b>
	488-491	0.26	0.37	-0.11	0.25	0.36	-0.11	<b>-12.3</b>

[0371] 表18:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10920复合物时显著受保护的RBD肽

RBD 残基	10分钟温育				
	RBD-mAb10920		RBD		
	D-摄取	D-摄取	ΔD		
[0372]	471-486	4.63	5.40	-0.77	<b>-6.6</b>
	475-486	2.74	3.27	-0.53	<b>-6.5</b>
	491-513	5.45	6.57	-1.12	<b>-6.6</b>
[0373]	495-510	4.51	5.43	-0.92	<b>-8.5</b>
	495-513	4.41	5.13	-0.72	<b>-5.4</b>
	496-515	3.58	4.35	-0.77	<b>-5.4</b>

[0374] 表19:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10922复合物时显著受保护的RBD肽

RBD 残基	10分钟温育				
	RBD-mAb10922		RBD		
	D-摄取	D-摄取	ΔD		
[0375]	432-441	1.86	2.23	-0.37	<b>-5.3</b>
	442-452	3.52	4.57	-1.05	<b>-13.0</b>

[0376] 表20:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10936复合物时显著受保护的RBD肽

RBD 残基	10分钟温育				
	RBD-mAb10936		RBD		
	D-摄取	D-摄取	ΔD		
[0377]	351-360	2.68	3.10	-0.42	<b>-5.9</b>
	432-441	1.85	2.23	-0.38	<b>-5.3</b>
	442-452	2.55	4.57	-2.02	<b>-25.0</b>
	443-452	2.98	4.01	-1.03	<b>-14.2</b>
	467-470	0.69	0.84	-0.15	<b>-8.1</b>
	471-486	4.73	5.40	-0.67	<b>-5.8</b>
	491-513	5.48	6.57	-1.09	<b>-6.4</b>
	495-510	4.38	5.43	-1.05	<b>-9.8</b>

[0378] 表21:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10954复合物时显著受保护的RBD肽

RBD 残基	10分钟温育				
	RBD-mAb10954		RBD		
	D-摄取	D-摄取	ΔD	Δ%D	
[0379]	400-420	3.67	4.56	-0.89	<b>-5.5</b>
	401-420	3.39	4.22	-0.83	<b>-5.5</b>
	401-421	3.44	4.28	-0.84	<b>-5.2</b>
	406-420	3.32	4.10	-0.78	<b>-7.2</b>
	406-421	3.23	4.11	-0.88	<b>-7.6</b>
	406-422	3.41	4.16	-0.75	<b>-5.9</b>
	407-420	2.86	3.62	-0.76	<b>-7.7</b>
	407-422	2.97	3.74	-0.77	<b>-6.6</b>
	453-466	1.53	2.23	-0.70	<b>-7.1</b>
	453-470	3.63	4.53	-0.90	<b>-6.7</b>
	453-471	4.42	5.22	-0.80	<b>-5.6</b>
	471-486	4.34	5.40	-1.06	<b>-9.1</b>
	472-486	4.47	5.29	-0.82	<b>-7.6</b>
	490-512	5.64	6.65	-1.01	<b>-5.9</b>
	490-513	5.61	6.57	-0.96	<b>-5.3</b>
[0380]	491-513	5.26	6.57	-1.31	<b>-7.7</b>
	493-512	4.86	5.69	-0.83	<b>-5.7</b>
	493-513	4.74	5.72	-0.98	<b>-6.4</b>
	495-510	4.77	5.43	-0.66	<b>-6.2</b>
	495-513	4.10	5.13	-1.03	<b>-7.6</b>
[0380]	496-512	3.60	4.60	-1.00	<b>-8.6</b>
	496-515	3.43	4.35	-0.92	<b>-6.4</b>

[0381] 表22:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10964复合物时显著受保护的RBD肽

RBD 残基	10分钟温育				
	RBD-mAb10964		RBD		
	D-摄取	D-摄取	ΔD	Δ%D	
[0382]	401-421	3.87	4.84	-0.97	<b>-6.0</b>
	406-419	3.34	3.91	-0.57	<b>-5.8</b>
	406-420	3.47	4.15	-0.68	<b>-6.3</b>
	406-421	3.53	4.22	-0.69	<b>-5.9</b>
	406-422	3.66	4.37	-0.71	<b>-5.6</b>
	406-424	3.31	4.24	-0.93	<b>-6.5</b>
	410-422	3.04	3.56	-0.52	<b>-5.8</b>
	471-486	4.65	5.41	-0.76	<b>-6.4</b>
	475-489	3.34	4.56	-1.22	<b>-11.3</b>
	480-489	2.32	3.19	-0.87	<b>-12.1</b>
	487-509	6.38	7.58	-1.20	<b>-7.4</b>
	495-513	4.50	5.20	-0.70	<b>-5.2</b>
	496-512	4.17	4.80	-0.63	<b>-5.4</b>
	496-513	3.90	4.85	-0.95	<b>-7.5</b>

[0383] 表23:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10977复合物时显著受保护的RBD肽

[0384]	RBD 残基	10 分钟温育			
		RBD-mAb10977 RBD		ΔD	Δ%D
		D-摄取	D-摄取		
	351-364	4.82	5.38	-0.56	<b>-5.2</b>
	471-486	3.81	5.40	-1.59	<b>-13.6</b>
	472-486	4.20	5.29	-1.09	<b>-10.1</b>

[0385] 表24:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10984复合物时显著受保护的RBD肽

[0386]	RBD 残基	10 分钟温育			
		RBD-mAb10984 RBD		ΔD	Δ%D
		D-摄取	D-摄取		
	400-420	3.73	4.56	-0.83	<b>-5.2</b>
	401-421	3.47	4.28	-0.81	<b>-5.1</b>
	406-420	3.35	4.10	-0.75	<b>-7.0</b>
	406-421	3.31	4.11	-0.80	<b>-6.9</b>
	406-422	3.47	4.16	-0.69	<b>-5.5</b>
	407-420	2.88	3.62	-0.74	<b>-7.5</b>
	407-422	2.94	3.74	-0.80	<b>-6.8</b>
	453-466	1.51	2.23	-0.72	<b>-7.3</b>
[0387]	453-470	3.70	4.53	-0.83	<b>-6.2</b>
	453-471	4.49	5.22	-0.73	<b>-5.1</b>
	471-486	4.45	5.40	-0.95	<b>-8.1</b>
	472-486	4.63	5.29	-0.66	<b>-6.1</b>

[0388] 表25:相较于单独的RBD在形成RBD-mAb10986复合物时显著受保护的RBD肽

RBD 残基	10 分钟温育			
	RBD-mAb10986	RBD	D-摄取	D-摄取
	ΔD	Δ%D		
[0389]	400-420	3.58	4.56	-0.98 <b>-6.1</b>
	400-421	3.60	4.61	-1.01 <b>-5.9</b>
	401-420	3.30	4.22	-0.92 <b>-6.1</b>
	401-421	3.29	4.28	-0.99 <b>-6.1</b>
	401-422	3.44	4.43	-0.99 <b>-5.8</b>
	406-420	3.28	4.10	-0.82 <b>-7.6</b>
	406-421	3.24	4.11	-0.87 <b>-7.5</b>
	406-422	3.35	4.16	-0.81 <b>-6.4</b>
	407-420	2.81	3.62	-0.81 <b>-8.2</b>
	407-422	2.91	3.74	-0.83 <b>-7.1</b>
	453-466	1.53	2.23	-0.70 <b>-7.1</b>
	453-470	3.55	4.53	-0.98 <b>-7.3</b>
	453-471	4.41	5.22	-0.81 <b>-5.6</b>
	471-486	4.13	5.40	-1.27 <b>-10.9</b>
	490-510	5.13	6.44	-1.31 <b>-8.6</b>
	490-512	5.33	6.65	-1.32 <b>-7.7</b>
	490-513	5.25	6.57	-1.32 <b>-7.3</b>
	491-513	4.29	6.57	-2.28 <b>-13.3</b>
	493-512	4.46	5.69	-1.23 <b>-8.5</b>
	493-513	4.62	5.72	-1.10 <b>-7.2</b>
	495-513	3.89	5.13	-1.24 <b>-9.3</b>
	496-513	3.36	4.53	-1.17 <b>-9.3</b>
	496-515	3.05	4.35	-1.30 <b>-9.1</b>

[0390] 实例12:SARS-CoV-2野生型和变体纤突蛋白的中和

[0391] 为了测试抗SARS-CoV-2纤突蛋白抗体是否能够中和SARS-CoV-2变体,针对表达野生型和变体纤突蛋白的一组VSV假型化病毒对这些抗体进行了筛选。通过用对SARS-CoV-2纤突蛋白进行编码的质粒或含有对SARS-CoV-2纤突蛋白氨基酸序列进行编码的已知变体的核苷酸变异的相同质粒瞬时转染293T细胞来产生VSV假型化病毒。通过Sanger测序来确认所有质粒。在使用125 $\mu$ L Lipofectamine LTX、30 $\mu$ L PLUS试剂和高达3mL Opti-Mem转染15 $\mu$ g/板纤突DNA前一天,在DMEM完全培养基(1000mL DMEM, Gibco; 100mL FBS, Gibco; 10mL PSG, Gibco)中将细胞以每板 $1.2 \times 10^7$ 个细胞接种在15cm的板中。转染后24小时,将细胞用10mL PBS洗涤,然后在10mL的Opti-Mem中用0.1VSV $^{\Delta G:mNeon}$ 病毒的MOI感染。将病毒在细胞上温育1小时,每10分钟轻轻摇动一次。将细胞用10mL PBS洗涤3次,然后用20mL感染培养基(1000mL DMEM, Gibco; 10mL丙酮酸钠, Gibco; 7mL BSA, 西格玛公司; 5mL庆大霉素, Gibco)覆盖,然后在37°C、5% CO<sub>2</sub>下温育24小时。将假病毒上清液收集在冰上的250mL离心管中,然后以3000rpm离心5分钟以沉淀任何细胞碎片,在冰上等分,然后冷冻到-80°C。在用于中和测定中之前,在Vero细胞上测试感染性。这个材料将被称为VSV $^{\Delta G:mNeon}$ /纤突假病毒或VSV $^{\Delta G:mNeon}$ /纤突\_(变体氨基酸突变)(例如,VSV $^{\Delta G:mNeon}$ /纤突\_H49Y)。

[0392] 在第1天,将Vero细胞以80%汇合度接种在T225烧瓶中,将细胞用PBS(Gibco: 20012-043)洗涤,添加TrypLE以使细胞从烧瓶脱落,并添加完整DMEM以灭活胰蛋白酶。将20,000个Vero细胞平板接种在96孔黑色聚苯乙烯微板(康宁公司:3904)中的每孔100 $\mu$ L的

预热的完整DMEM中。在第2天,将VSV<sup>ΔG:mNeon</sup>/纤突假病毒在冰上融化并用感染培养基稀释。将抗体在U型底96孔板中稀释,从而在210 $\mu$ L感染培养基中以2倍测定浓度产生每种抗体的稀释液。将120 $\mu$ L的经过稀释的抗体转移到新鲜的U型底板,并向每个板添加培养基和IgG1对照抗体。将120 $\mu$ L的经过稀释的假病毒添加到除培养基对照孔之外的每个孔。向这些孔添加120 $\mu$ L的感染培养基。将带有抗体的假病毒在室温下温育30分钟,然后将培养基从Vero细胞去除。将100 $\mu$ L的抗体/假病毒混合物添加到细胞,并且然后在37℃、5% CO<sub>2</sub>下温育24小时。在第3天,将上清液从细胞孔去除,并用100 $\mu$ L的PBS置换。在带有MiniMax成像细胞仪的SpectraMax i3上对板进行读取。

[0393] 除使用非复制型VSV-SARS-CoV-2-S病毒测试中和能力之外,还使用SARS-CoV-2病毒测试抗体。将单克隆抗体和抗体组合在DMEM(质量生物有限公司(Quality Biological))中连续稀释,补充10% (v/v) 热灭活胎牛血清(西格玛公司),1% (v/v) 青霉素/链霉素(李连生物制品公司(Gemini Bio-products))和1% (v/v) L-谷氨酰胺(2mM最终浓度,Gibco)(VeroE6培养基)到250 $\mu$ L的最终体积。接下来,将250 $\mu$ L的含SARS-CoV-2 (WA-1) (1000PFU/mL)的VeroE6培养基添加到每个血清稀释液并添加到250 $\mu$ L培养基作为未经处理的对照。将病毒-抗体混合物在37℃下温育60分钟。温育后,通过噬菌斑测定来测定混合物的病毒滴度。最后,使用4参数对数曲线拟合到中和百分比数据(GraphPad软件,加利福尼亚州拉荷亚)来计算50% 噬菌斑减少中和滴度(PRNT50)值(相对于未经处理的对照的噬菌斑形成,噬菌斑形成减少50%的血清稀释度)。

[0394] 在Vero细胞中测定对纤突蛋白(S-wt)的武汉-Hu-1 (NCBI登录号MN908947.3)序列进行编码的表达VSV-SARS-CoV-2纤突蛋白(S)的假病毒的单独的单克隆抗体的半数最大抑制浓度(IC50) (表26)。大多数抗体在皮摩尔范围(pM)内显示出中和效力,其中有些抗体在纳摩尔(nM)范围内表现出中和效力。

[0395] 虽然重组ACE2能够介导VSV-纤突假颗粒的中和,但是如先前所报道的,其效力远低于单克隆抗体的效力,相对于最佳中和mAb,其效力下降多于1000倍(图10A)。另外,mAb10987、mAb10989、mAb10933和mAb10934的有效中和活性在中和测定中得到证实,包含中和VeroE6细胞中的SARS-CoV-2(图10B)。所有中和测定跨四个mAb (mAb10987、mAb10989、mAb10933和mAb10934)产生类似的效力,并且没有组合显示出协同中和活性(图10B)。

[0396] 表26:针对Vero细胞中的VSV-SARS-CoV-2-S假颗粒的野生型菌株的mAb中和效力(IC50 (M))

抗体	IC50 (M)
<b>mAb10934</b>	5.44E - 11
<b>mAb10936</b>	1.11E - 10
<b>mAb10987</b>	4.06E - 11
<b>mAb10924</b>	1.36E - 10
<b>mAb10935</b>	2.21E - 10
<b>mAb10913</b>	2.31E - 10
<b>mAb10939</b>	2.36E - 10
<b>mAb10937</b>	2.62E - 10
<b>mAb10920</b>	2.64E - 10
<b>mAb10941</b>	2.78E - 10
<b>mAb10923</b>	3.29E - 10
<b>mAb10915</b>	3.40E - 10
<b>mAb10932</b>	3.58E - 10
<b>mAb10921</b>	3.74E - 10
<b>mAb10914</b>	3.94E - 10
<b>mAb10940</b>	5.43E - 10
<b>mAb10989</b>	7.23E - 12
<b>mAb10938</b>	6.65E - 10
<b>mAb10922</b>	1.21E - 10
<b>mAb10930</b>	1.07E - 09
<b>mAb10954</b>	9.22E - 11
<b>mAb10955</b>	1.19E - 10
<b>mAb10933</b>	4.28E - 11
<b>mAb10956</b>	1.28E - 10
<b>mAb10957</b>	1.76E - 10
<b>mAb10964</b>	5.70E - 11
<b>mAb10965</b>	1.42E - 10
<b>mAb10966</b>	1.00E - 10
<b>mAb10967</b>	2.43E - 10

[0397]

<b>mAb10970</b>	1.26E - 10
<b>mAb10971</b>	1.55E - 10
<b>mAb10977</b>	5.15E - 11
<b>mAb10982</b>	3.69E - 10
<b>mAb10984</b>	9.73E - 11
<b>mAb10985</b>	2.57E - 10
<b>mAb10986</b>	9.91E - 11
<b>mAb10988</b>	2.98E - 10
<b>mAb10969</b>	2.27E - 09
<b>mAb10996</b>	1.13E - 08
<b>mAb10998</b>	9.51E - 09
<b>mAb11002</b>	非中和
<b>mAb11000</b>	2.79E - 08
<b>mAb11004</b>	6.00E - 09
<b>mAb11006</b>	1.40E - 09
<b>mAb11008</b>	2.05E - 08
<b>mAb11010</b>	非中和

[0398]

[0399] 从表示全球循环菌株的7000多个公开可用的SARS-CoV-2序列鉴定了纤突(S)蛋白中的氨基酸变体，并将其克隆到VSV假颗粒中。用对变体进行编码的假颗粒进行中和测定以评估每种变体对单克隆抗体的中和效力的影响。表27展示了针对对变体进行编码的假颗粒的单克隆抗体相对于单一浓度为5μg/ml的SARS-CoV-2纤突(S-wt)的相对中和效力。对于每个单独的抗体和变体，捕获相对于S-wt的中和百分比。除mAb10985和R408I变体以外，没有抗体在5μg/ml浓度下展示出中和效力丧失。这些数据证实了针对全球循环SARS-CoV-2纤突变体的单克隆抗体的广泛的功能性中和覆盖率。

[0400] 为了进一步询问S蛋白变体对单克隆抗体的中和效力的影响，运行了完整中和曲线以测定针对位于S蛋白的受体结合结构域(RBD)内的变体的亚群的最有效的中和抗体的IC50值。表28示出了每种变体假颗粒的IC50中和值。在假颗粒中和测定之间可以观察到高达3倍的固有变异性，并且其并非指示中和效力的变化。这些数据证实了抗体保留其针对一组不同的S蛋白RBD变体的中和效力。

[0401] 表27. Vero细胞中的抗体浓度为5μg/ml的对S蛋白进行编码的VSV-SARS-CoV-2变体的相对中和

	<b>mAb</b>	<b>wt</b>	<b>H49Y</b>	<b>S50L</b>	<b>V341I</b>	<b>N354D</b>	<b>S359N</b>	<b>V367F</b>	<b>K378R</b>
[0402]	<b>mAb10989</b>	100%	100%	88%	100%	100%	99%	100%	100%
	<b>mAb10987</b>	100%	100%	96%	99%	100%	99%	100%	100%
	<b>mAb10933</b>	100%	100%	96%	99%	100%	99%	100%	99%
	<b>mAb10977</b>	100%	100%	98%	100%	99%	100%	100%	100%
	<b>mAb10934</b>	100%	100%	95%	100%	100%	99%	100%	99%
[0403]	<b>mAb10964</b>	100%	100%	90%	100%	99%	99%	100%	100%
	<b>mAb10954</b>	100%	100%	92%	100%	100%	99%	100%	100%
	<b>mAb10984</b>	100%	100%	95%	100%	99%	99%	100%	99%
	<b>mAb10986</b>	100%	100%	98%	100%	99%	99%	100%	100%
	<b>mAb10966</b>	100%	100%	90%	100%	99%	99%	100%	100%
	<b>mAb10936</b>	100%	100%	96%	100%	99%	99%	100%	100%
	<b>mAb10955</b>	100%	100%	95%	99%	99%	99%	100%	100%
	<b>mAb10922</b>	100%	100%	98%	99%	99%	99%	100%	99%
	<b>mAb10970</b>	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%
	<b>mAb10956</b>	100%	100%	96%	99%	99%	99%	100%	100%
	<b>mAb10924</b>	100%	100%	96%	100%	99%	99%	100%	99%
	<b>mAb10965</b>	100%	100%	96%	100%	99%	100%	100%	100%
	<b>mAb10971</b>	100%	100%	90%	99%	99%	99%	100%	99%
	<b>mAb10957</b>	100%	100%	91%	99%	99%	98%	100%	99%
	<b>mAb10935</b>	100%	NR	NR	NR	NR	99%	NR	99%
	<b>mAb10913</b>	100%	100%	93%	100%	99%	98%	100%	99%
	<b>mAb10939</b>	100%	100%	93%	98%	99%	100%	100%	99%
	<b>mAb10967</b>	100%	100%	90%	99%	99%	98%	100%	100%
	<b>mAb10985</b>	100%	100%	96%	99%	99%	98%	100%	99%
	<b>mAb10937</b>	100%	100%	92%	99%	100%	98%	100%	99%
	<b>mAb10920</b>	100%	100%	92%	99%	99%	99%	100%	99%
	<b>mAb10941</b>	100%	99%	97%	99%	100%	99%	100%	100%
	<b>mAb10988</b>	100%	100%	99%	100%	99%	98%	100%	100%
	<b>mAb10923</b>	100%	101%	102%	97%	103%	105%	104%	103%
	<b>mAb10915</b>	100%	100%	95%	100%	99%	99%	100%	99%
	<b>mAb10932</b>	100%	100%	93%	100%	99%	99%	100%	99%
	<b>mAb10982</b>	100%	100%	94%	99%	99%	99%	100%	100%

[0404] 表27(续)

<b>mAb</b>	<b>R408I</b>	<b>Q409E</b>	<b>A435S</b>	<b>K458R</b>	<b>G476S</b>	<b>Y483A</b>	<b>Y508H</b>	<b>H519P</b>	<b>D614G</b>	
[0405]	<b>mAb10989</b>	100%	101%	100%	99%	99%	100%	100%	97%	100%
	<b>mAb10987</b>	99%	100%	100%	99%	99%	99%	100%	97%	100%
	<b>mAb10933</b>	100%	99%	100%	99%	99%	100%	100%	98%	100%
	<b>mAb10977</b>	100%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	97%	100%
	<b>mAb10934</b>	100%	100%	100%	98%	98%	99%	100%	97%	100%
	<b>mAb10964</b>	99%	100%	99%	98%	100%	99%	100%	96%	100%
	<b>mAb10954</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	100%
	<b>mAb10984</b>	99%	100%	100%	99%	99%	100%	100%	96%	100%
	<b>mAb10986</b>	100%	100%	100%	98%	99%	100%	100%	99%	100%
	<b>mAb10966</b>	99%	100%	100%	99%	100%	99%	100%	96%	100%
	<b>mAb10936</b>	99%	100%	100%	99%	99%	99%	100%	97%	100%
	<b>mAb10955</b>	100%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	97%	100%
	<b>mAb10922</b>	99%	100%	100%	98%	99%	99%	100%	97%	99%
	<b>mAb10970</b>	100%	101%	100%	100%	99%	99%	100%	99%	100%
	<b>mAb10956</b>	100%	100%	99%	99%	100%	99%	100%	97%	100%
	<b>mAb10924</b>	99%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	98%	100%
	<b>mAb10965</b>	99%	100%	100%	99%	100%	99%	100%	98%	100%
[0406]	<b>mAb10971</b>	99%	100%	100%	99%	99%	99%	100%	98%	100%
	<b>mAb10957</b>	99%	100%	99%	98%	99%	99%	100%	98%	100%
	<b>mAb10935</b>	NR	NR	NR	NR	98%	NR	99%	NR	NR
	<b>mAb10913</b>	99%	100%	100%	99%	98%	99%	99%	97%	100%
	<b>mAb10939</b>	99%	100%	99%	98%	97%	98%	100%	96%	100%
	<b>mAb10967</b>	99%	99%	99%	98%	99%	98%	100%	97%	100%
	<b>mAb10985</b>	26%	100%	100%	99%	99%	100%	99%	97%	99%
	<b>mAb10937</b>	100%	99%	99%	99%	99%	100%	99%	98%	100%
	<b>mAb10920</b>	99%	100%	100%	99%	98%	100%	99%	98%	100%
	<b>mAb10941</b>	99%	100%	100%	98%	98%	98%	100%	96%	100%
	<b>mAb10988</b>	100%	101%	99%	99%	99%	100%	99%	98%	100%
	<b>mAb10923</b>	103%	104%	100%	100%	96%	98%	101%	97%	101%
	<b>mAb10915</b>	98%	100%	100%	98%	97%	100%	99%	97%	100%
	<b>mAb10932</b>	99%	100%	99%	99%	98%	100%	99%	98%	100%
	<b>mAb10982</b>	99%	100%	99%	98%	99%	99%	100%	98%	100%
[0408]	[0407] 表28.Vero细胞中VSV-SARS-CoV-2-S RBD变体的中和IC50 (M)									
		<b>Q321S</b>	<b>V341I</b>	<b>A348T</b>	<b>N354D</b>	<b>S359N</b>	<b>V376F</b>	<b>K378S</b>	<b>R408I</b>	
	<b>mAb10933</b>	6.85E - 11	3.37E - 11	4.13E - 11	5.89E - 11	2.12E - 11	2.40E - 11	3.52E - 11	1.98E - 11	
	<b>mAb10934</b>	6.84E - 11	7.42E - 11	1.42E - 10	9.76E - 11	3.04E - 11	3.20E - 11	4.65E - 11	2.75E - 11	
	<b>mAb10984</b>	2.75E - 10	2.49E - 10	2.01E - 10	2.64E - 10	1.23E - 10	1.53E - 10	1.88E - 10	1.35E - 10	
	<b>mAb10986</b>	2.06E - 10	1.92E - 10	1.03E - 10	2.49E - 10	8.91E - 11	1.49E - 10	1.54E - 10	6.14E - 11	
	<b>mAb10987</b>	5.02E - 11	3.38E - 11	2.98E - 11	2.68E - 11	2.41E - 11	1.78E - 11	2.40E - 11	1.71E - 11	
	<b>mAb10989</b>	1.46E - 11	1.61E - 11	7.33E - 12	1.14E - 11	4.30E - 12	1.33E - 11	1.21E - 11	1.09E - 11	
	<b>mAb10964</b>	5.65E - 11	1.13E - 10	3.52E - 11	1.93E - 10	6.83E - 11	8.92E - 11	6.19E - 11	4.96E - 11	
	<b>mAb10954</b>	2.32E - 10	2.52E - 10	1.84E - 10	2.84E - 10	1.09E - 10	1.29E - 10	1.65E - 10	9.88E - 11	
[0409]	<b>IgG1 同种型对照</b>	N/A								
	[0409] 表28(续)									

	<b>Q409E</b>	<b>A435S</b>	<b>K458R</b>	<b>I472V</b>	<b>G476S</b>	<b>V483A</b>	<b>Y508H</b>	<b>H519P</b>	
[0410]	<b>mAb10933</b>	5.65E - 11	4.71E - 11	3.43E - 11	9.17E - 11	1.41E - 10	1.54E - 11	4.77E - 11	3.03E - 11
	<b>mAb10934</b>	5.94E - 11	8.07E - 11	3.46E - 11	9.40E - 11	3.51E - 11	4.43E - 11	6.73E - 11	3.56E - 11
	<b>mAb10984</b>	1.52E - 10	2.18E - 10	1.59E - 10	2.61E - 10	2.10E - 10	1.71E - 10	2.83E - 10	1.08E - 10
	<b>mAb10986</b>	1.95E - 10	1.51E - 10	1.00E - 10	2.24E - 10	1.13E - 10	9.70E - 11	2.01E - 10	6.14E - 11
	<b>mAb10987</b>	4.06E - 11	3.88E - 11	1.68E - 11	4.18E - 11	1.86E - 11	2.60E - 11	2.75E - 11	2.20E - 11
	<b>mAb10989</b>	2.12E - 11	1.10E - 11	7.51E - 12	2.27E - 11	6.80E - 12	8.78E - 12	1.71E - 11	4.51E - 12
	<b>mAb10964</b>	6.61E - 11	7.90E - 11	5.46E - 11	1.01E - 10	3.42E - 11	4.50E - 11	1.02E - 10	4.45E - 11
	<b>mAb10954</b>	2.64E - 10	2.11E - 10	1.45E - 10	3.44E - 10	1.83E - 10	1.12E - 10	2.05E - 10	1.40E - 10
	<b>IgG1 同种型对照</b>	N/A							

[0411] 实例13:经纯化的抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体的Biacore结合动力学

[0412] 使用基于实时表面等离振子共振的Biacore T200/Biacore 8K生物传感器测定与经过纯化的CH0t抗SARS-CoV-2单克隆抗体 (mAb) 结合的不同的SARS-CoV-2RBD试剂的平衡解离常数 ( $K_d$ )。所有结合研究在25°C和37°C下在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05% v/v表面活性剂吐温-20、pH为7.4的 (HBS-ET) 运行缓冲液中进行。首先将Biacore CM5传感器芯片表面通过与小鼠抗人Fc特异性mAb(再生元公司 (Regeneron) ,mAb2567)进行胺偶联来衍生化以捕获抗SARS-CoV-2bmAb。对用C端myc-myc-六组氨酸表达的人SARS-CoV-2RBD细胞外结构域 (SARS-CoV-2RBD-MMH) 和用C端小鼠IgG2a表达的SARS-CoV-2RBD细胞外结构域 (SARS-CoV-2RBD-mFc) 进行结合研究。使用这些试剂允许对抗体分别结合单体和二聚体RBD肽的能力进行测试。

[0413] 在HBS-ET运行缓冲液中制备不同浓度的hSARS-CoV-2RBD-MMH (90nM-3.33nM, 3倍稀释度) 和SARS-CoV-2RBD-mFc (30nM-1.11nM, 3倍稀释度), 并将其以50微升/分钟的流动速率注射3分钟, 同时在HBS-ET运行缓冲液中监测mAb结合的不同SARS-CoV-2RBD试剂的解离6-10分钟。在每个循环结束时, 使用12秒注射20mM磷酸的小鼠抗人Fc特异性mAb表面再生SARS-CoV-2RBD mAb捕获表面。缔合率 ( $k_a$ ) 和解离率 ( $k_d$ ) 通过使用Bia评价软件v3.1或Biacore洞察评价软件v2.0或曲线拟合软件将实时结合传感图拟合到具有质量传输限制的1:1结合模型来测定。结合解离平衡常数 ( $K_d$ ) 和解离半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 是根据动力学速率如下计算的:

$$[0414] K_D (M) = \frac{kd}{ka} \text{, 并且 } t\% \text{ (分钟)} = \frac{\ln(2)}{60*kd}$$

[0415] 不同的SARS-CoV-2mAb与本发明的不同的抗SARS-CoV-2RBD试剂在25°C和37°C下结合的结合动力学参数分别示出于表29到32中。

[0416] 表29:SARS-CoV-2RBD-MMH与抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体在25°C下结合的结合动力学参数。

所捕获的 mAb (mAb#)	mAb 捕获水 平 (RU)	所结合的 90 nM Ag (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
[0417]	mAb10913	287 $\pm$ 3	55.9	4.04E + 05	2.12E - 02	5.26E - 08
	mAb10914	310 $\pm$ 2	51.1	8.81E + 04	3.76E - 03	4.26E - 08
	mAb10915	310 $\pm$ 2	63.2	9.61E + 04	1.08E - 04	1.13E - 09
	mAb10920	307 $\pm$ 3	73.9	4.52E + 05	1.30E - 02	2.87E - 08
	mAb10921	307 $\pm$ 3	61.4	1.01E + 05	4.75E - 04	4.71E - 09
	mAb10922	312.2 $\pm$ 1.7	120.2	6.14E + 05	1.48E - 03	2.41E - 09
	mAb10923	283 $\pm$ 2	80.4	4.66E + 05	6.17E - 03	1.32E - 08
	mAb10924	319 $\pm$ 2	94.6	2.07E + 05	1.74E - 03	8.40E - 09
	mAb10930	284.7 $\pm$ 0.7	59.6	1.24E + 05	3.34E - 03	2.70E - 08
	mAb10932	315 $\pm$ 3	79.4	8.99E + 04	1.21E - 04	1.35E - 09
	mAb10933	280 $\pm$ 1	99.8	1.52E + 06	2.78E - 03	1.83E - 09
	mAb10934	280 $\pm$ 1	103.4	4.82E + 06	5.77E - 03	1.20E - 09
	mAb10935	337 $\pm$ 2	107.8	3.93E + 05	4.19E - 03	1.07E - 08
	mAb10936	311 $\pm$ 2	107.3	5.45E + 05	1.07E - 03	1.97E - 09
	mAb10937	311 $\pm$ 2	102.2	5.72E + 05	4.76E - 03	8.34E - 09
[0418]	mAb10938	338 $\pm$ 3	61.5	7.27E + 04	1.75E - 04	2.41E - 09
	mAb10939	343 $\pm$ 2	82.3	1.63E + 05	2.84E - 03	1.74E - 08
	mAb10940	338 $\pm$ 3	103.5	8.01E + 05	2.51E - 03	3.13E - 09
	mAb10941	327 $\pm$ 1	92.1	1.20E + 05	4.12E - 04	3.43E - 09
	mAb10954	286.9 $\pm$ 3	110.5	4.04E + 05	3.64E - 04	8.99E - 10
	mAb10955	298.3 $\pm$ 2.5	88.8	1.61E + 05	2.12E - 03	1.32E - 08
	mAb10956	293.7 $\pm$ 0.6	86.6	2.22E + 05	4.06E - 03	1.82E - 08
	mAb10957	286.7 $\pm$ 2	93.0	1.38E + 05	2.53E - 04	1.84E - 09
	mAb10964	259.6 $\pm$ 1.2	99.9	1.65E + 06	3.90E - 04	2.36E - 10
	mAb10965	253.1 $\pm$ 1.9	63.6	1.24E + 05	2.92E - 03	2.35E - 08
	mAb10966	266.6 $\pm$ 3	97.4	2.37E + 05	3.65E - 04	1.54E - 09
	mAb10967	260.2 $\pm$ 0.9	70.7	1.24E + 05	6.28E - 05	5.08E - 10
	mAb10969	272.2 $\pm$ 1.3	87.1	2.45E + 05	3.80E - 03	1.55E - 08
	mAb10970	307.3 $\pm$ 1.3	102.8	2.27E + 05	1.10E - 03	4.85E - 09
	mAb10971	263.1 $\pm$ 1.1	89.3	2.15E + 05	3.75E - 04	1.74E - 09
	mAb10977	305 $\pm$ 3	98.5	2.43E + 05	2.57E - 04	1.06E - 09
	mAb10982	267.8 $\pm$ 0.5	69.3	1.23E + 05	2.06E - 03	1.68E - 08
	mAb10984	334 $\pm$ 2.1	117.9	2.04E + 05	4.26E - 04	2.09E - 09
	mAb10985	306.9 $\pm$ 2.1	113.4	1.44E + 06	1.55E - 03	1.08E - 09
	mAb10986	268.8 $\pm$ 0.9	104.3	4.64E + 05	1.49E - 04	3.21E - 10
	mAb10987	270.8 $\pm$ 1.3	78.0	5.60E + 05	1.20E - 02	2.14E - 08
	mAb10988	279.2 $\pm$ 2.3	63.6	8.29E + 05	2.71E - 02	3.27E - 08
	mAb10989	316.7 $\pm$ 1.6	114.3	1.86E + 06	2.78E - 03	1.50E - 09
	mAb10996	414.2 $\pm$ 2.8	37.5	1.41E + 05	2.28E - 02	1.61E - 07
	mAb10998	212.3 $\pm$ 1	17.7	3.54E + 05	1.84E - 02	5.21E - 08
	mAb11000	322.6 $\pm$ 3.5	73.6	1.09E + 06	1.14E - 03	1.04E - 09
	mAb11002	291.7 $\pm$ 2.7	13.8	1.65E + 05	6.73E - 03	4.07E - 08
	mAb11004	232.9 $\pm$ 0.6	76.4	3.79E + 05	3.24E - 03	8.54E - 09
	mAb11006	277.2 $\pm$ 1.1	66.9	9.67E + 04	4.40E - 04	4.55E - 09
	mAb11008	214.9 $\pm$ 1.5	40.8	9.30E + 04	3.27E - 03	3.52E - 08
	mAb11010	221.8 $\pm$ 1.3	76.8	1.11E + 06	2.74E - 03	2.47E - 09
	mAb1932	205 $\pm$ 0.8	5.3	NB	NB	NB

[0419] 表30:SARS-COV-2RBD-MMH与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在37℃下结合的结合动力学参数。

所捕获的 mAb (mAb#)	mAb 捕获水 平 (RU)	所结合的 90 nM Ag (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
[0420]	mAb10913	366 $\pm$ 6	49	5.29E + 05	5.56E - 02	1.05E - 07
	mAb10914	401 $\pm$ 3	63	2.51E + 05	1.58E - 02	6.27E - 08
	mAb10915	401 $\pm$ 3	93	1.57E + 05	7.57E - 04	4.84E - 09
	mAb10920	394 $\pm$ 3	73	6.10E + 05	3.41E - 02	5.60E - 08
	mAb10921	394 $\pm$ 3	87	1.60E + 05	2.07E - 03	1.29E - 08
[0421]	mAb10922	405.6 $\pm$ 1.7	130	1.04E + 06	9.27E - 03	8.89E - 09
	mAb10923	355 $\pm$ 3	84	6.15E + 05	2.76E - 02	4.48E - 08
	mAb10924	406 $\pm$ 5	110	2.99E + 05	6.18E - 03	2.07E - 08
	mAb10930	373.9 $\pm$ 3.5	42	2.30E + 05	1.87E - 02	8.14E - 08
	mAb10932	406 $\pm$ 4	119	1.43E + 05	6.55E - 04	4.57E - 09
	mAb10933	368 $\pm$ 3	124	2.37E + 06	8.28E - 03	3.49E - 09
	mAb10934	368 $\pm$ 3	117	4.62E + 06	2.32E - 02	5.02E - 09
	mAb10935	430 $\pm$ 5	75	4.37E + 05	3.74E - 02	8.56E - 08
	mAb10936	402 $\pm$ 3	126	9.75E + 05	5.51E - 03	5.65E - 09
	mAb10937	402 $\pm$ 3	107	9.68E + 05	2.43E - 02	2.51E - 08
	mAb10938	434 $\pm$ 3	100	1.06E + 05	1.12E - 03	1.05E - 08
	mAb10939	439 $\pm$ 5	90	2.40E + 05	9.46E - 03	3.95E - 08
	mAb10940	434 $\pm$ 3	124	1.42E + 06	1.23E - 02	8.70E - 09
	mAb10941	418 $\pm$ 3	134	1.97E + 05	1.75E - 03	8.87E - 09
	mAb10954	371.8 $\pm$ 2	131	5.68E + 05	1.35E - 03	2.38E - 09
	mAb10955	384.1 $\pm$ 6.3	81	2.85E + 05	1.26E - 02	4.43E - 08
	mAb10956	383 $\pm$ 2.3	89	3.56E + 05	1.30E - 02	3.65E - 08
	mAb10957	322 $\pm$ 2.1	124	2.44E + 05	6.19E - 04	2.54E - 09
	mAb10964	333.3 $\pm$ 4.6	121	3.68E + 06	2.08E - 03	5.64E - 10
	mAb10965	326.8 $\pm$ 1.2	67	2.23E + 05	9.19E - 03	4.12E - 08
	mAb10966	350.2 $\pm$ 2.9	118	4.40E + 05	1.67E - 03	3.79E - 09
	mAb10967	336 $\pm$ 2.2	108	1.91E + 05	2.62E - 04	1.38E - 09
	mAb10969	349.5 $\pm$ 3	86	4.07E + 05	1.59E - 02	3.92E - 08
	mAb10970	393.8 $\pm$ 3.4	104	3.33E + 05	7.58E - 03	2.28E - 08
	mAb10971	347 $\pm$ 1.9	116	3.92E + 05	9.79E - 04	2.50E - 09
	mAb10977	341 $\pm$ 1.4	122	4.35E + 05	1.31E - 03	3.01E - 09
	mAb10982	347.5 $\pm$ 1.3	67	1.94E + 05	9.42E - 03	4.85E - 08
	mAb10984	422.5 $\pm$ 0.7	144	3.28E + 05	1.82E - 03	5.55E - 09
	mAb10985	395.5 $\pm$ 2.5	134	2.57E + 06	4.23E - 03	1.65E - 09
	mAb10986	349.3 $\pm$ 1.5	129	8.24E + 05	5.83E - 04	7.07E - 10
	mAb10987	354 $\pm$ 5.3	82	8.38E + 05	2.51E - 02	3.00E - 08
	mAb10988	364.4 $\pm$ 2.6	52	9.19E + 05	5.78E - 02	6.29E - 08
	mAb10989	405.6 $\pm$ 1.9	128	2.97E + 06	1.16E - 02	3.90E - 09
	mAb10996	524.3 $\pm$ 2.8	43	1.06E + 05	1.25E - 02	1.19E - 07
	mAb10998	271.1 $\pm$ 0.6	15	2.81E + 05	7.54E - 03	2.68E - 08
	mAb11000	418.2 $\pm$ 1	87	2.89E + 05	9.10E - 03	3.14E - 08
	mAb11002	370.1 $\pm$ 2.5	12	2.81E + 05	7.54E - 03	2.68E - 08
	mAb11004	297.8 $\pm$ 0.4	79	1.75E + 06	1.48E - 03	8.48E - 10
	mAb11006	350.2 $\pm$ 1.2	92	6.28E + 05	1.48E - 02	2.35E - 08
	mAb11008	289.4 $\pm$ 2.7	38	1.42E + 05	1.51E - 03	1.06E - 08
	mAb11010	286.3 $\pm$ 0.5	96	1.67E + 05	1.45E - 02	8.71E - 08
	mAb1932	265.3 $\pm$ 1.4	5	NB	NB	NB

[0422] 表31:SARS-COV-2RBD-mFc与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在25℃下结合的结合动力学参数。

所捕获的 mAb (mAb#)	mAb 捕获水 平 (RU)	所结合的 30 nM Ag (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
[0423]	mAb10913	107 ± 0.4	65	5.00E + 06	2.77E - 04	5.53E - 11
	mAb10914	116 ± 0.8	44	2.59E + 05	1.40E - 04	5.40E - 10
	mAb10915	103 ± 0.2	41	2.83E + 05	9.13E - 06	3.23E - 11
	mAb10920	116 ± 0.9	69	5.08E + 06	2.55E - 04	5.02E - 11
	mAb10921	104 ± 0.2	39	2.66E + 05	3.34E - 05	1.25E - 10
	mAb10922	111.4 ± 0.8	80	3.20E + 06	5.64E - 05	1.76E - 11
	mAb10923	110 ± 1.0	71	3.69E + 06	1.35E - 04	3.67E - 11
	mAb10924	121 ± 0.5	74	8.09E + 05	7.63E - 05	9.43E - 11
	mAb10930	104.2 ± 0.9	61	9.43E + 05	1.71E - 04	1.81E - 10
	mAb10932	121 ± 0.8	60	2.95E + 05	2.85E - 05	9.67E - 11
	mAb10933	108 ± 0.5	72	6.16E + 06	6.10E - 05	9.89E - 12
	mAb10934	113 ± 0.5	70	1.12E + 07	1.56E - 04	1.39E - 11
	mAb10935	128 ± 0.8	88	1.35E + 06	1.07E - 04	7.94E - 11
	mAb10936	117 ± 0.4	74	1.78E + 06	5.04E - 05	2.83E - 11
	mAb10937	106 ± 0.3	67	1.78E + 06	5.40E - 05	3.04E - 11
	mAb10938	128 ± 1.5	47	2.42E + 05	1.69E - 05	7.02E - 11
	mAb10939	127 ± 0.8	67	7.22E + 05	8.74E - 05	1.21E - 10
	mAb10940	102 ± 0.4	67	3.72E + 06	4.66E - 05	1.25E - 11
	mAb10941	125 ± 0.2	68	3.70E + 05	3.48E - 05	9.43E - 11
	mAb10954	108.8 ± 1	86	2.35E + 06	4.78E - 05	2.03E - 11
	mAb10955	109.8 ± 0.8	76	1.20E + 06	9.22E - 05	7.71E - 11
	mAb10956	104.1 ± 0.5	74	1.46E + 06	1.30E - 04	8.87E - 11
	mAb10957	104.7 ± 0.5	77	1.02E + 06	3.35E - 05	3.27E - 11
	mAb10964	93.3 ± 0.3	70	9.30E + 06	3.69E - 05	3.97E - 12
	mAb10965	94.2 ± 0.8	63	6.94E + 05	1.56E - 04	2.25E - 10
	mAb10966	100.2 ± 0.4	73	1.50E + 06	3.37E - 05	2.24E - 11
	mAb10967	93.3 ± 0.2	60	6.64E + 05	1.35E - 05	2.03E - 11
	mAb10969	111.4 ± 0.8	80	4.64E + 05	1.00E - 04	2.16E - 10
	mAb10970	113.4 ± 0.7	85	2.19E + 06	4.05E - 04	1.85E - 10
	mAb10971	99 ± 0.5	72	1.40E + 06	4.09E - 05	2.92E - 11
	mAb10977	109.1 ± 0.4	73	1.82E + 06	2.29E - 05	1.26E - 11
	mAb10982	94.8 ± 0.1	59	9.10E + 05	8.06E - 05	8.86E - 11
	mAb10984	121 ± 0.6	89	1.39E + 06	3.97E - 05	2.86E - 11
	mAb10985	112.7 ± 0.3	77	8.09E + 06	8.51E - 05	1.05E - 11
	mAb10986	94.2 ± 0.5	66	2.70E + 06	2.40E - 05	8.88E - 12
	mAb10987	98 ± 0.7	73	3.19E + 06	4.24E - 04	1.33E - 10
	mAb10988	101.6 ± 0.6	69	4.96E + 06	5.08E - 04	1.02E - 10
	mAb10989	112.1 ± 0.4	77	1.08E + 07	9.63E - 05	8.95E - 12
	mAb10996	104.2 ± 0.9	61	5.62E + 05	8.02E - 04	1.43E - 09
	mAb10998	94.8 ± 0.1	59	1.47E + 06	3.58E - 03	2.44E - 09
	mAb11000	112.7 ± 0.3	77	1.11E + 06	1.27E - 04	1.15E - 10
[0424]	mAb11002	121 ± 0.6	89	5.54E + 05	2.47E - 03	4.46E - 09
	mAb11004	94.2 ± 0.5	66	6.95E + 05	6.40E - 05	9.21E - 11
	mAb11006	98 ± 0.7	73	3.30E + 05	5.21E - 05	1.58E - 10
	mAb11008	101.6 ± 0.6	69	3.90E + 05	1.92E - 04	4.92E - 10
	mAb11010	112.1 ± 0.4	77	1.14E + 06	8.99E - 05	7.89E - 11
	mAb1932	97.8 ± 0.2	3	NB	NB	NB

[0425] 表32:SARS-COV-2RBD-mFc与抗SARS-COV-2-S单克隆抗体在37℃下结合的结合动力学参数

所捕获的 mAb (mAb#)	mAb 捕获水 平 (RU)	所结合的 30 nM Ag (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
mAb10913	147 ± 0.8	75	6.32E + 06	1.73E - 03	2.74E - 10	6.7
mAb10914	163 ± 1.2	70	6.91E + 05	2.20E - 04	3.18E - 10	52.5
mAb10915	141 ± 0.6	63	4.41E + 05	6.89E - 05	1.56E - 10	167.6
mAb10920	155 ± 1.1	83	6.31E + 06	7.53E - 04	1.19E - 10	15.3
mAb10921	135 ± 0.3	62	4.58E + 05	1.25E - 04	2.73E - 10	92.4
mAb10922	149.1 ± 1	97	4.60E + 06	1.60E - 04	3.49E - 11	72.2
mAb10923	144 ± 0.8	88	5.53E + 06	1.85E - 04	3.36E - 11	62.4
mAb10924	160 ± 1.1	98	1.17E + 06	1.31E - 04	1.12E - 10	88.2
mAb10930	142.9 ± 0.4	72	1.49E + 06	5.97E - 04	3.99E - 10	19.3
mAb10932	164 ± 1.5	89	4.48E + 05	6.86E - 05	1.53E - 10	168.4
mAb10933	152 ± 0.9	89	7.30E + 06	7.94E - 05	1.09E - 11	145.5
mAb10934	151 ± 0.7	87	1.36E + 07	2.93E - 04	2.16E - 11	39.4
mAb10935	171 ± 0.8	101	5.68E + 06	4.94E - 04	8.69E - 11	23.4
mAb10936	161 ± 1.0	94	3.81E + 06	6.75E - 05	1.77E - 11	171.1
mAb10937	141 ± 0.6	85	4.47E + 06	5.74E - 05	1.29E - 11	201.2
mAb10938	172 ± 1.2	76	3.78E + 05	6.56E - 05	1.73E - 10	176.1
mAb10939	169 ± 0.6	92	1.06E + 06	1.65E - 04	1.55E - 10	70.0
mAb10940	136 ± 0.6	85	5.54E + 06	5.04E - 05	9.10E - 12	229.2
mAb10941	164 ± 0.8	100	8.02E + 05	8.01E - 05	1.00E - 10	144.2
mAb10954	142.4 ± 0.8	105	3.02E + 06	1.12E - 04	3.69E - 11	103.1
mAb10955	146.8 ± 0.7	91	1.92E + 06	3.88E - 04	2.02E - 10	29.8
mAb10956	136.6 ± 0.4	91	2.17E + 06	3.42E - 04	1.58E - 10	33.8
mAb10957	137.7 ± 1.2	100	1.55E + 06	7.19E - 05	4.63E - 11	160.6
mAb10964	122.5 ± 0.3	84	1.05E + 07	1.26E - 04	1.20E - 11	91.7
mAb10965	125.7 ± 1	81	1.42E + 06	3.38E - 04	2.37E - 10	34.2
mAb10966	137.3 ± 1.1	92	2.45E + 06	9.93E - 05	4.05E - 11	116.3
mAb10967	123.3 ± 0.9	81	1.45E + 06	3.33E - 05	2.29E - 11	346.8
mAb10969	149.1 ± 1	97	8.11E + 05	1.41E - 04	1.74E - 10	81.9
mAb10970	149.9 ± 0.6	102	2.18E + 06	4.20E - 04	1.92E - 10	27.5
mAb10971	136.1 ± 0.8	90	2.37E + 06	9.41E - 05	3.97E - 11	122.7
mAb10977	145.8 ± 0.7	93	2.50E + 06	1.07E - 04	4.28E - 11	107.9
mAb10982	125.5 ± 0.8	74	1.23E + 06	2.58E - 04	2.10E - 10	44.8
mAb10984	158.4 ± 0.7	110	2.07E + 06	8.36E - 05	4.04E - 11	138.2
mAb10985	151.8 ± 0.7	87	9.36E + 06	3.75E - 04	4.01E - 11	30.8
mAb10986	125 ± 0.7	83	4.59E + 06	5.79E - 05	1.26E - 11	199.5
mAb10987	131.5 ± 0.7	87	5.04E + 06	3.90E - 04	7.75E - 11	29.6
mAb10988	138.6 ± 0.5	82	8.34E + 06	7.90E - 04	9.47E - 11	14.6
mAb10989	146.1 ± 0.6	92	1.38E + 07	3.65E - 04	2.65E - 11	31.6
mAb10996	142.9 ± 0.4	72	9.35E + 05	2.47E - 03	2.64E - 09	4.7
mAb10998	125.5 ± 0.8	74	8.79E + 05	1.97E - 02	2.24E - 08	0.6
mAb11000	151.8 ± 0.7	87	1.63E + 06	2.71E - 04	1.66E - 10	42.6
mAb11002	158.4 ± 0.7	110	5.06E + 05	1.65E - 02	3.26E - 08	0.7
mAb11004	125 ± 0.7	83	1.01E + 06	1.18E - 04	1.17E - 10	97.9
mAb11006	131.5 ± 0.7	87	3.88E + 05	7.65E - 05	1.97E - 10	151.0
mAb11008	138.6 ± 0.5	82	4.64E + 05	4.05E - 04	8.72E - 10	28.5
mAb11010	146.1 ± 0.6	92	1.59E + 06	8.02E - 05	5.05E - 11	144.0
mAb1932	128 ± 0.3	5	NB	NB	NB	NB

[0428] 实例14:如通过ELISA测定的,抗SARS-CoV-2抗体阻断RBD与hACE2的结合

[0429] 使用基于ELISA的阻断测定以测定抗SARS-CoV-2抗体阻断SARS-CoV-2纤突蛋白受体结合结构域(RBD)与其受体、人血管紧张素转化酶2(hACE2)结合的能力。

[0430] 这个测定中使用的SARS-CoV-2蛋白包含在c端处用人IgG1的Fc部分表达的SARS-CoV-2纤突蛋白(氨基酸Arg319-Phe541)的受体结合结构域(RBD)部分(SARS-CoV-2RBD-hFc)。实验中使用的人ACE2蛋白购自R&D系统公司并由具有c端10X组氨酸标签的氨基酸Gln18-Ser740组成(hACE2-His; NCBI登录号Q9BYF1)。

[0431] 使用以下程序进行实验。将单克隆抗五-His抗体(凯杰公司)在PBS中以1 $\mu$ g/ml在4°C下涂覆在96孔微量滴定板上过夜。将hACE2-His受体以0.2 $\mu$ g/ml添加到PBS中并在室温(RT)下结合两小时。随后使用0.5% (w/v)的含BSA的PBS的溶液阻断非特异性结合位点。在其它微量滴定板中,将恒定量的100pM的SARS-CoV-2RBD-hFc蛋白与抗SARS-CoV-2抗体和同种型IgG1抗体对照在PBS+0.5% BSA中以0.0008nM到50nM的稀释度结合。温育一小时后,将混合物溶液转移到微量滴定板涂覆的hACE2-His。在室温下温育1.5小时后,将孔洗涤,并用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗人IgG抗体(杰克森)检测板结合的SARS-CoV2。然后根据制造商的建议使用TMB底物溶液(BD生物科学公司,#555214)对板进行显影,并在Victor X5读板仪上测量450nm处的吸光度。

[0432] 使用Prism<sup>TM</sup>软件(GraphPad)内的S形剂量应答模型分析结合数据。计算出的IC50值被定义为阻断50%的SARS-CoV-2RBD-hFc与板涂覆的hACE2-His结合所需的抗体浓度,将其用作阻断效力的指标。阻断百分比是基于使用这个公式测试的最高抗体浓度下观察到的背景校正结合信号定义的,并且针对所有测试的抗体进行了报告:

$$[0433] \text{阻断\%} = 100 - \left( \frac{[\text{实验信号}_{(\text{最高 Ab 浓度})} - \text{背景信号}_{(\text{缓冲液})}]}{[\text{最大信号}_{(\text{单独的 hEGF.mFc})} - \text{背景信号}_{(\text{缓冲液})}]} \right) \times 100$$

[0434] 在最高测试浓度下阻断小于或等于50%的结合的抗体被分类为非阻断剂,并且未报告那些抗体的IC50值。

[0435] 使用阻断ELISA评估抗SARS-CoV-2抗体阻断SARS-CoV-2RBD与人ACE2结合的能力。在这个测定中,用各种浓度的抗SARS-CoV-2-S抗体滴定100pM SARS-CoV-2RBD-hFc,并且评估了抗体的存在对RBD与hACE2-His结合的抑制。用HRP缀合的抗-hFc抗体检测板结合的RBD-hFc。

[0436] 抗SARS-CoV-2-S抗体在最高测试浓度下的阻断IC50和最大阻断汇总于表33中,并且阻断曲线在图1-8中示出。在所测试的46种抗体中,44种抗体显示出对RBD-hFc与hACE2结合的抗体浓度依赖性阻断。在最高测试抗体浓度下,IC50值的范围为41pM到4.5nM,并且最大阻断范围为55%到约100%。在所测试的46种抗体中,两种抗体在测定条件下未示出阻断活性。如所期望的,无关的同种型对照抗体未示出阻断活性。

[0437] 表33:抗SAR-CoV-2抗体对纤突RBD-hFc与固定的人ACE-2结合的阻断效力

[0438]

<b>mAb</b>	<b>测定运行#</b>	<b>阻断 100 pM (RBD).hFc 与 ACE2 IC<sub>50</sub>, M</b>	<b>阻断 100 pM (RBD).hFc 与 ACE2 阻断%</b>
mAb10913	1	2.17E - 10	80
mAb10914	1	9.80E - 10	93
mAb10915	1	3.21E - 10	99
mAb10920	1	3.38E - 10	95
mAb10920	3	1.39E - 10	87
mAb10921	1	4.33E - 10	99
mAb10921	3	5.07E - 10	94
mAb10922	2	6.65E - 11	97
mAb10923	1	1.49E - 10	94
mAb10923	3	1.84E - 10	85
mAb10924	1	1.63E - 10	98
mAb10924	2	1.27E - 10	98
mAb10930	2	2.82E - 10	86
mAb10932	1	3.73E - 10	99
mAb10933	1	7.07E - 11	99
mAb10933	3	6.53E - 11	95
mAb10933	2	5.22E - 11	101
mAb10934	1	6.60E - 11	96
mAb10934	3	5.97E - 11	98
mAb10934	2	4.80E - 11	96
mAb10935	1	1.02E - 10	99
mAb10935	2	6.94E - 11	98

[0439]	mAb10936	1	8.75E - 11	95
	mAb10936	2	7.10E - 11	97
	mAb10937	1	6.49E - 11	99
	mAb10938	1	2.75E - 10	99
	mAb10939	1	1.75E - 10	97
	mAb10939	3	2.63E - 10	93
	mAb10940	1	6.52E - 11	92
	mAb10941	1	2.27E - 10	100
	mAb10941	2	2.06E - 10	100
	mAb10954	2	7.11E - 11	95
	mAb10955	2	1.41E - 10	97
	mAb10956	2	1.85E - 10	99
	mAb10957	2	1.69E - 10	99
	mAb10964	3	6.83E - 11	93
	mAb10964	2	6.25E - 11	95
	mAb10965	2	2.13E - 10	97
	mAb10966	2	1.60E - 10	99
	mAb10967	2	2.80E - 10	98
	mAb10969	3	2.15E - 10	95
	mAb10970	2	1.07E - 10	97
	mAb10971	2	1.49E - 10	98
	mAb10977	3	8.71E - 11	77
	mAb10977	2	7.11E - 11	65
	mAb10982	2	1.16E - 10	93
	mAb10984	2	7.75E - 11	90
	mAb10985	3	6.96E - 11	97
	mAb10985	2	4.11E - 11	99
	mAb10986	2	7.54E - 11	98
	mAb10987	3	2.85E - 10	93
	mAb10987	2	1.81E - 10	95
	mAb10988	2	8.64E - 11	95
	mAb10989	3	5.91E - 11	96
	mAb10989	2	4.28E - 11	98
	mAb10996	3	6.10E - 09	71
	mAb10998	3	4.30E - 09	55
	mAb11000	3	4.50E - 09	75
	mAb11002	3	NBD	7
	mAb11004	3	NBD	9
	mAb11006	3	2.20E - 10	85
	mAb11008	3	1.49E - 09	93
	mAb11010	3	1.47E - 10	83
	mAb193250 IgG1 对照	1	--	-8
	mAb193250 IgG1 对照	3	--	-19
	mAb193250 IgG1 对照	2	--	-15

[0440] 注意:将100pM的RBD-hFc用抗SARS-COV-2-S抗体以从50nM开始的系列稀释度滴

定,并将RBD-hFc结合在具有10x组氨酸标签的固定的hACE2上,并用HRP缀合的抗hFc抗体进行检测。NBD;未检测到阻断。

[0441] 实例15:mAb10987、mAb10989、mAb10933和mAb10934之间的交叉竞争

[0442] 在交叉竞争结合测定中检查了mAb10987、mAb10989、mAb10933和mAb10934(图11),从而鉴定出几对具有皮摩尔中和效力的非竞争性mAb,其可能潜在地组合以形成抗体混合物,例如mAb10987和mAb0933。

[0443] 抗SARS-CoV-2-S mAb的表位分箱使用具有10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) 吐温-20、pH 7.4、1mg/mL BSA的运行缓冲液的富迪(ForteBio)Octet HTX生物层干涉仪(富迪生物分子装置公司(Molecular Devices ForteBio LLC),加利福尼亚州菲蒙)以预混合夹心形式进行,所述预混合夹心形式涉及mAb以成对组合方式相互竞争与SARS-CoV-2RBD-MMH蛋白结合。在30°C下以1000rpm连续搅拌进行测定。在运行缓冲液中获得初始基线后,将20μg/mL的抗COVID19 mAb捕获到抗人Fc(AHC)生物传感器尖端上持续300秒。为了阻断AHC生物传感器尖端上剩余的游离不饱和结合位点,将所有传感器暴露于含有100μg/mL无关IgG1的阻断溶液持续240秒。这个过程之后,将生物传感器浸入含有100nM SARS-CoV-2RBD-MMH蛋白和600nM的第二mAb的抗COVID19 mAb结合位点的预混合溶液的孔中持续300秒。记录每个步骤处的结合应答,并通过将自阻断mAb竞争性对照从数据集中减去来使特定信号归一化。用使用表位分箱的Octet数据分析HT 10.0软件进行数据分析。

[0444] 将交叉竞争结合测定与上文所描述的HDX-MS结果进行比较深入了解了非竞争性抗体对可以同时结合RBD并且可以因此成为治疗性抗体混合物的理想配体的机制。mAb10987和mAb10933表示此类抗体对。mAb10933靶向ACE2界面的一个边缘上的纤突状环区。在所述区内,显示出最显著受mAb10933 HDX保护的残基面朝上,这表明mAb10933的Fab区从顶部方向与RBD结合,其中mAb10933将与ACE2发生显著碰撞。为了避免与mAb10933竞争,mAb10987仅从正面或左下侧(在图12中的mAb10987的前视图中)与HDX定义的受保护区结合。这与上文所描述的中和数据一致,因为mAb10987会将其定向成处于极有可能干扰ACE2的位置。

[0445] 实例16:抗体结合的纤突蛋白的结构测定

[0446] 为了更好地了解mAb10933和mAb10987与纤突蛋白RBD的结合,通过低温电子显微镜(cryoEM)进行了结构分析。使用FabALACTICA试剂盒(Genovis)分离mAb10933和mAb10987的Fab片段。将600μg的mAb10933 Fab和600μg的mAb10987 Fab与300μg的SARS-CoV-2-S RBD混合并在冰上温育~1小时,然后注射到平衡到50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl的Superdex 200增加凝胶过滤柱中。收集含有mAb10933 Fab-mAb10987 Fab-RBD复合物的峰级分,并将其使用10kDa MWCO离心过滤器浓缩。对于cryoEM网格制备,将蛋白质样品稀释到1.5mg/mL,并添加0.15% PMAL-C8 amphipol。将3.5μL的蛋白质沉积到刚用等离子体清洁的UltrAufoil网格(1.2/1.3,300目)上。使用滤纸将多余溶液吸干,并使用Vitrobot Mark IV将其速冻成液态乙烷。将cryoEM网格转移到配备有K3检测器(加坦公司(Gatan))的Titan Krios(赛默飞世尔公司)。使用EPU(赛默飞世尔公司)以对应于0.85Å的像素大小的105,000倍的放大率收集影片。使用每秒每像素15个电子的剂量速率,并且每个影片为2秒,对应于每Å2~40个电子的总剂量。

[0447] 所有cryoEM数据处理均使用cryoSPARC v2.14.2进行。使用补丁运动校正和补丁

CTF估计将2,821个影片对齐。基于估计的散焦值和CTF拟合分辨率,选择2,197张对齐的显微照片进行进一步处理。使用斑点拾取器拾取的一组初始颗粒经过2D分类以生成用于模板拾取的模板。通过模板拾取而拾取的989,553个颗粒经过多轮2D分类以去除未结合的fab和含有不完整复合物的颗粒。从头进行三类重建产生含有对应于mAb10933 Fab-mAb10987Fab-RBD复合物的61,707个颗粒的单个类别。这个类别中的颗粒的异质性细化、然后非均匀细化导致含有用于模型构建的含有48,140个颗粒的3.9Å分辨率(FSC=0.143)图。将RBD(获取自PDB代码6M17)和两个Fab(获取自先前的抗体结构,除来自PDB代码5U15的mAb10987的λ轻链之外)的模型手动放置到这个图中。然后使用Coot手动重建这些模型,并使用Phenix根据图对实际空间进行细化。

**[0448]** 确认上文所描述的数据后,SARS-CoV-2纤突RBD与mAb10933和mAb10987的Fab片段结合的复合物的单颗粒cryoEM示出了这个混合物中的两种抗体可以与RBD的不同区同时结合(图13A、图13B和图14)。复合物的标称分辨率为3.9Å的3D重构图示出了两个Fab片段在RBD的不同表位处结合,从而证实其是非竞争性抗体。mAb10933在RBD的顶部结合,从而与ACE2的结合位点广泛重叠。另一方面,mAb10987的表位位于RBD的一侧,充分远离mAb10933表位,并且与ACE2结合位点几乎没有重叠。

**[0449]** 实例17:抗SARS-CoV-2-S mAb之间的交叉竞争

**[0450]** 在Octet HTX生物传感器平台(颇尔富迪生物公司)上使用实时、无标记生物层干涉(BLI)测定来测定抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体(mAb)之间的结合竞争。实验是在板以1000rpm的速度摇动的情况下在25℃下在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05% v/v表面活性剂吐温-20、1mg/mL BSA、pH为7.4的(HBS-EBT)缓冲液中进行的。为了评估两种mAb是否能够彼此竞争与用C端myc-myc-六组氨酸表达的SARS-CoV-2-S RBD细胞外结构域(SARS-CoV-2RBD-MMH)上的其相应的表位结合,首先通过将生物传感器尖端浸没在含有10μg/mL SARS-CoV-2-S RBD-MMH溶液的孔中1分钟将约~0.51nm的SARS-CoV-2-S RBD-MMH捕获到抗Penta-His抗体涂覆的Octet生物传感器尖端(富迪生物公司,#18-5122)上。然后通过浸入含有50μg/mL mAb-1溶液的孔中5分钟用第一种抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体(随后称为mAb-1)使SARS-CoV-2-S RBD-MMH捕获的生物传感器尖端饱和。然后将生物传感器尖端浸入含有50μg/mL第二种抗SARS-CoV-2单克隆抗体(随后称为mAb-2)溶液的孔中5分钟。在实验的每一步之间将生物传感器的尖端在HBS-ETB缓冲液中清洗。在整个实验过程中对实时结合反应进行监测,并记录每个步骤结束时的结合反应。比较了mAb-2与预先与mAb-1复合的SARS-CoV-2RBD-MMH的结合的应答,并测定了不同抗SARS-CoV-2单克隆抗体的竞争/非竞争行为,如表34中所示出的。

**[0451]** 表34:抗SARS-CoV-2-S抗体之间的交叉竞争

[0452]

mAb-1	与 mAb-1 竞争的 mAb-2
	<b>mAb10924</b>
	<b>mAb10989</b>
	<b>mAb10920</b>
	<b>mAb10913</b>
	<b>mAb10923</b>
	<b>mAb10930</b>
	<b>mAb10969</b>
	<b>mAb10988</b>
	<b>mAb10964</b>
	<b>mAb10996</b>
	<b>mAb10966</b>
	<b>mAb10998</b>
	<b>mAb10984</b>
	<b>mAb11006</b>
	<b>mAb10921</b>
	<b>mAb10971</b>
	<b>mAb10938</b>
	<b>mAb10932</b>
	<b>mAb10970</b>
	<b>mAb10957</b>
	<b>mAb10956</b>
	<b>mAb10941</b>

[0453]

mAb10924

mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb11002
mAb10933
mAb10940
mAb10922
mAb11004
mAb10937
mAb10936
mAb10934
mAb10977
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954

[0454]

mAb10989	mAb10933
	mAb11000
	mAb10985
	mAb10937
	mAb10936
	mAb10934
	mAb10977
	mAb10924
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb10933
	mAb10987
	mAb10940
	mAb10922
	mAb11004
	mAb10937
	mAb10936

[0455]

mAb10920	mAb10934
	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10933
	mAb10987
	mAb10940
	mAb10922
	mAb11004
	mAb10937
	mAb10936
	mAb10934
mAb10913	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989

[0456]

	<b>mAb10920</b>
	<b>mAb10923</b>
	<b>mAb10930</b>
	<b>mAb10969</b>
	<b>mAb10988</b>
	<b>mAb10964</b>
	<b>mAb10996</b>
	<b>mAb10966</b>
	<b>mAb10998</b>
	<b>mAb10984</b>
	<b>mAb11006</b>
	<b>mAb10921</b>
	<b>mAb10971</b>
	<b>mAb10938</b>
	<b>mAb10932</b>
	<b>mAb10970</b>
	<b>mAb10957</b>
	<b>mAb10956</b>
	<b>mAb10941</b>
	<b>mAb10939</b>
	<b>mAb10935</b>
	<b>mAb10914</b>
	<b>mAb10982</b>
	<b>mAb11008</b>
	<b>mAb10915</b>
	<b>mAb10965</b>
	<b>mAb10967</b>
	<b>mAb10986</b>
	<b>mAb10955</b>
	<b>mAb10954</b>
	<b>mAb11002</b>
	<b>mAb10933</b>
	<b>mAb11004</b>
	<b>mAb10937</b>
	<b>mAb10936</b>
	<b>mAb10934</b>
<b>mAb10923</b>	<b>mAb10977</b>
	<b>mAb10924</b>
	<b>mAb10989</b>
	<b>mAb10920</b>
	<b>mAb10913</b>
	<b>mAb10930</b>
	<b>mAb10969</b>
	<b>mAb10988</b>
	<b>mAb10964</b>
	<b>mAb10996</b>

[0457]

mAb10930

mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10933
mAb11004
mAb10937
mAb10936
mAb10934
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938

[0458]

mAb10969

mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10933
mAb10937
mAb10936
mAb10934
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10988
mAb10964
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982

[0459]

mAb10988

mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10933
mAb10985
mAb10937
mAb10936
mAb10934
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954

[0460]

<b>mAb10964</b>	<b>mAb10933</b>
	<b>mAb10936</b>
	<b>mAb10934</b>
	<b>mAb10977</b>
	<b>mAb10924</b>
	<b>mAb10989</b>
	<b>mAb10920</b>
	<b>mAb10913</b>
	<b>mAb10923</b>
	<b>mAb10930</b>
	<b>mAb10969</b>
	<b>mAb10988</b>
	<b>mAb10996</b>
	<b>mAb10966</b>
	<b>mAb10998</b>
	<b>mAb10984</b>
	<b>mAb11006</b>
	<b>mAb10921</b>
	<b>mAb10971</b>
	<b>mAb10938</b>
	<b>mAb10932</b>
	<b>mAb10970</b>
	<b>mAb10957</b>
	<b>mAb10956</b>
	<b>mAb10941</b>
	<b>mAb10939</b>
	<b>mAb10935</b>
	<b>mAb10914</b>
	<b>mAb10982</b>
	<b>mAb11008</b>
	<b>mAb10915</b>
	<b>mAb10965</b>
	<b>mAb10967</b>
	<b>mAb10986</b>
	<b>mAb10955</b>
	<b>mAb10954</b>
	<b>mAb11002</b>
	<b>mAb10933</b>
	<b>mAb10936</b>
	<b>mAb10934</b>
<b>mAb10996</b>	<b>mAb10977</b>
	<b>mAb10924</b>
	<b>mAb10989</b>
	<b>mAb10920</b>
	<b>mAb10913</b>
	<b>mAb10923</b>

[0461]

mAb10966	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10933
	mAb10985
	mAb10934
	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921

[0462]

mAb10998

mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10933
mAb10985
mAb10934
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935

[0463]

mAb10984

mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10985
mAb10936
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002

[0464]

mAb11006	mAb10985
	mAb10977
	<b>mAb10924</b>
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	<b>mAb10956</b>
	mAb10941
	<b>mAb10939</b>
	mAb10935
	mAb10914
	<b>mAb10982</b>
	<b>mAb11008</b>
	<b>mAb10915</b>
	<b>mAb10965</b>
	<b>mAb10967</b>
	<b>mAb10986</b>
	<b>mAb10955</b>
	<b>mAb10954</b>
	<b>mAb11002</b>
	<b>mAb10933</b>
	<b>mAb10985</b>
mAb10921	<b>mAb10977</b>
	<b>mAb10924</b>
	<b>mAb10989</b>
	<b>mAb10920</b>
	<b>mAb10913</b>
	<b>mAb10923</b>
	<b>mAb10930</b>
	<b>mAb10969</b>
	<b>mAb10988</b>

[0465]

mAb10971

mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10985
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957

[0466]

mAb10938

mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10985
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986

mAb10932 [0467]	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10985
	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10985
mAb10970	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930

[0468]

mAb10957

mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10985
mAb10936
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971

[0469]

**mAb10956**

<b>mAb10938</b>
<b>mAb10932</b>
<b>mAb10970</b>
<b>mAb10956</b>
<b>mAb10941</b>
<b>mAb10939</b>
<b>mAb10935</b>
<b>mAb10914</b>
<b>mAb10982</b>
<b>mAb11008</b>
<b>mAb10915</b>
<b>mAb10965</b>
<b>mAb10967</b>
<b>mAb10986</b>
<b>mAb10955</b>
<b>mAb10954</b>
<b>mAb11002</b>
<b>mAb10985</b>
<b>mAb10977</b>
<b>mAb10924</b>
<b>mAb10989</b>
<b>mAb10920</b>
<b>mAb10913</b>
<b>mAb10923</b>
<b>mAb10930</b>
<b>mAb10969</b>
<b>mAb10988</b>
<b>mAb10964</b>
<b>mAb10996</b>
<b>mAb10966</b>
<b>mAb10998</b>
<b>mAb10984</b>
<b>mAb11006</b>
<b>mAb10921</b>
<b>mAb10971</b>
<b>mAb10938</b>
<b>mAb10932</b>
<b>mAb10970</b>
<b>mAb10957</b>
<b>mAb10941</b>
<b>mAb10939</b>
<b>mAb10935</b>
<b>mAb10914</b>
<b>mAb10982</b>
<b>mAb11008</b>
<b>mAb10915</b>

[0470]

mAb10941	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10985
	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10985
mAb10939	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920

[0471]

[0471]	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
mAb10935	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921

[0472]

mAb10914

mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10985
mAb10977
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10982
mAb11008

[0473]

	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10933
	mAb10985
	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10985
mAb11008	mAb10977
	mAb10924

[0474]

mAb10915	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10933
	mAb10985
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998

[0475]

mAb10965

mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10955
mAb10954
mAb11002
mAb10985
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935

[0476]

mAb10967

	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10985
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10985
mAb10986	mAb10924
	mAb10989

[0477]

mAb10955	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10939
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002
	mAb10985
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006

[0478]

mAb10954

mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982
mAb11008
mAb10915
mAb10965
mAb10967
mAb10986
mAb10954
mAb11002
mAb10985
mAb10924
mAb10989
mAb10920
mAb10913
mAb10923
mAb10930
mAb10969
mAb10988
mAb10964
mAb10996
mAb10966
mAb10998
mAb10984
mAb11006
mAb10921
mAb10971
mAb10938
mAb10932
mAb10970
mAb10957
mAb10956
mAb10941
mAb10939
mAb10935
mAb10914
mAb10982

[0479]

	<b>mAb11008</b>
	<b>mAb10915</b>
	<b>mAb10965</b>
	<b>mAb10967</b>
	<b>mAb10986</b>
	<b>mAb10955</b>
	<b>mAb11002</b>
	<b>mAb10985</b>
<b>mAb11002</b>	<b>mAb10977</b>
	<b>mAb10920</b>
	<b>mAb10913</b>
	<b>mAb10923</b>
	<b>mAb10930</b>
	<b>mAb10969</b>
	<b>mAb10964</b>
	<b>mAb10996</b>
	<b>mAb10966</b>
	<b>mAb10998</b>
	<b>mAb10984</b>
	<b>mAb11006</b>
	<b>mAb10921</b>
	<b>mAb10971</b>
	<b>mAb10938</b>
	<b>mAb10932</b>
	<b>mAb10970</b>
	<b>mAb10957</b>
	<b>mAb10956</b>
	<b>mAb10941</b>
	<b>mAb10939</b>
	<b>mAb10935</b>
	<b>mAb10914</b>
	<b>mAb10982</b>
	<b>mAb11008</b>
	<b>mAb10915</b>
	<b>mAb10965</b>
	<b>mAb10967</b>
	<b>mAb10986</b>
	<b>mAb10955</b>
	<b>mAb10954</b>
	<b>mAb10933</b>
	<b>mAb10985</b>
	<b>mAb10936</b>
<b>mAb10933</b>	<b>mAb10977</b>
	<b>mAb10924</b>
	<b>mAb10989</b>
	<b>mAb10920</b>

[0480]

	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb11006
	mAb10914
	mAb11008
	mAb11002
	mAb11000
	mAb10937
	mAb10936
	mAb10934
mAb11000	mAb10924
	mAb10933
	mAb10985
	mAb11010
mAb10985	mAb10924
	mAb10969
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10998
	mAb10984
	mAb11006
	mAb10921
	mAb10971
	mAb10938
	mAb10932
	mAb10970
	mAb10957
	mAb10956
	mAb10941
	mAb10935
	mAb10914
	mAb10982
	mAb11008
	mAb10915
	mAb10965
	mAb10967
	mAb10986
	mAb10955
	mAb10954
	mAb11002

[0481]

	mAb11000
	mAb11010
mAb11010	mAb11000
	mAb10985
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10940
	mAb10922
	mAb11004
	mAb10937
	mAb10936
	mAb10934
	mAb10977
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10987
mAb10940	mAb10922
	mAb11004
	mAb10937
	mAb10936
	mAb10934
	mAb10977
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10987
mAb10922	mAb10940
	mAb11004
	mAb10937
	mAb10936
	mAb10934
	mAb10977
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10987
	mAb10940
	mAb10922
	mAb10937
	mAb10936
	mAb10934
	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913

[0482]

	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10933
	mAb10987
	mAb10940
	mAb10922
	mAb11004
	mAb10936
	mAb10934
mAb10936	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10998
	mAb10970
	mAb11002
	mAb10933
	mAb10987
	mAb10940
	mAb10922
	mAb11004
	mAb10937
	mAb10934
mAb10934	mAb10977
	mAb10924
	mAb10989
	mAb10920
	mAb10913
	mAb10923
	mAb10930
	mAb10969
	mAb10988
	mAb10964
	mAb10996
	mAb10966
	mAb10933
	mAb10987
	mAb10940
	mAb10922

[0483]

<b>mAb11004</b>
<b>mAb10937</b>
<b>mAb10936</b>

[0484] 实例18:在37℃下测量的抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体与单体SARS-CoV-2-S RBD试剂结合的pH敏感性

[0485] 使用基于实时表面等离振子共振(SPR)的Biacore T200生物传感器测定pH 7.4、pH 6.0和pH 5.0的缓冲液中的不同的抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体的解离速率常数( $k_d$ )。所有结合研究均在37℃下使用三种运行缓冲液进行,(i) PBS、0.05% v/v表面活性剂吐温-20、pH 7.4 (PBS-T-pH 7.4), (ii) PBS、0.05% v/v表面活性剂吐温-20、pH 6.0 (PBS-T-pH 6.0) 和 (iii) PBS、0.05% v/v表面活性剂吐温-20、pH 5.0 (PBS-T-pH 5.0)。首先将Biacore CM5传感器芯片表面通过与小鼠抗人Fc特异性mAb(再生元公司)进行胺偶联来衍生化以捕获抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体。对用C端myc-myc-六组氨酸表达的人SARS-CoV-2-S RBD细胞外结构域(SARS-CoV-2RBD-MMH)进行结合研究。将在PBS-T-pH 7.4缓冲液中制备的单一浓度的SARS-CoV-2-S RBD-MMH(90nM)以25微升/分钟的流动速率注射3分钟,然后将结合的SARS-CoV-2-S RBD-MMH在PBS-T-pH 7.4、PBS-T-pH 6.0或PBS-T PBS-T-pH 5.0运行缓冲液中解离5分钟。

[0486] 四种pH运行缓冲液中的解离速率常数( $k_d$ )通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时结合传感图拟合到1:1结合模型来确定。根据 $k_d$ 值计算出解离半衰期( $t_{1/2}$ )为:

$$t_{1/2} \text{ (分钟)} = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0488] 表35中示出了在PBS-T-pH 7.4中与不同的抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体结合、然后在37℃下在PBS-T-pH 7.4和PBS-T-pH 6.0中解离的SARS-CoV-2-S RBD-MMH的 $k_d$ 值和 $t_{1/2}$ 值。表36中示出了在PBS-T-pH 7.4中与不同的抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体结合、然后在37℃下在PBS-T-pH 7.4和PBS-T-pH 5.0中解离的SARS-CoV-2-S RBD-MMH的 $k_d$ 值和 $t_{1/2}$ 值。对pH 7.4、pH 6.0和pH 5.0的缓冲液的SARS-CoV-2RBD-MMH的解离半衰期( $t_{1/2}$ )的比较。

[0489] 表35:SARS-CoV-2-S RBD-MMH与抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体在PBS-T-pH 7.4缓冲液中的结合和在37℃在PBS-T-pH 7.4和pH 6.0缓冲液中的解离。

所捕获的 mAb	运行缓冲液: PBS-T, pH 7.4 在 37°C 下				运行缓冲液: PBS-T, 在 pH 6.0 中跟踪 在 37°C 下				t½比 率	
	mAb 捕获 水平 (RU)	所结合的 90 nM RBD.mmh (RU)	kd (1/s)	t½ (分 钟)	mAb 捕 获水平 (RU)	所结合的 90 nM RBD.mmh (RU)	kd (1/s)	t½ (分 钟)		
[0490]	mAb10913	427	69	4.30E - 02	0.3	421	67	4.38E - 02	0.3	1
	mAb10914	388	69	9.41E - 03	1.2	386	62	1.16E - 02	1	1.2
	mAb10915	319	84	7.43E - 04	15.5	312	88	1.51E - 03	7.7	2
	mAb10932	432	133	6.60E - 04	17.5	438	131	1.28E - 03	9	1.9
	mAb10933	360	124	7.85E - 03	1.5	353	119	8.53E - 03	1.4	1.1
	mAb10934	341	107	1.74E - 02	0.7	334	108	2.11E - 02	0.5	1.2
	mAb10935	407	76	2.78E - 02	0.4	404	72	1.71E - 02	0.7	0.6
	mAb10936	381	124	5.29E - 03	2.2	375	120	8.69E - 03	1.3	1.6
	mAb10937	330	94	2.09E - 02	0.6	323	98	2.09E - 02	0.6	1
	mAb10924	385	111	5.69E - 03	2	379	110	1.20E - 02	1	2.1
	mAb10938	407	95	1.05E - 03	11	407	90	2.99E - 03	3.9	2.8
	mAb10940	343	119	1.08E - 02	1.1	339	127	1.04E - 02	1.1	1
	mAb10941	398	129	1.65E - 03	7	396	127	2.04E - 03	5.7	1.2
	mAb10920	383	79	2.47E - 02	0.5	380	73	5.39E - 02	0.2	2.2
	mAb10921	345	89	1.79E - 03	6.5	339	92	2.01E - 02	0.6	11.3
	mAb10923	355	87	2.35E - 02	0.5	349	88	2.43E - 02	0.5	1
	mAb10939	410	90	9.48E - 03	1.2	412	83	1.18E - 02	1	1.2
	mAb10922	251	85	9.07E - 03	1.3	240	92	9.61E - 03	1.2	1.1
	mAb10930	377	50	1.92E - 02	0.6	372	46	1.67E - 02	0.7	0.9
	mAb10982	389	79	9.90E - 03	1.2	387	74	7.72E - 03	1.5	0.8
	mAb10984	378	133	1.71E - 03	6.8	370	135	1.94E - 03	5.9	1.1
	mAb10985	457	172	3.63E - 03	3.2	464	172	3.19E - 03	3.6	0.9
	mAb10986	413	155	6.29E - 04	18.4	411	152	1.24E - 03	9.3	2
	mAb10987	379	105	2.37E - 02	0.5	372	109	1.83E - 02	0.6	0.8
	mAb10988	467	109	4.35E - 02	0.3	469	103	5.37E - 02	0.2	1.2
	mAb10989	382	126	9.32E - 03	1.2	375	119	7.36E - 03	1.6	0.8
	mAb10970	340	93	7.65E - 03	1.5	334	96	6.37E - 03	1.8	0.8
	mAb10971	350	125	9.44E - 04	12.2	342	125	1.27E - 03	9.1	1.3
	mAb10964	380	140	1.94E - 03	6	379	137	2.51E - 03	4.6	1.3
	mAb10965	290	65	8.66E - 03	1.3	281	70	9.47E - 03	1.2	1.1
	mAb10966	417	152	1.60E - 03	7.2	409	149	1.41E - 03	8.2	0.9
	mAb10967	372	118	2.98E - 04	38.8	367	115	3.45E - 04	33.5	1.2
	mAb10954	336	118	1.74E - 03	6.6	331	124	2.70E - 03	4.3	1.6
	mAb10955	404	100	1.22E - 02	0.9	403	97	1.46E - 02	0.8	1.2
	mAb10956	452	114	1.25E - 02	0.9	446	106	1.50E - 02	0.8	1.2
	mAb10957	388	136	5.80E - 04	19.9	382	140	7.67E - 04	15.1	1.3
	mAb10977	293	44	1.59E - 02	0.7	285	44	3.39E - 02	0.3	2.1
	mAb10969	340	72	1.86E - 02	0.6	336	71	1.01E - 02	1.1	0.5
	mAb10996	408	35	4.69E - 02	0.2	405	37	4.37E - 02	0.3	0.9
	mAb10998	308	20	2.86E - 02	0.4	307	19	2.84E - 02	0.4	1
[0491]	mAb11002	373	10	2.60E - 02	0.4	368	4	5.91E - 03	2	0.2
	mAb11000	404	88	1.48E - 03	7.8	403	90	2.85E - 03	4.1	1.9
	mAb11004	356	97	1.47E - 02	0.8	353	96	2.09E - 02	0.6	1.4
	mAb11006	398	105	1.46E - 03	7.9	398	98	1.98E - 03	5.8	1.4
	mAb11008	341	112	1.33E - 03	8.7	338	118	1.28E - 03	9	1
	mAb11010	432	157	3.90E - 03	3	431	156	7.51E - 03	1.5	1.9
	同种型对照	430	4	NB	NB	427	9	NB	NB	NB

[0492] 表36:SARS-CoV-2-S RBD-MMH与抗SARS-CoV-2单克隆抗体在PBS-T-pH 7.4缓冲液中的结合和在37°C在PBS-T-pH 7.4和pH 5.0缓冲液中的解离。

所捕获的 mAb	运行缓冲液: PBS-T, pH 7.4 在 37°C 下				运行缓冲液: PBS-T, 在 pH 5.0 中跟踪 在 37°C 下				t½比 率
	mAb 捕 获水平 (RU)	所结合的 90 nM RBD.mmh (RU)	kd (1/s)	t½ (分 钟)	mAb 捕 获水平 (RU)	所结合的 90 nM RBD.mmh (RU)	kd (1/s)	t½ (分 钟)	pH 7.4/ pH5.0
mAb10913	427	69	4.30E - 02	0.3	430	65	3.53E - 02	0.3	0.8
mAb10914	388	69	9.41E - 03	1.2	391	57	1.00E - 02	1.2	1.1
mAb10915	319	84	7.43E - 04	15.5	316	94	2.05E - 03	5.6	2.8
mAb10932	432	133	6.60E - 04	17.5	452	131	2.11E - 03	5.5	3.2
mAb10933	360	124	7.85E - 03	1.5	353	114	1.14E - 02	1	1.5
mAb10934	341	107	1.74E - 02	0.7	338	109	1.71E - 02	0.7	1
mAb10935	407	76	2.78E - 02	0.4	413	70	1.28E - 02	0.9	0.5
mAb10936	381	124	5.29E - 03	2.2	379	116	1.60E - 02	0.7	3
mAb10937	330	94	2.09E - 02	0.6	326	104	1.55E - 02	0.7	0.7
mAb10924	385	111	5.69E - 03	2	390	113	1.48E - 02	0.8	2.6
mAb10938	407	95	1.05E - 03	11	417	82	7.61E - 03	1.5	7.2
mAb10940	343	119	1.08E - 02	1.1	341	135	8.23E - 03	1.4	0.8
mAb10941	398	129	1.65E - 03	7	407	128	2.21E - 03	5.2	1.3
mAb10920	383	79	2.47E - 02	0.5	382	68	2.93E - 02	0.4	1.2
mAb10921	345	89	1.79E - 03	6.5	345	100	5.46E - 02	0.2	30.6
mAb10923	355	87	2.35E - 02	0.5	357	90	2.13E - 02	0.5	0.9
mAb10939	410	90	9.48E - 03	1.2	419	78	1.14E - 02	1	1.2
mAb10922	251	85	9.07E - 03	1.3	240	102	8.08E - 03	1.4	0.9
mAb10930	377	50	1.92E - 02	0.6	383	44	1.20E - 02	1	0.6
mAb10982	389	79	9.90E - 03	1.2	391	66	6.27E - 03	1.8	0.6
mAb10984	378	133	1.71E - 03	6.8	378	140	2.33E - 03	5	1.4
mAb10985	457	172	3.63E - 03	3.2	471	170	3.36E - 03	3.4	0.9
mAb10986	413	155	6.29E - 04	18.4	417	148	3.18E - 03	3.6	5.1
mAb10987	379	105	2.37E - 02	0.5	377	115	8.80E - 03	1.3	0.4
mAb10988	467	109	4.35E - 02	0.3	492	103	6.98E - 02	0.2	1.6
mAb10989	382	126	9.32E - 03	1.2	379	105	6.13E - 03	1.9	0.7
mAb10970	340	93	7.65E - 03	1.5	341	102	6.02E - 03	1.9	0.8
mAb10971	350	125	9.44E - 04	12.2	352	129	1.70E - 03	6.8	1.8
mAb10964	380	140	1.94E - 03	6	379	132	3.02E - 03	3.8	1.6
mAb10965	290	65	8.66E - 03	1.3	284	77	7.40E - 03	1.6	0.9
mAb10966	417	152	1.60E - 03	7.2	422	151	1.25E - 03	9.2	0.8
mAb10967	372	118	2.98E - 04	38.8	377	114	4.05E - 04	28.5	1.4
mAb10954	336	118	1.74E - 03	6.6	335	132	5.33E - 03	2.2	3.1
mAb10955	404	100	1.22E - 02	0.9	416	96	1.85E - 02	0.6	1.5
mAb10956	452	114	1.25E - 02	0.9	462	101	2.18E - 02	0.5	1.7
mAb10957	388	136	5.80E - 04	19.9	390	146	7.93E - 04	14.6	1.4
mAb10977	293	44	1.59E - 02	0.7	287	46	4.81E - 02	0.2	3
mAb10969	340	72	1.86E - 02	0.6	344	69	1.33E - 02	0.9	0.7
mAb10996	408	35	4.69E - 02	0.2	415	42	9.02E - 02	0.1	1.9
mAb10998	308	20	2.86E - 02	0.4	311	21	2.32E - 02	0.5	0.8
mAb11002	373	10	2.60E - 02	0.4	371	1	7.15E - 04	16.2	0
mAb11000	404	88	1.48E - 03	7.8	411	96	2.46E - 03	4.7	1.7
mAb11004	356	97	1.47E - 02	0.8	362	98	2.70E - 02	0.4	1.8
mAb11006	398	105	1.46E - 03	7.9	411	93	2.10E - 03	5.5	1.4
mAb11008	341	112	1.33E - 03	8.7	340	127	1.10E - 03	10.5	0.8
mAb11010	432	157	3.90E - 03	3	440	156	7.15E - 03	1.6	1.8
同种型对照	430	4	NB	NB	435	15	NB	NB	NB

[0495] 实例19:抗SARS-CoV-2-S抗体与病毒样颗粒的结合

[0496] 为了研究一组抗SARS-CoV-2单克隆抗体结合SARS-CoV-2纤突糖蛋白的能力,开发了在基于电化学发光的检测平台 (MSD) 中使用用SARS-CoV-2纤突蛋白进行假型化的水疱性

口炎病毒(VSV)进行体外结合测定。

[0497] 从HEK293T细胞产生假型化水泡性口炎病毒(VSV)病毒样颗粒(VLP)以瞬时表达SARS-CoV-2纤突蛋白(登录号MN908947.3,氨基酸16-1211)。也产生仅表达VSV的VLP作为阴性结合对照。

[0498] 根据以下程序进行实验。将来自上文所描述的两种来源的VLP稀释于PBS中,接种到96孔碳电极板(多阵列高结合板,MSD)中,并在4℃下温育过夜,以允许VLP粘附。将非特异性结合位点在室温下用含2% BSA(w/v)的PBS阻断1小时。向板结合的颗粒一式两份地添加稀释于浓度范围为0.0008nM到50nM的PBS+0.5% BSA中的抗SARS-CoV-2抗体和非结合人IgG1对照以及无抗体的缓冲液,并将板在室温下摇动温育1小时。然后使用AquaMax2000洗板机(MDS分析技术公司)将板用1X PBS洗涤以去除未结合的抗体。在室温下用SULFO-TAGTM缀合的抗人IgG抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)对板结合的抗体进行1小时的检测。洗涤后,根据制造商建议的程序用读取缓冲液(MSD)对板进行显影,并用SECTOR成像仪600(Meso Scale Development)仪器记录发光信号。捕获表达SARS-CoV-2的VLP和仅VSV的VLP的直接结合信号(在RLU中)。

[0499] 使用免疫结合测定评估抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体与表达SARS-CoV-2-S的VLP的结合相较于与无关的表达VSV的VLP结合的能力。用一系列抗体稀释液进行与96孔高结合板(MSD)上的固定的VLP的结合,并使用SULFO-TAGTM缀合的抗人IgG检测结合的抗体。将来自电化学发光的结合信号记录在Sector成像仪600(MSD)上。测定抗体与VLP的结合的RLU值。所有抗体均显示出浓度依赖性结合,并在5.5nM和0.20nM下对表达SARS-CoV-2-S的VLP上的结合与仅VSV上的结合的比率进行分析。

[0500] 两种浓度下的抗SARS-CoV-2-S mAb与VSV/纤突和仅VSV的VLP的结合结果汇总于表37中。在所测试的46种抗体中,44种抗体在任一浓度下以相对于VSV为3或更高的比率与VSV/纤突特异性结合。在0.2nM抗体下,VSV/纤突与VSV的比率的范围为3到56,并且在5nM下,比率的范围为3到303。尽管两种抗体(mAb10998和mAb11002)显示出与VSV/纤突VLP的结合较弱,相对于VSV VLP的比率小于3,但是5nM下的信号在VSV/纤突上高于VSV。如预期的那样,无关的IgG1同种型抗体显示出最小结合。

[0501] 表37:通过电化学发光,抗SARS-CoV-2-S抗体与表达纤突蛋白的VSV VLP对VSV结合的特异性

[0502]

抗体浓度	抗体结合信号 (RLU)				比率		
	5.5nM		0.20nM		5.5nM	0.20nM	
mAb#	VSV/纤突	VSV	VSV/纤突	VSV	VSV/纤突: VSV	VSV/纤突: VSV	实验#
mAb10913	1140	302	434	51	4	9	1
mAb10914	6139	1823	911	85	3	11	1
mAb10915	16763	702	2868	77	24	37	1
mAb10920	7757	2536	1332	102	3	13	3
mAb10921	8174	705	938	89	12	11	3
mAb10922	1458	129	562	39	11	6	2
mAb10923	1444	132	446	33	11	14	3
mAb10924	1922	353	375	57	5	7	1
mAb10930	1488	291	429	38	5	4	2
mAb10932	11774	105	1282	35	113	37	1
mAb10933	631	82	446	29	8	16	1
mAb10934	1099	124	648	29	9	22	1
mAb10935	2526	387	611	47	7	13	1
mAb10936	5087	228	1702	41	22	42	1
mAb10937	1056	204	374	43	5	9	1
mAb10938	11418	395	1223	37	29	33	1
mAb10939	4656	637	948	99	7	10	3
mAb10940	947	58	384	34	16	11	1
mAb10941	7297	69	958	17	106	56	1
mAb10954	9727	205	2114	48	47	8	2
mAb10955	2189	270	397	55	8	6	2
mAb10956	1006	373	263	71	3	6	2
mAb10957	10624	127	1606	68	84	11	2

[0503]	mAb10964	14252	47	9486	26	303	24	2
	mAb10965	1039	87	279	58	12	14	2
	mAb10966	9176	97	1406	88	95	15	2
	mAb10967	10744	122	1090	32	88	8	2
	mAb10969	1163	334	262	42	3	6	3
	mAb10970	5640	76	1061	50	74	13	2
	mAb10971	7995	60	1372	27	134	20	2
	mAb10977	26895	4283	9330	165	6	2	2
	mAb10982	1875	220	427	36	9	6	2
	mAb10984	9142	195	2270	33	47	9	2
	mAb10985	1497	90	529	65	17	8	2
	mAb10986	11155	177	2315	65	63	11	2
	mAb10987	1146	168	699	53	7	8	2
	mAb10988	967	163	438	39	6	4	2
	mAb10989	2195	128	1533	66	17	13	2
	mAb10996	812	309	82	65	3	1	3
	mAb10998	2253	1590	122	104	1	1	3
	mAb11000	580	139	94	47	4	2	3
	mAb11002	419	283	47	50	1	1	3
	mAb11004	1061	56	386	28	19	14	3
	mAb11006	26528	6299	7159	247	4	29	3
	mAb11008	508	48	80	28	11	3	3
	mAb11010	349	64	96	30	5	3	3
	IgG1 同种型对照	113	84	32	21	1	2	1
	IgG1 同种型对照	167	127	75	35	1	2	3
	IgG1 同种型对照	94	99	99	31	1	1	2

[0504] 实例20:抗SARS-CoV-2-S抗体与表达纤突蛋白的细胞的结合

[0505] 为了研究一组抗SARS-CoV-2-S单克隆抗体与表达SARS-CoV-2-S的细胞结合的能力,开发了在基于电化学发光的检测平台 (MSD) 中使用表达SARS-CoV-2-S的细胞进行体外结合测定。

[0506] Jurkat/Tet3G/hCD20/Tet-3G诱导型细胞被工程化成瞬时表达SARS-CoV-2纤突蛋白(登录号MN908947.3,氨基酸16-1211,Jurkat/Tet3G/hCD20/Tet-On 3G诱导型COVID-19纤突蛋白高分选的)并被流式细胞术分选以选择SARS-CoV-2蛋白的高表达。实验中还包含亲本Jurkat/Tet3G/hCD20/Tet-3G作为阴性结合对照。

[0507] 根据以下程序进行实验。在收获前将来自上文所描述的两个系的细胞在37℃下用1 $\mu$ g/ml强力霉素诱导36小时,向下旋转,用PBS洗涤,然后在PBS中稀释,接种到96孔碳电极板(多阵列高结合板,MSD)中,并在4℃下温育过夜,以允许细胞粘附。将非特异性结合位点在室温下用含2% BSA(w/v)的PBS阻断一小时。向板结合的细胞一式两份地添加稀释于浓度范围为0.0008nM到50nM的PBS+0.5% BSA中的抗SARS-CoV-2抗体和非结合人IgG1对照以及无抗体的缓冲液,并将板在室温下摇动温育一小时。然后使用AquaMax2000洗板机(MDS分析技术公司)将板用1X PBS洗涤以去除未结合的抗体。在室温下用SULFO-TAGTM缀合的抗人IgG抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)对板结合的抗体进行一小时的检测。洗涤后,根据制造商建议的程序用读取缓冲液 (MSD) 对板进行显影,并用SECTOR成像仪600 (Meso Scale Development) 仪器记录发光信号。捕获表达SARS-CoV-2-S的细胞和阴性对照细胞系

的直接结合信号(在RLU中)。

[0508] 使用免疫结合测定评估抗SARS-CoV-2单克隆抗体与表达SARS-CoV-2纤突蛋白的细胞的结合相较于与亲本细胞结合的能力。用一系列抗体稀释液进行与96孔高结合板(MSD)上的固定的细胞的结合,并使用SULFO-TAGTM缀合的抗人IgG检测结合的抗体。将来自电化学发光的结合信号记录在Sector成像仪600(MSD)上。所有抗体均显示出浓度依赖性结合,并在5.5nM和0.20nM的浓度下对表达纤突的细胞上的结合与亲本细胞上的结合的比率进行分析。

[0509] 抗SARS-CoV-2-S mAb在两种浓度下与表达纤突蛋白的细胞和亲本Jurkat细胞的结合结果汇总于表38中。在所测试的46种抗体中,44种抗体在任一浓度下以相对于亲本细胞为4或更高的比率与Jurkat/纤突细胞(Jurkat/Tet3G/hCD20/Tet-On 3G诱导型SARS-CoV-2纤突蛋白高分选的细胞)特异性结合。在0.2nM下,Jurkat/纤突细胞与亲本细胞上的结合信号的比率的范围为4到36,并且在5nM下,比率的范围为4到63。尽管两种抗体(mAb10998和mAb11002)显示出与Jurkat/纤突细胞的结合较弱,相对于亲本细胞的结合比率小于4,但是在5nM下,Jurkat/纤突上的结合信号高于亲本细胞上的结合信号。如预期的那样,无关的IgG1同种型抗体显示出最小结合。

[0510] 表38:通过电化学发光,抗SARS-CoV-2-S抗体与表达纤突蛋白的Jurkat细胞对亲本细胞的结合的特异性

[0511]	抗体结合信号 (RLU)					比率	
	抗体浓度	5.5nM		0.2nM		5.5nM	0.2nM
		mAb#	Jurkat/纤突	亲本	Jurkat/纤突	亲本	Jurkat/纤突:亲本
	mAb10913	907	174	576	36	5	16
	mAb10914	1624	569	262	64	3	4

[0512]	mAb10915	1814	217	269	42	8	6
	mAb10920	3501	597	1970	80	6	25
	mAb10921	3746	272	436	60	14	7
	mAb10922	399	63	225	22	6	10
	mAb10923	2561	103	1137	46	25	25
	mAb10924	1418	121	336	24	12	14
	mAb10930	673	151	175	25	4	7
	mAb10932	1525	65	206	29	23	7
	mAb10933	898	171	671	73	5	9
	mAb10934	762	146	697	46	5	15
	mAb10935	1572	209	513	28	8	19
	mAb10936	995	116	567	28	9	21
	mAb10937	867	95	388	30	9	13
	mAb10938	1678	165	195	30	10	7
	mAb10939	3195	292	901	119	11	8
	mAb10940	657	51	291	19	13	16
	mAb10941	1196	37	192	33	33	6
	mAb10954	929	110	327	46	8	7
	mAb10955	750	134	274	28	6	10
	mAb10956	801	136	214	42	6	5
	mAb10957	846	76	211	48	11	4
	mAb10964	896	37	724	20	24	36
	mAb10965	681	49	135	69	14	2
	mAb10966	969	65	245	53	15	5
	mAb10967	928	121	168	26	8	6
	mAb10969	2793	124	774	35	23	22
	mAb10970	743	59	246	57	13	4
	mAb10971	839	42	263	23	20	12
	mAb10977	2031	975	604	76	2	8
	mAb10982	737	117	211	25	6	8
	mAb10984	889	95	282	26	9	11
	mAb10985	527	63	179	65	8	3
	mAb10986	1050	92	341	33	11	10
	mAb10987	632	83	471	31	8	15
	mAb10988	367	83	272	41	4	7
	mAb10989	778	62	778	38	13	20
	mAb10996	1399	172	185	27	8	7
	mAb10998	1277	393	128	65	3	2
	mAb11000	1745	70	261	22	25	12
	mAb11002	241	160	30	36	2	1
	mAb11004	2031	48	748	34	43	22
	mAb11006	5052	1055	1044	70	5	15
	mAb11008	2382	38	237	50	63	5
	mAb11010	387	52	140	33	8	4
	IgG1 同种型对照	95	34	62	22	3	3

[0513]	IgG1 同种型对照	58	65	21	48	1	0
	IgG1 同种型对照	64	73	118	62	1	2

[0514] \*\*\*\*\*

[0515] 本文引用的所有参考文献均通过引用并入,达到如同每个单独的出版物、数据库条目(例如,Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利被专门且单独地指示通过引用并入的相同程度。申请人意图通过引用将这一并入声明与每一个单独的出版物、数据库条目

(例如,Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或所标识的专利相关联,即使这样的引用不直接与通过引用并入的专用声明相邻。在说明书中包含通过引用并入的专有说明(如果有的话)并不以任何方式削弱通过引用并入的一般性声明。本文引用参考文献并非旨在承认所述参考文献是相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文献的内容或日期的任何承认。

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

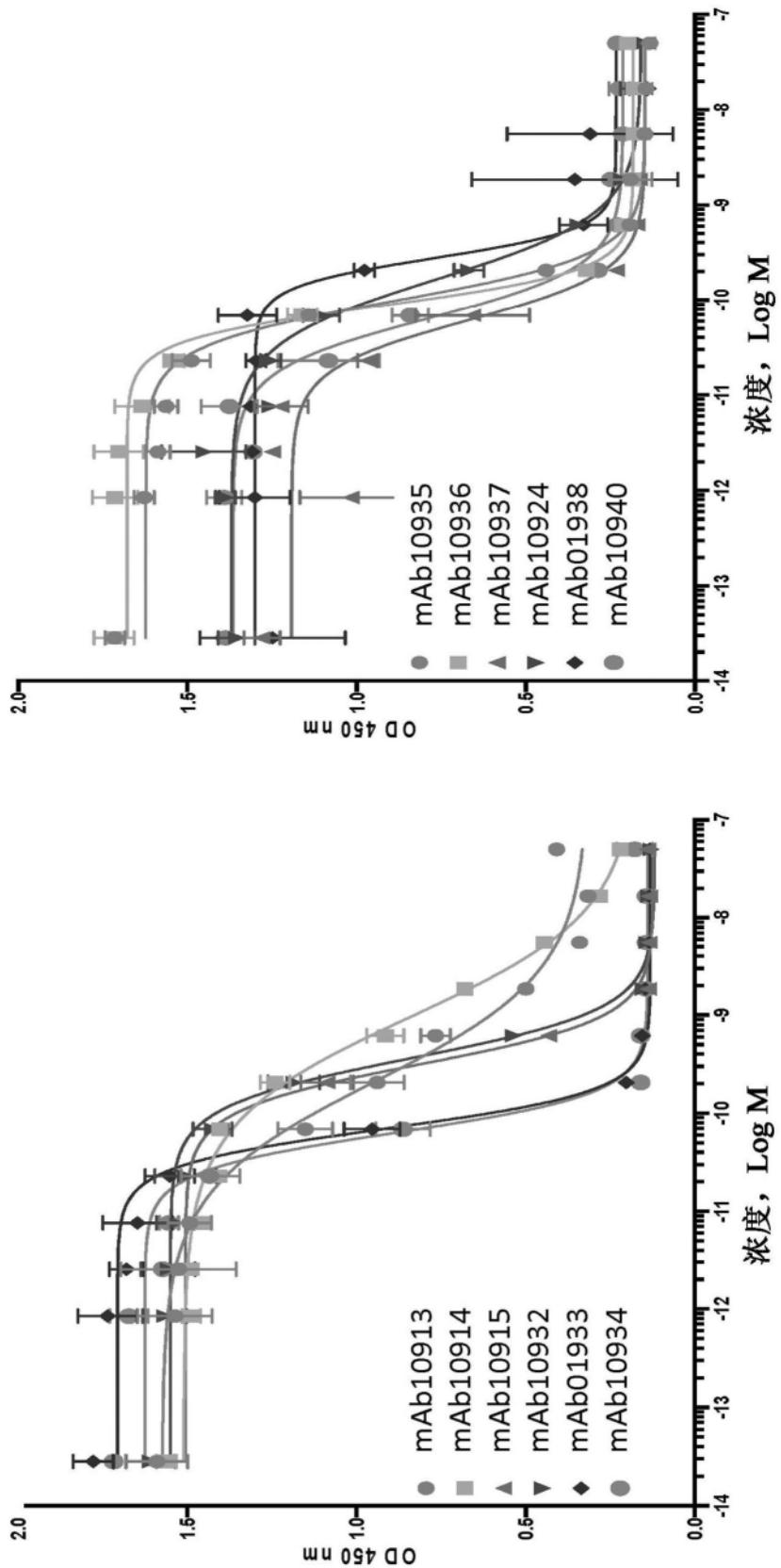


图1

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

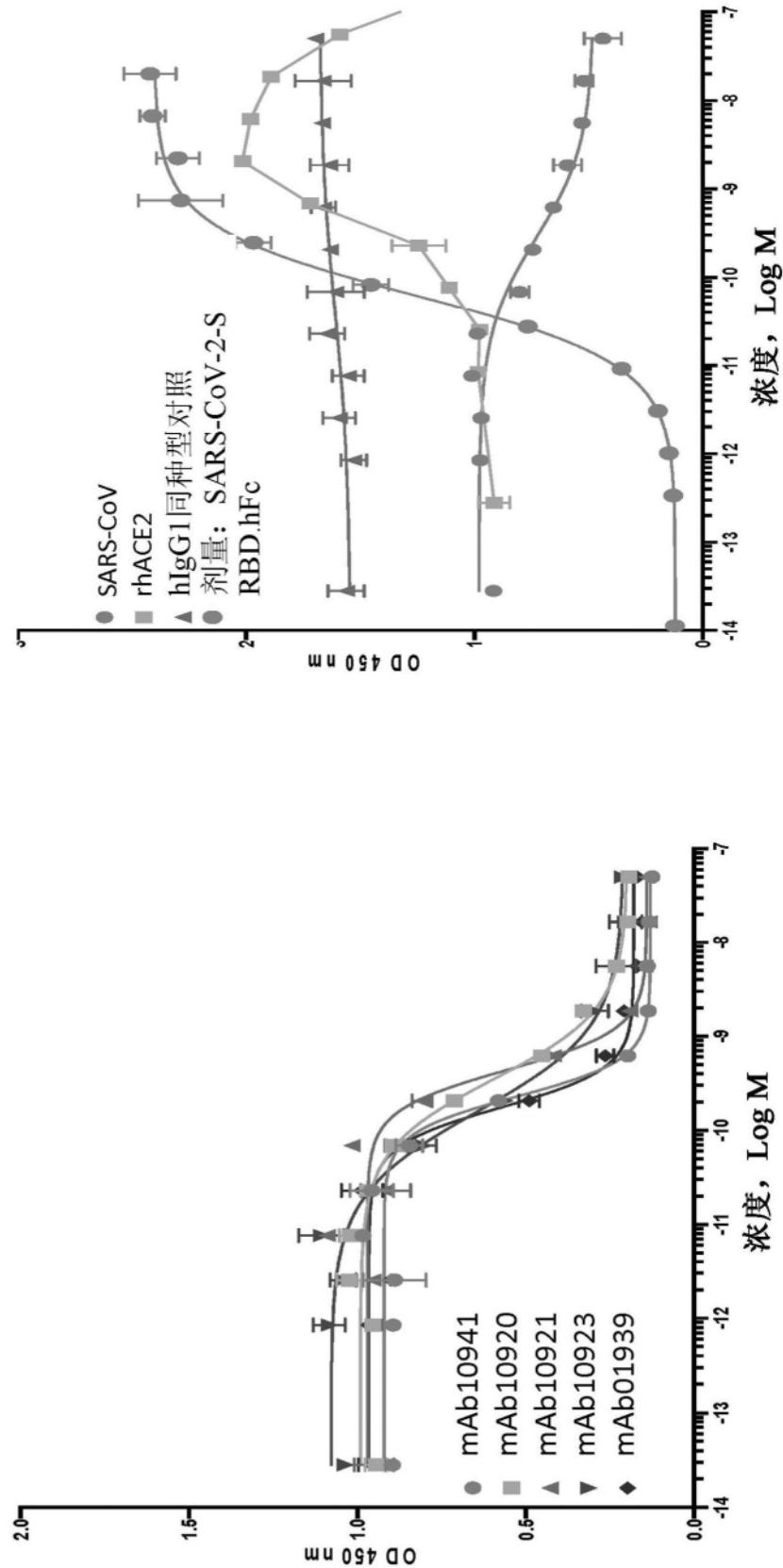
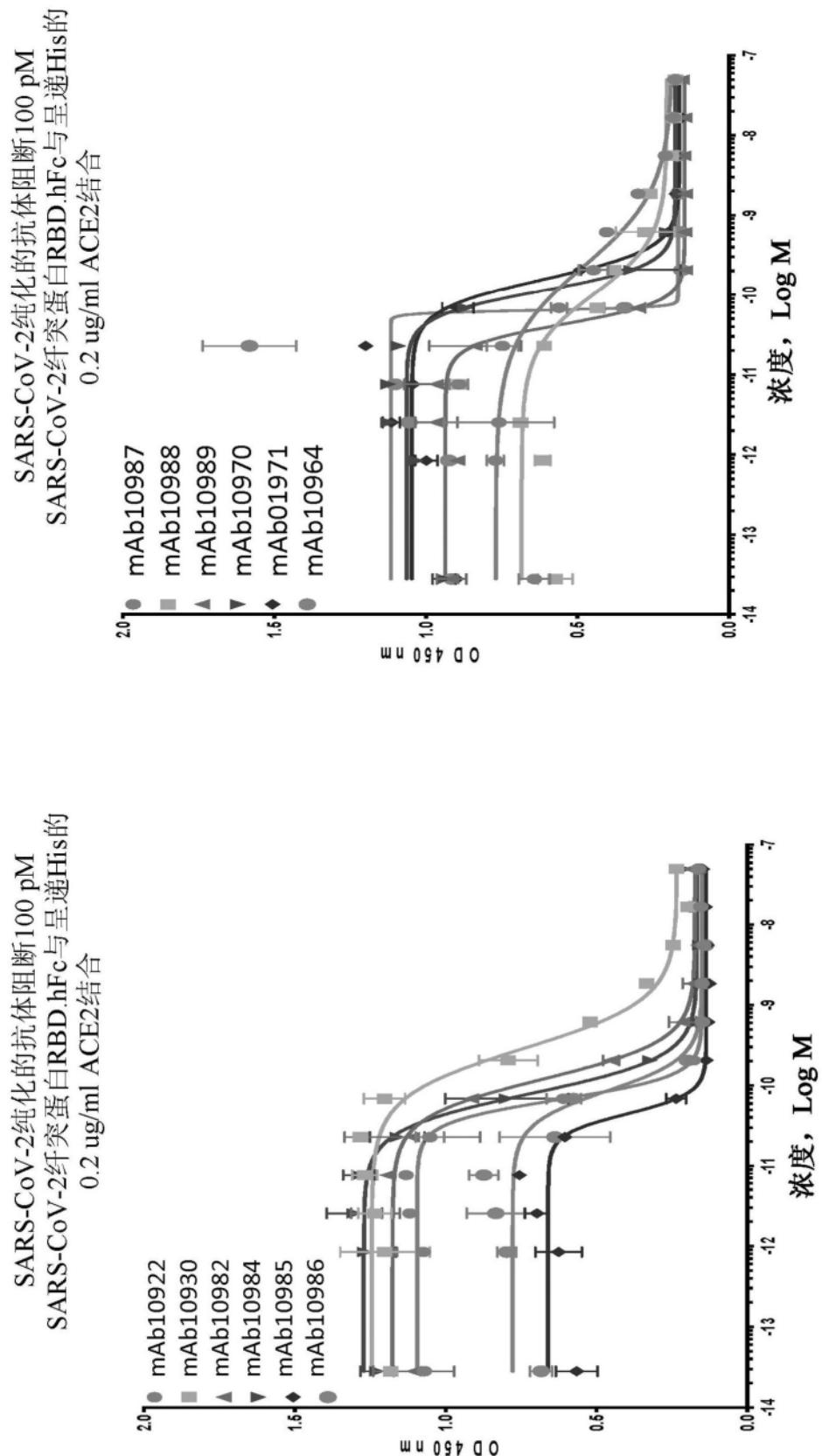


图2



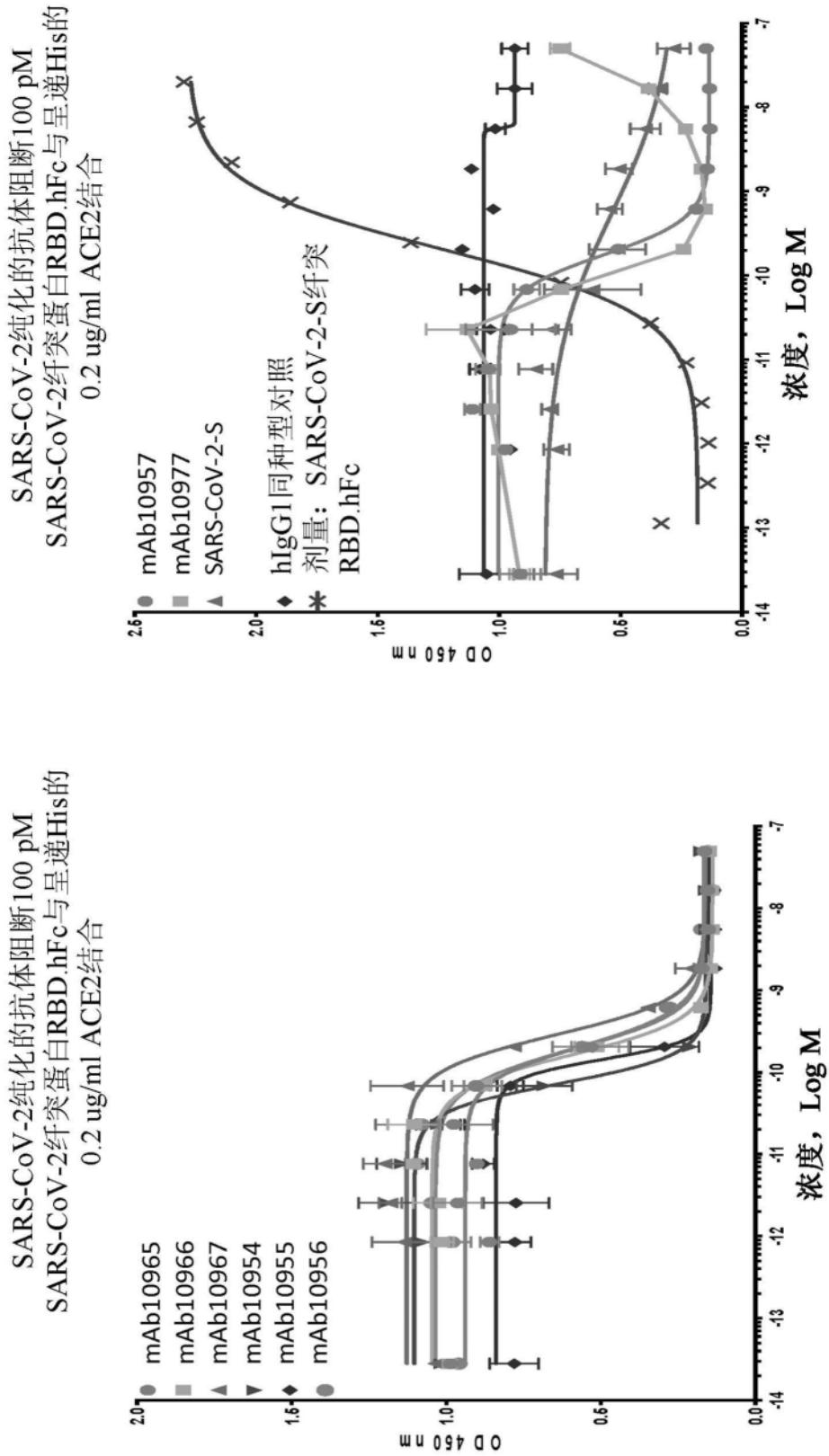


图4

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

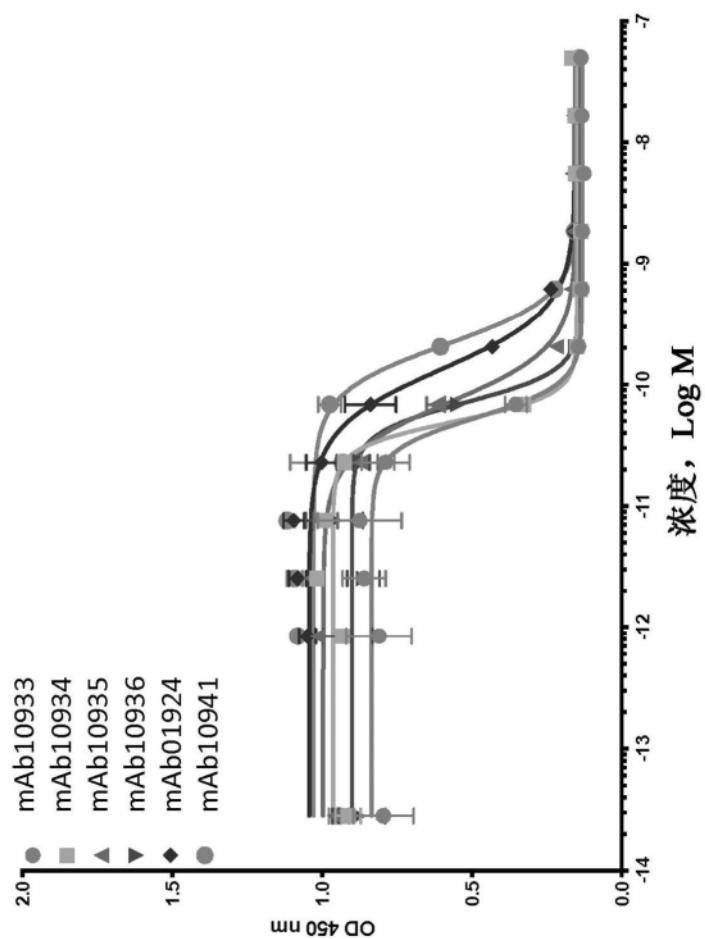


图5

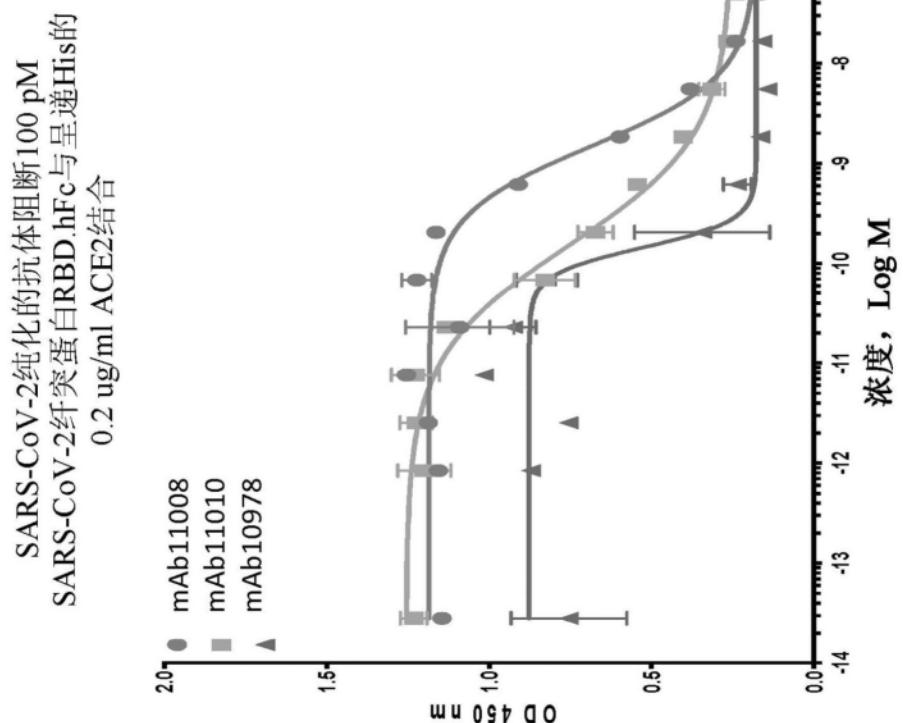
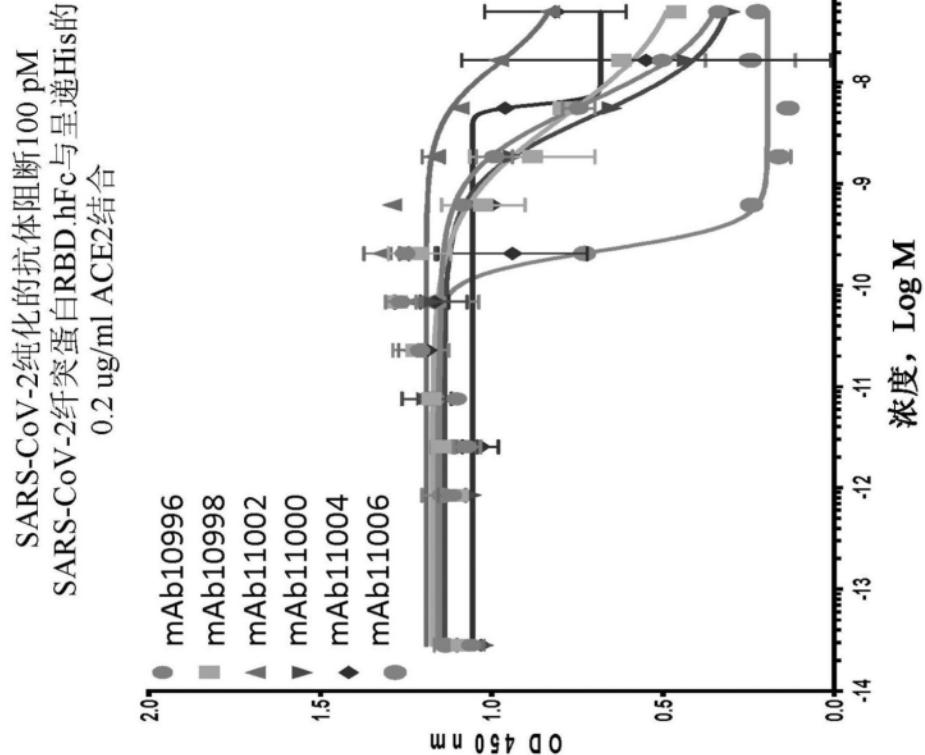


图6

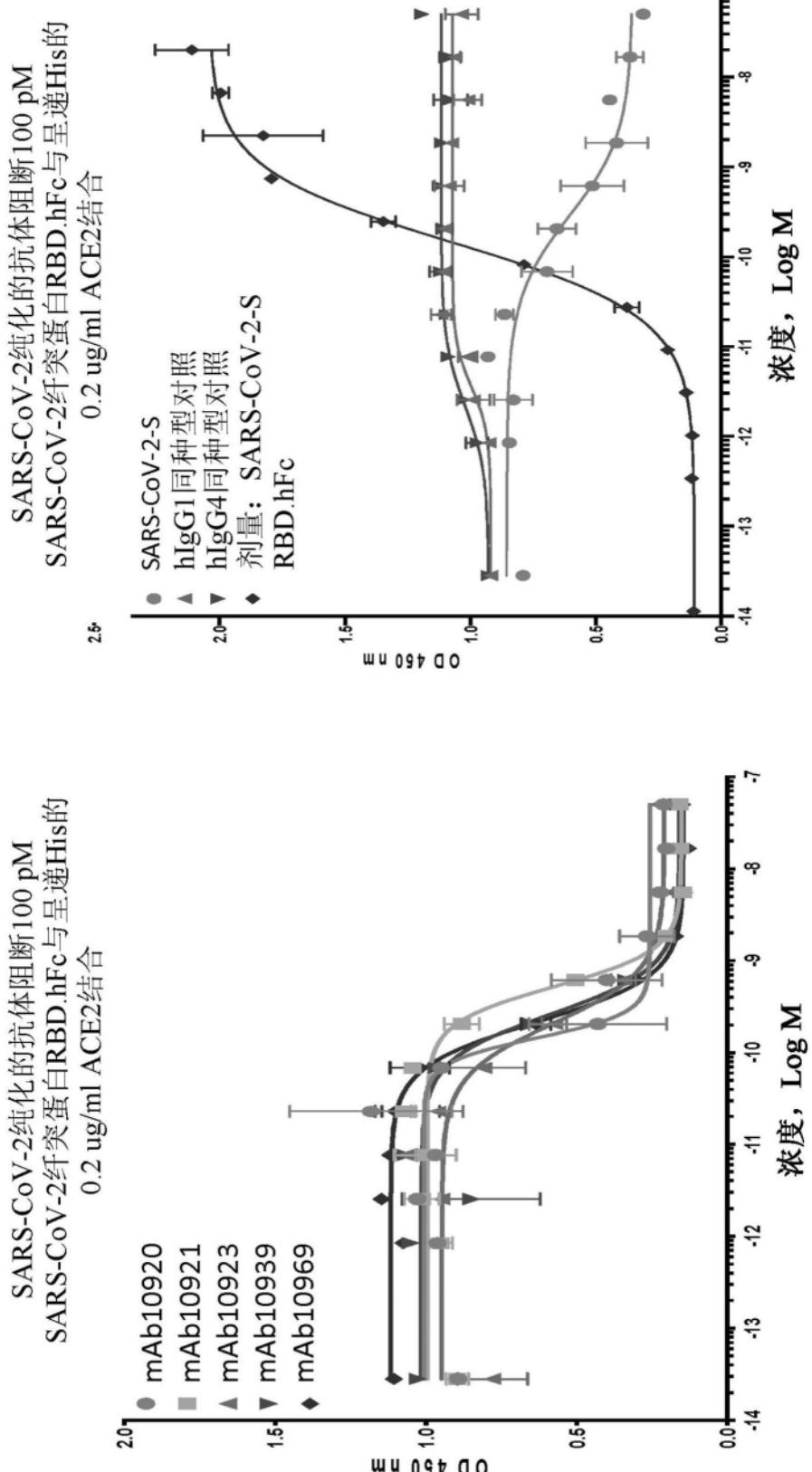


图7

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

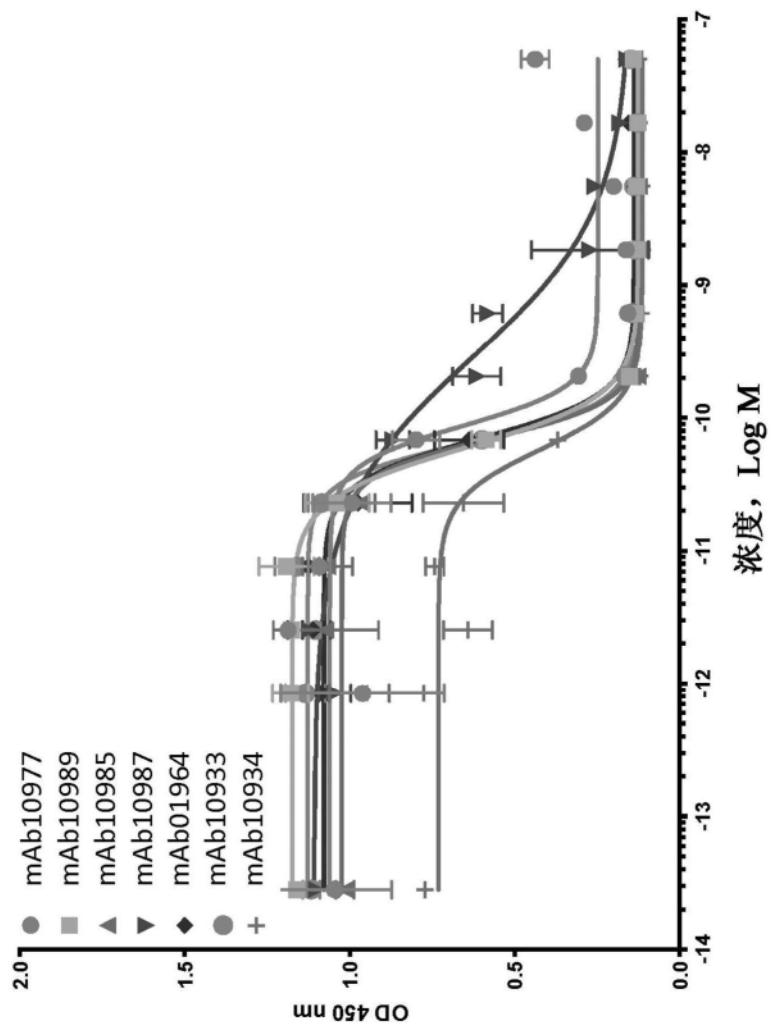


图8

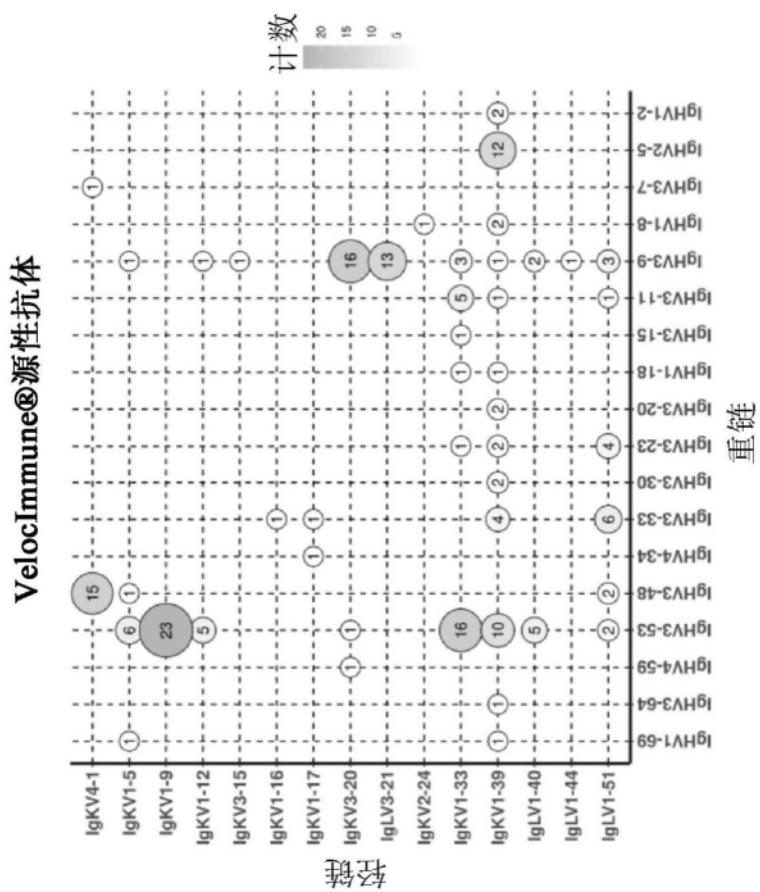


图9A

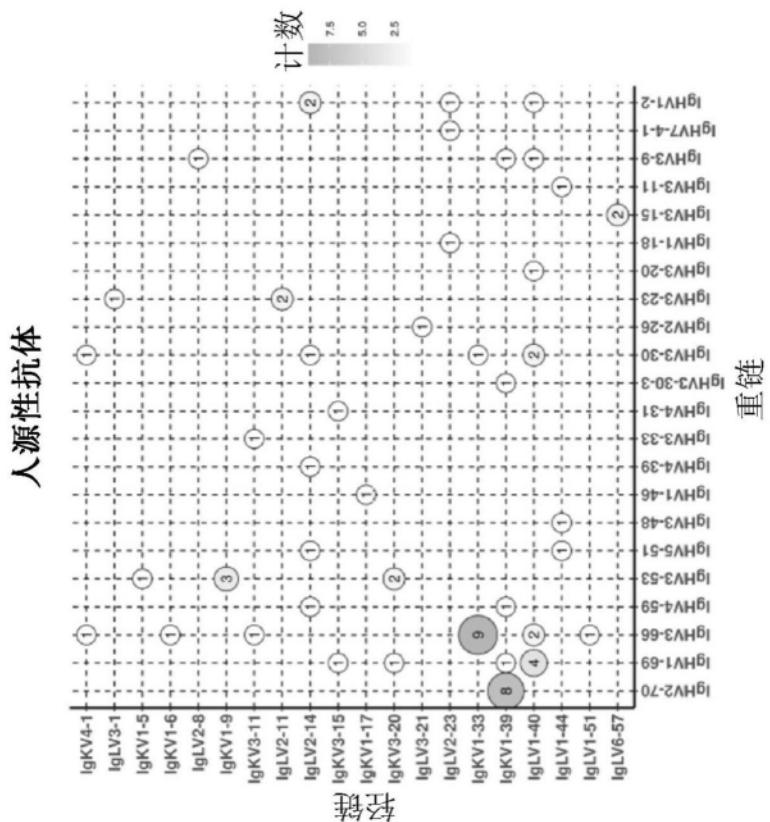


图9B

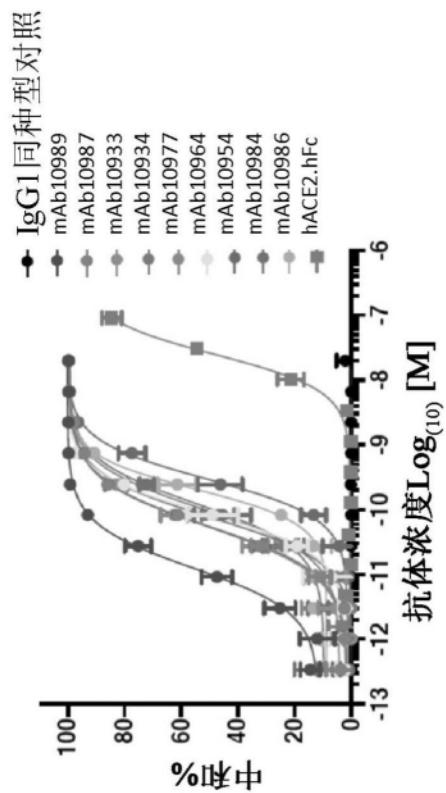


图10A

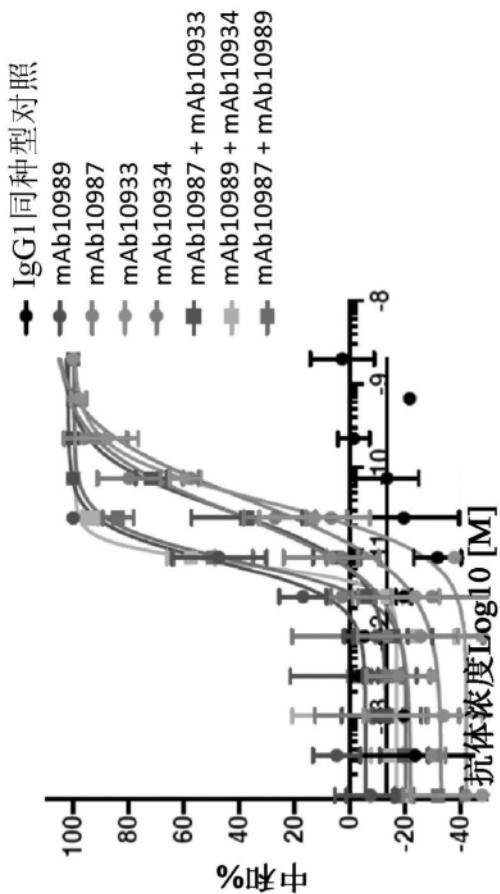


图10B

抗SARS-CoV-2 mAb之间的预混合竞争		阶段III, 100 nM SARS-CoV-2 RBD-MMH复合物的600 nM的mAb2结合位点 (nm) 的应答									
阶段I	测量所捕获的mAb1	阶段II 测量IgG阻断mAb (nm)	预混合竞争								
mAb	nm 所捕获的mAb	nm 所结合的mAb	mAb10977	mAb10989	mAb10933	mAb10964	mAb10984	mAb10986	mAb10954	mAb10934	mAb10987
mAb10977	1.69 ± 0.05	0.00	-0.03	-0.01	-0.04	-0.02	0.46	0.33	0.00	0.00	0.96
mAb10989	1.95 ± 0.03	0.07	0.00	-0.04	-0.03	-0.04	0.03	-0.01	-0.07	0.30	
mAb10933	1.73 ± 0.06	0.10	0.04	0.00	-0.01	-0.01	0.04	0.00	0.25	1.52	
mAb10964	1.90 ± 0.03	0.04	0.02	0.04	0.00	-0.01	0.05	0.04	0.38	1.37	
mAb10984	1.88 ± 0.04	0.27 ± .08	0.11	0.03	0.15	0.02	0.00	0.08	0.06	0.55	1.13
mAb10986	1.73 ± 0.04	1.09	0.14	0.32	-0.03	-0.06	0.00	-0.04	0.86	1.21	
mAb10954	1.83 ± 0.04	0.85	0.03	0.53	-0.01	-0.04	0.02	0.00	1.12	1.16	
mAb10934	1.78 ± 0.06	0.07	0.05	0.03	-0.03	0.65	1.23	1.60	0.00	0.31	
mAb10987	1.83 ± 0.04	1.29	0.06	0.76	0.85	1.03	1.05	1.07	-0.08	0.00	

图11

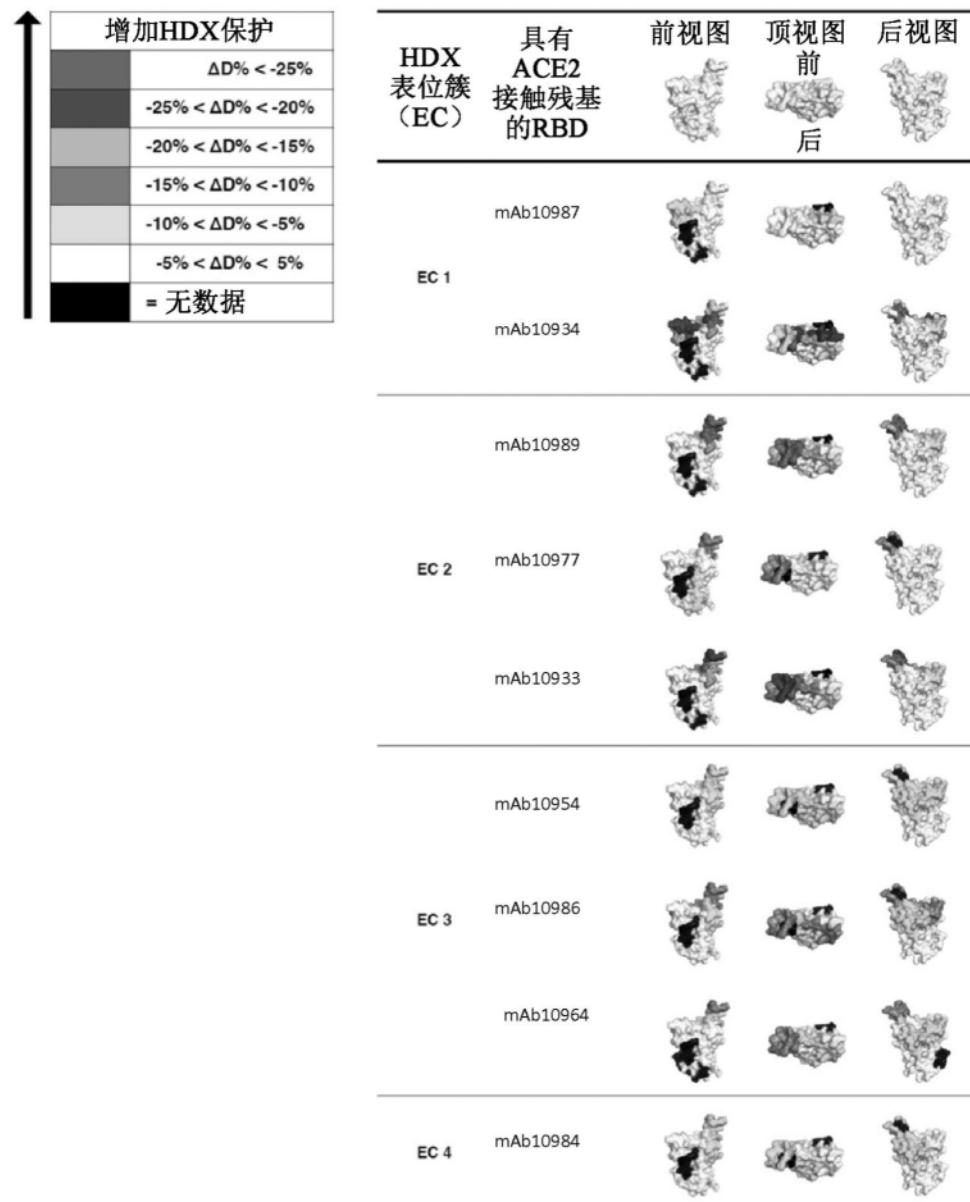


图12

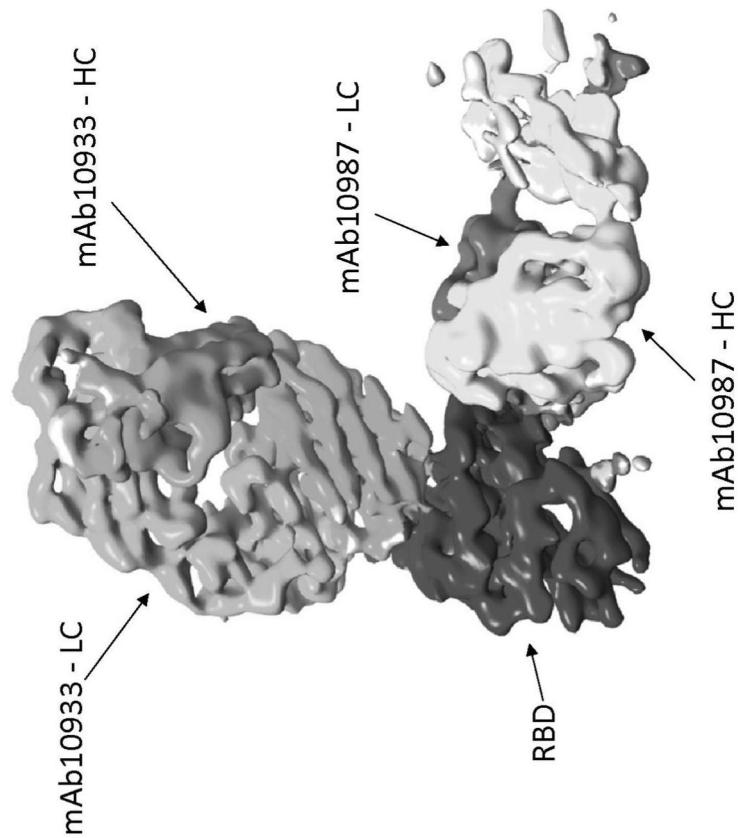


图13A

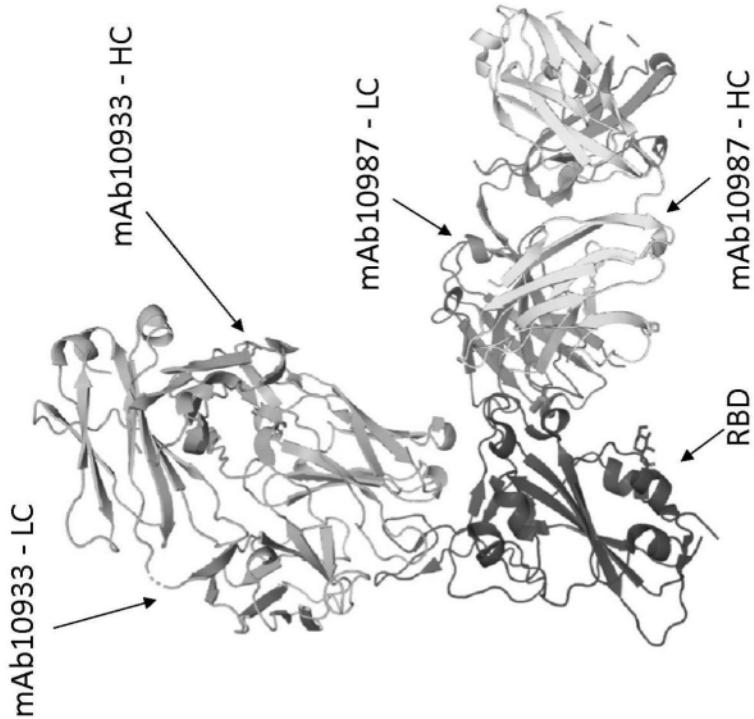


图13B

SARS-CoV-2 RBD:  
mAb10933:mAb10987  
复合物

**数据收集和处理**

放大率	105,000
电压 (kV)	300
电子曝光 (e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> )	40
散焦范围 (μm)	1.6-3.0
像素大小 (Å)	0.85
所施加对称性	C1
初始颗粒数	989,553
最终所选择颗粒	61,707
图分辨率 (Å)	3.9
FSC阈值	0.143

**细化**

图锐化B因子 (Å <sup>2</sup> )	-122
模型组成 (原子数)	7979
模型对图相关系数	0.64

**R.m.s.偏差**

键长 (Å)	0.02
键角度 (°)	1.12

**验证**

MolProbity得分	2.7
旋转异构体离群值 (%)	1.0

**拉马钱德兰图 (Ramachandran plot)**

有利的 (%)	83.0
允许的 (%)	16.3
不允许的 (%)	0.7

图14